

光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書

2003年10月16日 当初作成者 吉村 功
2003年10月22日 改訂責任者 吉村 功
2003年11月05日 改訂責任者 吉村 功
2003年11月24日 改訂責任者 吉村 功

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（以下「本学会」という）バリデーション委員会が、実行委員会を組織して行うものである。

本研究には、試行錯誤的な側面があるので、研究遂行中に計画の変更を余儀なくされることがある。その際には本計画書を逐次改定し、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を明記する。

1. 研究目的

本研究の目的は、酵母光生育阻害試験（以下、「酵母試験」という）と光溶血性試験（以下、「溶血試験」という）の組み合わせ（以下、「試験バッテリー」という）を用いて被験物質の光毒性評価を行うとき、その結果が複数の施設間でどの程度変動するかを、多施設バリデーションを行い定量的に把握することである。もちろん試験バッテリーで評価したいのは、被験物質の生体内（*in vivo*）光毒性を予測することであるから、そのためにどのようなデータ評価法、判定規準が妥当かについての検討も研究目的の内に入る。

2. 実行組織

丁寧に言うと「酵母光生育阻害試験と光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験の施設間バリデーション研究実行委員会」というべきであるが、あまりにも長いので、正式名称を「光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会」として、略称を「光バリ実行委」とする。

メンバーは次の13人で、その連絡先は添付資料1の通りである。

1) 実験参加施設代表：

板垣宏（資生堂）、岡本裕子（コーセー）、小島肇夫（メナード）、田中憲穂（食薬センター）、土肥孝彰（マルホ）、藤田百合子（東洋ビューティ）

2) バリデーション委員会委員

大森崇（京都大）、川端留美（大鵬）、吉村功（理科大、委員長）

3) 評価委員会代表：

大野泰雄（国立衛研）

4) 技術担当：

穂谷昌利（資生堂）、森眞輝（資生堂）、若栗忍（食薬研）

研究遂行においては、大野泰雄が主任研究者を務める厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班の協力を得る。

技術研修、機器手配、試料手配については、資生堂安全性・分析センター、食品薬品安全センター秦野研究所、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部の協力を得る。

3. 光毒性試験代替法についての状況

EU/COLIPA では、光毒性試験代替法として、Balb/c 3T3 細胞を用いニュートラルレッド取り込みを指標とした光毒性試験代替法を取り上げて、施設間バリデーションを行っている。その概要は添付資料 2 の通りである。

これに対して日本では、資生堂安全性・分析センターが試験バッテリーの研究を行い、施設内での結果では十分利点を持っていることが証明されたとしている。その内容は添付資料 3-1,3-2 の通りである。

しかしながら本学会評価委員会では、添付資料 3-3 に示すように、多施設でのバリデーションが行われておらず、試験バッテリーの施設間差が確かめられていないという判断を下し、これを研究することを本学会バリデーション委員会に委託した。

バリデーション委員会は、この委託を受けて、2003 年 7 月 29 日に、添付資料 4 に示す議論を行い、研究参加施設を公募し、光バリ実行委を組織し、研究を行うこととした。これが本研究である。

4. 研究日程

- 2003 年 9 月 30 日までに、参加施設確定、実行委員会確定、基本プロトコール作成
- 11 月 13 日、14 日に技術研修会を開催
- 12 月末までに各施設が予備実験等の自己研修
- 2004 年 1 月に試験開始
- 2004 年 2 月末に中間集計、中間報告
- 4 月末までに、実験者が結果を実行委員会に報告
- 8 月末までに、実行委員会が報告書をまとめる

5. 実験参加施設

実験参加施設は、この研究の公募に参加を表明した次の 6 施設である。

- (株)コーセー研究本部品質保証センター（実験担当者：岡本裕子、谷川浩子）
- 資生堂安全性・分析センター（実験担当者：穂谷昌利、森眞輝）
- (財)食品薬品安全センター秦野研究所（実験担当者：若栗忍）
- 東洋ビューティ（株）研究開発部（実験担当者：藤田百合子）
- 日本メナード化粧品（株）総合研究所（実験担当者：長谷川靖司）

マルホ（株）京都R&Dセンター（実験担当者：土肥孝彰）

6. 試験バッテリーの内容

本研究が対象とする試験バッテリーの試験内容は、添付資料 5-1,5-2,5-3 の通りである。

7. 被験物質

被験物質の候補物質リストは添付資料 6 の通りである。

候補物質リストの中から、実施可能性を考慮して、陽性、中間、陰性、各 3 物質の合計 9 物質を大野が選び被験物質とする。各施設には 6 物質（陽性対照物質を含めると 8 物質）を送付する。すなわち、薬物コードと実験施設との割付表は東京理科大（責任者吉村）が作成し、薬物コードへの被験物質の割付と配布は国立衛研（責任者大野）が行う。

被験物質が具体的に何かはブラインドとし、試料にはコードをつけて配布する。ブラインドであるから、実験者は被験物質の使用、保管、廃棄のすべての段階において、それらを劇物として取り扱い、必要な記録を保管しなければならない。

8. 機器、消耗品と被験物質試料の準備

光源は、Dr. Hönle 社の SOL500 とする。光源の手配は、田中が指示する。

資生堂（神奈川）自社の光源

食薬研（神奈川）自社の光源

マルホ（京都）自社の光源（間に合わないときは研究班の光源 3）

コーセー（東京）研究班の光源 1

東洋ビューティ（大阪）研究班の光源 2

メナード（名古屋）研究班の光源 3

マイクロプレート、ペーパーディスク、酵母の手配は、大野が指示する。共通消耗品の費用は、厚生労働科学研究班が負担する。

吸光度は波長 540nm と 525nm の 2 種類で測定するが、主解析は 540nm フィルターを使った測定値に基づいて行う。525nm での測定が測定機器の関係で困難なときは、520nm あるいは 530nm で代用する。赤血球は、実験施設が購入する。

測定機器、実験条件について、GLP 準拠で考えて必要なものはすべて記録しておくこととする。各実験施設は、その記録のコピーを大野に送った上で、原本を実験終了後 5 年間保管し、実行委員長から記録内容について問い合わせがあったら、記録を確かめて回答を行うものとする。

9. 経費

本学会バリデーション委員会委員以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

配布試料や培養プレート等光バリ実行委が送付するもの以外の実験上の消耗品は、各施設で自弁とする。

10. 技術研修と予備実験

技術研修は、11月13, 14日に、食品薬品安全性センター秦野研究所で、添付資料7の要領で行う。

予備実験は、12月末までに各参加施設が自主的に行う。

11. データの管理と解析

実験を行ったらできるだけ早く、添付資料8にある指定データシートに記入して、電子ファイル及び測定機器のプリントアウト又は測定結果を落とした電子ファイルのプリントアウト、酵母試験の場合はプリントアウトした指定データシートへの手書き測定結果のコピーを大森（京都大学）と吉村（東京理科大学）に送付する。記入要領は技術研修会で大森が説明する。

データ内容についての疑問は、吉村または大森が各実験者に問い合わせる。

報告されたデータは東京理科大学（責任者 吉村）と京都大学（責任者 大森）が点検し、疑問点を施設に確認し、必要な修正を行ったところでデータベースに固定する。

大野は、各施設から送られてきた GLP 準拠の記録のコピーを、バリデーション研究の成果が社会的に承認されたと、光バリ実行委が判断するまで保管する。

陰性、陽性の判定はプロトコールに従って各施設で行うが、それとは別に、大森、吉村が、各被験物質に対する測定値の施設間、施設内変動の解析、各試験での用量反応関係の解析、判定基準の妥当性の解析を行う。

赤血球溶血試験では 540nm フィルターを用いた測定値で主解析を行う。

13. 検討会

一応のデータ解析ができた段階で、実行委員と実験者全員の参加の下で、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うための会合を開く。

14. 結果の公表

2004年2月末に中間解析を行い、得られた結果を厚生労働科学研究班の報告にする。

全体の結果は、厚生科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名については、検討会で確定する。

15. 各種問い合わせ先

実験内容についての疑問は森、穂谷に問い合わせること。

光源についての疑問は、若栗に問い合わせること。

被験物質、試料、共通消耗品についての疑問は、大野に問い合わせること。

データシートについての疑問は、大森に問い合わせること。

報告書、データの送付、研究の遂行についての疑問は、吉村に問い合わせること。

16. 添付資料リスト

1. 光バリ実行委名簿
2. Balb/c 3T3 細胞を用いニュートラルレッド取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価報告
3. 提案法の内容に関する資料
 - (3-1) 杉山論文
 - (3-2) 森論文 (10月22日現在のドラフト)
 - (3-3) 大野報告書
4. バリレーション委員会議事録(2003.7.29)
5. 試験標準手順書
 - (5-1) SOP-1
 - (5-2) SOP-2
 - (5-3) SOP-3
6. 被験物質候補リスト
7. 技術研修計画
8. データシート
 - (8-01), (8-02), (8-03), (8-04), (8-05), (8-06), (8-07), (8-08), (8-09), (8-10), (8-11), (8-12), 以上シート①~⑫
 - (8-13) 酵母光生育阻害試験用シートの説明文書
 - (8-14) 赤血球光溶血試験用シートの説明文書

以上

2003年10月22日の改訂内容

1. 杉山真理子が職場移動をして実行委員から外れたこと、アイビー化粧品が実験参加を見合わせたことにより、西澤愛が実行委員会から外れたこと。
2. 添付資料リストをつけたこと。
3. 解析内容をより具体的なものにしたこと。
4. 上記変更に伴う変更を行ったこと。
5. 細部の字句を修正したこと。

以上5点 文責 吉村 功

2003年11月5日の改訂内容

1. 被験物質を9物質にした理由が「実施可能性である」としたこと。
2. 細部の字句の訂正

以上2点 文責 吉村 功

2003年11月24日の改訂内容

1. 525nmのフィルターが購入できないことが分かったので、それに関することを変更した。
2. GLPに準拠した記録を保管することと、コピーを大野に送ることを明記した。
3. データは大森と吉村の両方に送ることを明記した。
4. 記録シートの説明文書を添付文書とし、シート番号を変えた。
5. 細部の字句の訂正

以上5点 文責 吉村 功

光毒性試験代替法補完実験計画書

2006年7月4日 作成者 吉村 功

2006年7月14日 改訂責任者 吉村 功

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が、実行委員会を組織して行うものである。研究遂行中に計画を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を記録する。

1. 研究目的

2003年から2004年にかけて行われた酵母光生育阻害試験（酵母試験）と赤血球光溶血性試験（溶血試験）の組み合わせ（試験バッテリー）の多施設バリデーション研究（前実験）において、酵母試験のSOPの不備が指摘された。試験バッテリーの提案者は、2006年5月にSOPの改訂を行った。その改訂の妥当性を検証するための実験（補完実験）を行い、改訂後の試験バッテリーの適用における施設間差を評価することが本研究の目的である。

2. 実行組織

補完実験を行う組織の正式名称を「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」として、略称を「補完実験実行委」とする。

メンバーは次の11人で、その連絡先は添付資料1の通りである。

1) 実験参加施設代表：

板垣宏（資生堂）、岡本裕子（コーセー）、長谷川靖司（メナード）、田中憲穂（食薬センター）、土肥孝彰（マルホ）

2) バリデーション委員会委員

大森崇（京都大）、吉村功（理科大、本実行委の委員長）

3) 技術担当：

穂谷昌利、石川牧恵（資生堂）、小島肇（国立衛研）、石川公平（理科大）

3. 研究日程

2006年7月4日に、第1回補完実験実行委員会を開催し、参加施設、実行委員、実験担当者、実行委員長を確定し、改定SOPと補完実験計画書を確認した。

7月14日までに、試料と校正した強度計を各施設に配送する。

9月16日までに各施設が実験を行う。実験担当者は実験終了後可及的速やかに、データを大森、石川公平、吉村に送付し、GLP準拠の関連資料のコピーを大森に送付する。

10月中旬に中間報告会を開催する。

12月末までに報告書をまとめる

4. 実験参加施設

実験参加施設は次の5施設である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター（実験担当者：今井教安）

(株)資生堂品質保証センター（実験担当者：石川牧恵）

（財）食品薬品安全センター秦野研究所（実験担当者：若栗忍）

日本メナード化粧品（株）総合研究所（実験担当者：松永康明）

マルホ（株）京都R&Dセンター（実験担当者：米澤理一郎）

5. 被験物質

各施設で実験する被験物質は前実験と同じであるが、薬物コードは異なったものとする。配布は小島（国立衛研）が行う。実験担当者は被験物質の使用、保管、廃棄すべての段階において、それらを劇物として取り扱い、必要な記録を保管しなければならない。

6. 機器、消耗品と被験物質試料の準備

光源は、Dr. Hönle社のSOL500とする。強度計は小島が校正する。

資生堂（神奈川）自社の光源

食薬研（神奈川）自社の光源

マルホ（京都）自社の光源

コーセー（東京）研究班の光源1

メナード（名古屋）研究班の光源2

マイクロプレート、ペーパーディスク、酵母の手配は、共通消耗品は小島が配布する。

測定機器、実験条件で必要と思われることは各実験施設で記録を保管し、解析の際に問い合わせがあったら報告する。

7. 経費

本学会バリデーション委員会委員以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

補完実験実行委が送付するもの以外の実験上の消耗品は各施設で自弁とする。

8. データの管理と解析

実験を行ったらできるだけ早く、結果を指定データシートに記入して、電子ファイルをメールで大森、石川公平、吉村に送付する。各種記録用紙（GLP準拠関連資料も含む）のコピーは「〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学大学院医学研究科医療統計 大森崇助教授」に送付する。

報告されたデータは石川公平が点検し、疑問点を施設に確認し、必要な修正を行ったところでデータベースに固定する。

9. 検討会

一応のデータ解析ができた段階で、実行委員と実験担当者全員の参加の下で、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うための会合を開く。

10. 結果の公表

2006年12月末までに結果を厚生労働科学研究班の報告にする。

全体の結果は、厚生科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名については、検討会で確定する。

11. 各種問い合わせ先

実験内容についての疑問は、石川牧恵に問い合わせること。

被験物質、試料、共通消耗品についての疑問は、小島に問い合わせること。

データシートについての疑問は、石川公平に問い合わせること。

報告書、データの送付、研究の遂行についての疑問は、吉村に問い合わせること。

以上

改訂内容（敬称略）

2006年7月14日の改訂

ワープロミス・文章ミスの修正以外の、本質的な改訂部分と改訂理由は次の通りである。

1. 所属・氏名等：石川牧恵，小島肇等から，誤りの修正要求があったので改訂した。
（添付資料の名簿部分にも改訂が及んでいる。）
2. 本実行委の委員長：2-2)において，「委員長」と書かれていたところを「本実行委の委員長」とした。委員長が誰であるか明記しておいた方がよい，という注意を受けたためである。
3. 書類送付先：「8 データの管理と解析」における，書類送付先を，電子媒体の場合は，大森，石川公平，吉村の3人とし，各種記録（GLP 準拠関連資料も含む）のコピーの場合は大森にした。コピー送付は手間のかかる作業なので，1カ所にした方が良く，その場合の宛先としては，データ解析の担当者の大森が最も適当だからである。