4-2-2-2）試験結果のビボ試験結果との対応性

担当：畑尾正人、大森崇

A. データの説明

Balb/c 3T3 細胞を用いた光刺激性試験代替法は、被験物質存在下で UVB を減衰させるフィルターを通したソーラーシミュレーター光を照射して、Balb/c 3T3 細胞の生存をニュートラルレッドの細胞内取り込み量をエンドポイントとして評価する方法である。本試験法は光刺激性を定性的に評価する hazard identification のための方法として位置付けられる。判定に用いられるパラメーターは PIF（Photo Irritation Factor：光刺激係数）および MPE（Mean Photo Effect：平均光効果）の 2 種がバリデーションで使用されている。

本章ではこの 2 つのパラメーターを用いた試験法についてそれぞれ試験性能に対する評価を行った。この 2 種のパラメーターで光刺激性を施設間バリデーションで評価している公表論文は前項（4-2-2-1）で述べた 3 報（Spielman, 1994, 1998a, 1998b）のみであるため、それらの論文データを基に評価した。

なお、試験法の性能に関して適切な評価を行うためにそれらの論文の実験データを以下に示す基準で再検討し、データをまとめた（Table 4-2）。

- 同一の化学物質が複数の論文で評価されている場合はまとめて一つの物質として解析を行った。
- *in vivo* のデータは 3 論文を通じて、データの存在を明確に示す記述が一つでもあれば、それを採用した。
- Phase I 研究での *in vivo* 試験結果は空欄、＋/－(Inconclusive)、(＋)、＋、－、A(光アレルギー性）というあいまいな書き方があったため、本解析では以下に示す基準を用いた。

  空欄：データの存在がないものとした
  ＋/－：解析に使用できないのでデータなしとした
  (＋)：＋とした
  A（光アレルギー性）：試験データが存在するものとして扱った
- *in vitro* の実験結果で施設間の判定結果に陽性および陰性が混在したものは多施設の示した判定に統一して解析した。その際、括弧内に異なる判定を示した施設数の全体に対する割合を示した。
- 論文中では同一の化学物質とその塩が別の被験物質として扱われている場合と同一に扱われている場合が混在していた。論文データをまとめて記した Table 4-2 では公表論文そのものの形で表したが、*in vivo* との比較解析では同一の被験物質として扱った。

Presented by Medical*Online

Table 4-2　公表データのまとめ（PIF：Photo Irritation Factor, MPE:Mean Photo Effect,

＋：*in vivo* 陽性、－：*in vivo* 陰性、＋/－判定保留
PI：photoirritant、NP：non-photoirritant、NA：not available
空欄：試験実施なし、分数で示した値は異なる判定をした施設の割合

化合物名	*In vivo* data		1st validation		2nd validation		3rd validation	
	Animal	Human	PIF	MPE	PIF	MPE	PIF	MPE
Promethazine	＋/－	＋	PI		PI	PI	PI	PI
Chlorpromazine	＋	＋	PI		PI	PI	PI	PI
6-Methylcoumarin	＋	＋	PI		PI	PI		
TCSA	＋	＋	PI					
Doxycycline	＋	＋	PI					
8-MOP	＋	＋	PI					
Tetracyclin	＋	＋	PI					
Piroxycam	－	＋	NP					
Amiodarone	＋	＋	PI		PI-3/9	PI-1/9	PI-1/4	PI
Bithionol	＋	＋	PI		PI	PI-1/9	PI	PI
Neutral red	＋	＋	PI		PI	PI		
Rose Bengal（2）	－	＋	PI		PI	PI		
Cinnnamic Ald	－	－	NP					
Chlorhexidine（2）	NA	－	NP		NP-3/9	NP		
Uvinul MS40	NA	＋/－	NP					
PABA	－	＋/－	NP		NP-2/9	NP-4/9		
Penicilin G	NA	NA	NP		NP-2/9	NP-2/9		
L-histidine	NA	NA	NP				NP	NP
Thiourea	NA	－	NP					
Lauryl sulfate	NA	NA	NP					
5-MOP	＋	＋			PI	PI-1/8		
Acridine hydrochloride	＋	＋			PI	PI	PI	PI
Acridine-free base	＋	＋			PI	PI		
Anthracene	＋	＋			PI-1/8	PI-2/8	PI	PI
Bergamot oil	＋	＋			PI-4/9	PI		
Demecloycline	＋	＋			PI	PI	PI-1/4	PI
Fenofibrate	NA	＋			PI-1/8	PI-1/8		
Furosemide	NA	＋			NP-2/8	NP-3/8		
Hexachlorophene	－	＋/－			NP-1/9	NP		
Ketoprophene	－	＋/－			PI	PI	PI	PI
SLS	NA	NA			NP	NP	NP	NP
Musk ambrette	－	＋/－			PI-1/8	PI-2/8	PI	PI
Nalidixic acid Na	＋	＋			PI-2/8	PI		
Nalidixic acid	＋	＋			PI-2/8	PI-1/8		
Norfloxacin	＋	＋			PI	PI		
Ofloxacin	＋	＋			PI-1/8	PI		
Protoporphyrin F	＋	NA			PI	PI		
Protoporphyrin S	＋	NA			PI	PI	PI	PI
Tiaprofenic acid	＋	＋			PI	PI		
Octyl salicylate	－	－					NP	NP
Octyl methoxycinnamate	－	－					NP	NP-1/4
Benzilidene Camphor sulphonic acid	－	－					NP	NP
4-methyl benzilidine sulphonic acid	－	－					NP	NP
3-Benzilidine camphor	－	－					NP	NP
Terephtalidine dicamphor sulphonic acid	－	－					PI-1/4	PI-1/4
Polyacrylamido methy benzylidine-camphor	－	－					NP	NP
Benzophenon-4（2）	NA	＋/－			NP-1/8	NP-1/8	NP-1/4	NP-1/4

TCSA: 3,3'4'5-tetrachlorosalicylonilid　8-MOP：Mothoxsalen
PABA：p-Aminobenzoic acid　5-MOP：Bergapten（5-Methoxypsoralene）

Presented by Medical*Online

B. 評価された化学物質の種類と性状の適切性

B-1）被験物質のカテゴリー

論文に掲載された評価の対象となった被験物質数は44化学物質であり、以下に示す5つのカテゴリーに分類された。このうち、*in vivo*での光毒性の有無が不明だったものを除くと、紫外線吸収剤10種、香料4種、抗生物質・抗菌薬8種、抗炎症薬・鎮痛薬3種、その他の薬剤11種、その他の化学物質4種となり、計40種となる。被験物質の選択としては紫外線吸収剤の比率が高いが、これは光毒性試験の評価という観点から適切ということができる。また、それ以外は比較的広い領域から選択されていて、被験物質の選択は適切であったと考えられる。

I）紫外線吸収剤（10種）：Uvinul MS40、p-Amino benzoic acid (PABA)、Benzophenone-4、Octyl salicylate、Octyl methoxycinnamate、Benzilidene camphor sulphonic acid、4-Methyl benzilidene camphor、3-Benziliden camphor、Terephtalidine dicamphor sulphonic acid、Polyacrylamidomethyl benzilidene camphor

II）香料（4種）：6-Mehtylcoumarin、Cinnamic aldehyde、Bergamot oil、Musk ambrette

III）抗生物質、抗菌薬（9種）：Tetrachlorosalicylanilide、Doxycycline、Tetracycline、Chlorohexidine dihydrochloride、Penicillin G、Demeclocycline、Nalidixic acid、Norfloxacin、Ofloxacin

IV）抗炎症薬、消炎鎮痛薬（3種）：Piroxicam、Ketoprophen、Tiaprofenic acid

V）その他の薬剤（11種）：Promethazine（抗ヒスタミン剤）、Chlorpromazine（抗精神薬）、8-MOP（白斑治療剤）、Amiodarone（抗不整脈剤）、Bithionol（抗菌剤）、Thiourea（防腐剤）、5-MOP（白斑治療剤）、Fenofibrate（抗高脂血症剤）、Furosemide（ループ利尿剤）、Hexachlorophene（防腐剤）、Protoporphyrine IX（肝疾患治療剤）

VI）その他（7種）：Neutral red（pH指示薬）、Rose bengal（色素）、L-Histidine（アミノ酸）、Lauryl sulfate（界面活性剤）、Acridine（蛍光色素）、Anthracene（芳香族炭化水素）、Sodium lauryl sulfate（界面活性剤）

B-2）被験物質の性状

被験物質の性状という点では溶解性の観点が挙げられる。溶解性について、Phase I研究の論文では水に不溶性の被験物質については溶解補助剤としてDMSOを使用することが推奨されているが、個々の被験物質の溶解性やその試験結果に対する影響は記述されていない。(Spielman, 1994)

Phase II研究の論文では被験物質の水への溶解性を7段階に分類し、その水溶性と試験結果の不一致率に統計的に有意な相関性がないと議論している。(Spielman, 1998a) しかし実際にバリデーションの過程では各施設の使用している溶解助剤はDMSO、エタノール、リン酸緩衝液（PBS）等と統一がとれていないこと、また試験した被験物質濃度も施設間で大きく異なることから、この試験結果から溶解助剤の影響を正当に評価することは難しい。なお、この論文のディスカッション中でAcridine、Nalidixic acid、Protoporphyrin IXの3種についてはそれぞれの単体とその塩も同時に試験されており、それぞれいずれも光毒性物質として判定されたことから、PIF、MPEとも溶解性が試験結果に影響を及ぼさないと考察されている。しかし、Protoporphyrin IXについては単体とその塩の溶解性の違いについてはデータが示されていない。

Presented by Medical*Online

Phase III 研究においても被験物質の溶解性の影響が評価されていない。(Spielman, 1998b)

以上の実験結果から被験物質の溶解剤が本試験法に与える影響について我々が議論できるような被験物質の選択とはなっていないし、情報提供がなされているとはいうことができない。ただし、Phase II で用いられた被験物質の範囲では水溶性の程度が光毒性の判定に大きな影響を与えておらず、ここでの結論が溶解性の影響を含めた本試験法の性能を否定するものではない。

C. 評価された化学物質数・製品数に関する適切性

公表論文のデータをパラメーター別に *in vivo* のデータと比較した結果を Table 4-3 ～ 5 にまとめた。論文中で *in vivo* データの陽性、陰性が明確でないもの、あるいは動物試験、ヒト試験それぞれの存在が明らかでない被験物質は解析から除いた。同じ化学物質でもヒト試験結果と動物試験結果が異なる場合は、対照表（Table 4-3、4-4）では *in vivo* 判定結果は異なるものとして扱ったが、Table 4-5 ではヒト試験の判定結果を優先して結果をまとめた。

全体で評価している被験物質の数は 26 ～ 38 とそう多くはないが、評価を行う上で必要最小限のレベルには達していると考える。ただ紫外線吸収があって *in vivo* で光毒性がない化学物質の数がやや不足していると考える。紫外線吸収があってヒト試験および動物試験双方とも陰性となっている被験物質数は 7 に過ぎないため、*in vivo* で光毒性がある被験物質数 18 と比べて半分以下となる。この点は false positive を過小評価する可能性が考えられる。

また、これまでに公表された論文中では Balb/c 3T3 を用いた本 *in vitro* 光毒性試験法で製品を評価している例はなく、製品系への適切性は議論できない。

Table 4-3　論文中の *in vivo vs. in vitro* 対応被験物質数（Human *vs.* Balb/c 3T3）

Human	Balb/c 3T3	PIF	MPE
＋	＋	21	17
＋	－	2	1
－	＋	1	1
－	－	9	7
評価被験物質数合計		33	26

＋：陽性、－：陰性、数字は左 2 列で示されたカテゴリーに入る被験物質数

Table 4-4　論文中の *in vivo vs. in vitro* 対応被験物質数（Animal *vs.* Balb/c 3T3）

Animal	Balb/c 3T3	PIF	MPE
＋	＋	19	15
＋	－	0	0
－	＋	4	4
－	－	10	8
評価被験物質数合計		33	27

＋：陽性、－：陰性、数字は左 2 列で示されたカテゴリーに入る被験物質数

Presented by Medical*Online

Table 4-5　論文中の *in vivo vs. in vitro* 対応被験物質数(Human(or Animal)*vs.* Balb/c 3T3)

Human or（Animal）	Balb/c 3T3	PIF	MPE
＋	＋	22	18
＋	－	2	1
－	＋	3	3
－	－	11	9
評価被験物質数合計		38	31

＋：陽性、－：陰性、数字は左２列で示されたカテゴリーに入る被験物質数

D. 試験法の性能データに関する適切性

D-1）感度、特異性、陽性予測率、陰性予測率、一致率

前節で得られた結果を基に *in vivo* および *in vitro* の判定結果をパラメーターと *in vivo* データ別に Table 4-6 ～ 4-11 にまとめ、感度、特異性、陽性予測率、陰性予測率、一致率を計算した。この結果からは動物試験との対応性において疑陽性がやや多い傾向がある。しかし、これらの化合物にはヒト試験で陽性反応がでている Rose bengal、Ketoprophen、Musk ambrette が含まれているため、ヒト試験結果が真の光毒性を反映していると考えれば疑陽性率は必ずしも高くない。ヒト試験結果との比較で疑陰性となった３被験物質のうち２つは動物試験では陰性となっている。*In vitro* 試験の *in vivo* 試験に対する境界領域にある可能性が考えられる。

Table 4-6　*In vivo*、*in vitro* 判定対応表（Human *vs.* PIF）

Vitro ＼ Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	21	1	22
Non-phototoxic	2	9	11
Total	23	10	33

Sensitivity: 91.3%, Specificity: 90%, Positive predictivity: 95.5%,
Negative predictivity: 81.8%, Accuracy: 90.9%

Table 4-7　*In vivo*、*in vitro* 判定対応表（Human *vs* MPE）

Vitro ＼ Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	17	1	18
Non-phototoxic	1	7	8
Total	18	8	26

Sensitivity: 94.4%, Specificity: 87.5%, Positive predictivity: 94.4%,
Negative predictivity: 87.5%, Accuracy: 92.3%

Presented by Medical*Online

Table 4-8　*In vivo*、*in vitro* 判定対応表（Animal *vs*. PIF）

Vitro ＼ Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	19	4	23
Non-phototoxic	0	10	10
Total	19	14	33

Sensitivity: 100%, Specificity: 71.4%, Positive predictivity: 82.6%,
Negative predictivity: 100%, Accuracy: 87.9%

Table 4-9　*In vivo*、*in vitro* 判定対応表（Animal *vs*. MPE）

Vitro ＼ Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	15	4	19
Non-phototoxic	0	8	8
Total	15	12	27

Sensitivity: 100%, Specificity: 66.7%, Positive predictivity: 78.9%,
Negative predictivity: 100%, Accuracy: 85.2%

Table 4-10　*In vivo*、*in vitro* 判定対応表（Human（or animal）*vs*. PIF）

Vitro ＼ Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	25	3	28
Non-phototoxic	2	11	13
Total	27	14	41

Sensitivity: 92.6%, Specificity: 78.6%, Positive predictivity: 89.2%,
Negative predictivity: 84.6%, Accuracy: 87.8%

Table 4-11　*In vivo*、*in vitro* 判定対応表（Human（or animal）*vs* MPE）

Vitro ＼ Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	21	3	24
Non-phototoxic	1	9	10
Total	22	12	34

Sensitivity: 95.4%, Specificity: 75.0%, Positive predictivity: 87.5%,
Negative predictivity: 90.0%, Accuracy: 88.2%

次に感度、特異性、陽性予測力、陰性予測力、一致率を Table 4-12 にまとめた。全体として、これらの数値は特異性を除き 90％前後の値が多く、悪くない値を示している。特にヒトで陽性とされている物質を陽性する感度は PIF で 91.3％、MPE で 94.0％と高い値を示した。動物試験に対する specificity がやや低いが、前節に記載した事実からも実態として考えると疑陽性は多くないと考えられる。また PIF および MPE の 2 種のパラメーターによる違いは実験として Phase I 研究では MPE についてのデータを取らなかったということによるものであって、他の 2 つの論文で双方のパラメーターが異なる判定結果を導いた例はない。すなわち実験結果を解析する意味に

Presented by Medical*Online

おいては等価と考えて差し支えない。

Table 4-12　感度、特異性、一致率、陽性予測力、陰性予測力一覧表

	vs. Human		*vs.* Animal		*vs.* Human (or animal)	
	PIF	MPE	PIF	MPE	PIF	MPE
Sensitivity	91.3 (21/23)	94.4 (17/18)	100 (19/19)	100 (15/15)	92.6 (25/27)	95.4 (21/22)
Specificity	90.0 (9/10)	87.5 (7/8)	71.4 (10/14)	66.7 (8/12)	78.6 (11/14)	75.0 (9/12)
Positive predictivity	95.5 (21/22)	94.4 (17/18)	82.6 (19/23)	78.9 (15/19)	89.2 (25/28)	87.5 (21/24)
Negative predictivity	81.8 (9/11)	87.5 (7/8)	100 (10/10)	100 (8/8)	84.6 (11/13)	90.0 (9/10)
Accuracy	90.9 (30/33)	92.3 (24/26)	87.9 (29/33)	85.2 (23/27)	87.8 (36/41)	88.2 (30/34)

括弧の中の数字はそれぞれ該当する被験物質数

E. 試験法の有用性に関する結論とその科学的妥当性

1）臨床との関連性及びヒトへの予測性

ヒトへの対応を考えた場合、本試験法は若干偽陰性が多い傾向にあるが、予測性全体としては十分許容内にあると考えられるため、光毒性の hazard identification を行うために有効であると考える。しかし、全体として評価した被験物質数は十分とはいえない。特に *in vivo* で陰性と判定される物質について検討が不足している。本解析では *in vivo* データの存在が明らかでないことから、Phase I 研究で紫外線吸収がなく光毒性がない被験物質に分類されている 3 種の化学物質（Penicilin G、L-Histidine、Lauryl sulfate）を除いているため、これも解析を行った被験物質数を減らしている一因となっているが、それを含めても被験物質数が少ないと考えられる。今後さらなる検討をするのであれば、紫外線吸収性で非光毒性である化合物の中にどのくらいの疑陽性が含まれるかを追加検討することが望ましい。

また論文中の記載についても不明瞭な部分があるため、今回の解析が妥当であったかどうか判断できない部分もあった。例えば Thiourea は紫外線を吸収しないにもかかわらず光感作性があると分類されているが、これが妥当な分類であるのか、cinnamic aldehyde は中程度の感作性を持つが、これを紫外線吸収性の非光毒性物質として分類して良いのか、あるいは PABA は光感作性物質だが、非光毒性として扱って良いのか等のあいまいな点も多い。これらはヒト試験のデータソースを既存公表文献に依存いるために起きてくると考えられる。現実的な問題として光毒性を生じるというヒトデータは臨床試験から得られることが多く、この意味では光毒性がないというヒト試験データはやはり少なくならざるを得ないだろう。これは今後のバリデーションスタディのヒトデータとの相関性を見る場合のデータソースをどうするかという課題にもつながる。

F. まとめ

・Balb/c 3T3 細胞を用いた Neutral red 取り込みによる光毒性試験の感度、特異性、陽性予測力、陰性予測力、一致率は 90％前後の値であり全体として高く、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効である。特にヒトで陽性とされている物

Presented by Medical*Online

質を陽性とする感度はPIFで91.3%、MPEで94.0%と高い値を示したことは本試験法をスクリーニング法として用いることの妥当性を示している。

・使用されている2つのパラメーター（PIF、MPE）に予測性の点からの差異は認められなかった。

被験物質の水に対する溶解性の判定に結果及ぼす特異的な影響については評価できないが、プロトコールの範囲で使われる溶解助剤を用いた判定結果は大きくは変動しなかった。

引用文献

Spielmann, H. Balls, M., Brand, M., Döring, B., Holzhütter, H. G., Kalweit, S., Klecak, G., Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W. J., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., Willshaw, A. (1994) EEC/COLIPA Project on *In Vitro* Phototoxicity Testing：First Results Obtained with A BALB/C 3T3 Cell Phototoxicity Assay, Toxicology *in Vitro* 8, 793-796.

Spielmann, H. Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., Brantom, P. (1998a) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study：Results of Phase II (Blind Trial). Part 1：The 3T3 NRU Phototoxicity Test, Toxicology *in Vitro* 12, 305-327.

Spielmann, H. Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Pfannenbecker, U. (1998b), A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, ATLA 26, 679-708.

4-2-2-3）試験法の信頼性

担当：小島肇夫、金子豊蔵

A. 試験の信頼性は、試験方法の評価に当たり最も重要な点である。開発された試験方法が、生体毒性検出における作用機構の解明に有用で、操作性、経済性に優れたスクリーニング試験方法であり、さらに代替法として動物やヒトに対する毒性検出に優れた試験法であったとしても、試験の再現性が明確でなければ信頼性の高い方法であるとは言えない。その信頼性を把握する上で、バリデーション試験の再現性を物質毎に施設内、施設間で比較することが一般的である。このデータの解析には、変動係数や散布図、箱ヒゲ図などの統計手法を用いて評価されるが、どのような評価基準で判断するかは統計学者により意見が分かれるところである。物質の毒性強度や特性によっても値は異なり、ケースバイケースの対応が必要と考えられる。

本章では、EC/COLIPAで光毒性検出のためにPhase ⅠからⅢまで3段階で実施されたBalb/c3T3細胞を用いたNeutral red取込み試験のバリデーション研究結果が記載されているSpielman *et al*の文献（Spielmann *et al*., 1994, 1995, 1998a, 1998b）に基づき、バリデーション研究における試験法の信頼性について、種々の視点からまとめた。ただし、本来、施設毎の生データを解析することにより、再現性を調べることが常道であり、これがもっとも重要な点であると考える。今回は残念ながら、以下に示す4報の文献結果からの解析であり、その評価に限界があることを認識する必要がある。

Phase Ⅰ

・EEC/COLIPA Project on *In Vitro* Phototoxicity Validation Study：First Results Obtained with a BALB/C 3T3 Cell Phototoxicity Assay, H. Spielmann et al., Toxicology *in Vitro* 8(1994) 793-796.

Presented by Medical*Online