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

・EEC/COLIPA *In Vitro* Phototoxicity Program：Results of the first Stage of Validation, H. Spielmann *et al.*, Elsner P, Maibach HI(eds)：Irritant Dermatitis, New Clinical and Experimental Aspects. Cuur Probl Dermatol. Basel, Krager(1995) 23, pp.256-264.

Phase Ⅱ

・The International EC/COLIPA *In Vitro* Phototoxicity Validation Study：Results of Phase Ⅱ (Brind Trial). Part 1：The 3T3 NRU Phototoxicity Test, H. Spielmann *et al.*, Toxicology *in Vitro* 12(1998) 305-327.

UV filter

・A Study on UV Filter Chemicals from Annex Ⅶ of European Union Directive 76/768/EEC, in the *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, H. Spilmann *et al.*, ATLA 26(1998) 679-708.

B. 施設内再現性

施設内の複数回の濃度依存曲線が記載されたデータは、Phase Ⅱの報告（Spielmann *et al.*, 1995）の Fig.4 に示された施設 9 の結果のみである。参加 9 施設の内、なぜこの施設のグラフを用いたか不明である。一般的に考えれば、著者の施設またはもっとも再現性の高かったデータが公表されるであろうと考えられる。この結果を見る限り、Chemical No.15（Hexachlorophen）を除き、施設内の再現性は高いと思われる。Phase Ⅰにおいては、Spielmann *et al*（1994）や Spielmann *et al.*,（1995）の報告に一機関のみの IC50 が記載されている他は、すべて PIF や MPE に変換された数値となり、IC50 を見ることができない。変換された数値でも Phase Ⅱまでは、施設内の繰り返しデータが記載されていない。

Phase Ⅲの報告（Spielmann *et al.*, 1998a）では、4 施設の 2 回の結果が書かれている。それぞれの数値を見る限り、PIF が 3 倍を越える物質は 4 施設、20 被験物質、計 80 データの内、施設 1 の No.11（Protoporphyrin IX disodium）666.67 と 109.59、No.18（Demeclocycline hydrochloride）57.33 と 393、施設 3 の No.13（Anthracene）19.01 と 69.69 と悪い結果は少ない。

これらの結果と過去の試験経験から、本試験における施設内再現性は高いと考えられる。しかし、論文の結果からのみでは、施設内再現性を正確に判断できない。

C. 施設間再現性

施設間の再現性については、Phase Ⅰにおいて Irritant Dermatitis（Spielmann *et al.*, 1995）に箱ヒゲ図にて記載されている（Fig.4-1）。施設間のバラツキの 95％信頼限界の幅が 5 倍を越えた物は promethadine のみであり、全体的なバラツキは小さいと考える。しかし、得られた結果の最大値と最小値で比較すると、20 被験物質中 6 物質（No.7：Tetracycline、1：Promathazine、12：Rose bengal、4：TSCA、10：Bithionol、17：Penicillin G）の最大値、最小値の差が大きいと考える。施設によっては、光毒性判定に戸惑う物質（No.9：Amiodarone、10：Bithinol、13：Cinnamic aldehyde）が 3 つはあり、その中でばらつきの大きい No.10 の判定が施設により分かれていると考えられる。

Phase Ⅱの Toxicology *in Vitro*（Spielamnn *et al.*, 1998）による物質毎のデータのバラツキを示す CV（Classification variabirity：変動係数にあたる coefficients of variation ではない）値は PIF で最高 18.8％、MPE で 20％である。値としては、大きくない。しかし、これは数字が求まったもののみの変換値より求めたものであり、IC50 の値ではない。PIF や MPE を求める段階で、紫外線照射の有無における IC50 のバラツキが非顕在化されている可能性もあるが、この論文の Table 3 において数字が求まっていない結果を見る限りでは、逆に紫外線未照射の IC50 が求まらないものとして計算に利用していることもあり、バラツキはより大きいと考える。これは、PIF が評価

Presented by Medical*Online

基準の5を越えるか否かを判断材料としているためか、紫外線未照射のIC50を真剣に求めようと考えていないことにより、最高濃度を十分に上げないことに起因するのではないかと考える。PIFに絞ってみても、約半数の物質において、他の施設の結果から飛び離れた値が現れている。論文のFig.5からもわかるように、AnthraceneやMusk ambretteのようにバラツキが大きく、評価に影響している物質もある。

論文中でも、この原因は溶媒や設定濃度の問題、プロトコールの不備によるものと記載されているものの、すべての施設が誤評価する物質は試験の特性で済まされるが、1～3施設による誤評価を見過ごしていいものか疑問である。

これらの点を考慮して実施されたPhase Ⅲである、UV filter物質のみを用いた試験（Spielman *et al.*, 1998a）では、施設内より施設間において変動係数（coefficients of variation）が悪いとされている。もっとも、この論文ではdata variabilityを問題にしていないと記載されている。この記載の意味は不明である（我々は大変重大な過失であると思うが…）。論文のTable Ⅲでは、PIFが大きく（光毒性物質である）、その差が施設間で10倍以上であるNo.11（Protoporphyrin IX disodium）、13（Anthracene）、18（Demeclocycline hydrochloride）、20（Musk ambrette）のデータに問題を感じる。また、Fig.2を見る限りでは、施設1（No.1：Octyl salicylate、2：Octyl methoxycinnamate、7：Polyacrylamidomethylbenzylidene camphor、18：Demeclocycline hydrochloride）及び施設2（No.1、11、14：Acridine hydrochloride、18）のPIF、MPEのバラツキが10倍以上である。

以上の結果から、変換された数字による評価では、施設間の再現性は正確に把握できない。しかし、この数字を用いて結論をつけるならば、施設間の再現性は低いという印象がある。その原因も抽象的で、具体的には記載されておらず、たぶんデータ検討会やマネージメントチーム（MT）では議論されたであろうが、論文のみの評価ではこれ以上は無理であると感じられる。

D. 対照物質の再現性

論文中には、対照物質については記載されていない。OECDガイドラインドラフトにはChloropromazineを陽性対照とする記載がある。この物質はヒトにおける光毒性が明確であるとともに、本試験法でも紫外線照射の有無で明確な細胞毒性を示すこと、水溶性であり、扱いやすいことなどを考慮し、選ばれたと考えられる。この結果の再現性については、他の物質とともに次に示す。

E. 予測モデルによる評価結果の再現性

SLS、Promethazine、Chloropromazine、Aminodarone、Bithionolの5物質が3回のバリデーションにおいて共通物質として検討されていることから、これらの物質のデータから評価結果の再現性を検討した。光毒性物質によっては、施設によるバラツキ大きいが、被験物質の中ではいずれもPIF値が落ち着いている。SLSの結果は極めてバラツキが小さい。ただ、これもPIFであり、試験毎のSLSのIC50のバラツキはわからない。

F. 動物実験やヒト実験に対する *in vitro* 試験の再現性と信頼性

動物実験のバラツキが不明であることから、再現性を比較できない。ただ、施設内の動物実験の結果は、過去の経験からバラツキは大きくないと考える。これも施設内での比較データを検証したことがないため不明である。

また、結果を見る限り、動物実験によるヒト予測性は高い。明確なデータの食違いは、動物陰性でヒト陽性のRose bengalのみである。

信頼性を確認するため、本試験と *in vivo* 試験の不一致数を調べてみた。Phase Ⅱにて、3施設以上（3/11：27％）食い違った被験物質数はPIF（Table3）（Spielmann *et al.*, 1998a）で4物質（Chlorohexidine dihydrochloride, Furosemide, Bergamot

Presented by Medical*Online

Table 4-13　PIF の推移

被験物質名	Phase I の PIF ( )：データ数	Phase II の PIF ( )：データ数	Phase III の PIF ( )：データ数	光毒性
SLS	平均 1.5（14）	1.2, 1.6, 1.0, 1.2, 1.3, 1.0, 1.2, 1.5, 1.1（9）	1.78, 1.22, 0.93, 0.98（4）	NP ＊
Aminodarone	平均 6（9）	5.2, >2.7, 3.3, 7.7, 1.8, 14.9, 9.2, 1.6, >2.4 (9)	11.37, 12.61, 3.08, 7.07（4）	PI**
Bitionol	平均 7（13）	10.1, 59.8, 9.2, 7.2, >12.2, 13.2, 7.9, 16.7, 6.1 (9)	24.53, 17.97, 11.98, 11.14（4）	PI
Chlorpromazine	平均 46.6（13）	21.8, 42.7, 26.7, 60.9, 20.2, 35.3, 308.2, 18.9, 28.4 (9)	65.29, 38.40, 24.93, 19.02（4）	PI
Promethazine	平均 78.5（13）	17.3, 86.2, 53.1, 44.8, 13.6, 24.0, 47.5, 20.5, 496.6 (9)	72.41, 196.27, 29.18, 27.39（4）	PI

＊ NP：非光毒性物質、＊＊ PI：光毒性物質

oil, Amiodarone,4/29：13.8％)、MPE（Table5）（Spielmann *et al.*, 1995）で 2 物質（Hexachlorophene, Chlorohexidine dihydrochloride , 2/29：6.9％）であり、光毒性の有無の判定での相違が起こる確率は少なかった。なお、これを両方の指標で判定し、conservative な立場から強い方を採用して判定すれば、MPE で 2 物質（2/29：6.8％）の判定の間違いということになる。また、Phase III では、4 施設しか参加していないことから、2 施設以上（2/4：50％）食い違った物質は、PIF、MPE とも 1 物質（Tetraptalidene dicamphor sulphonic acid）のみであり（Table III、IV）（Spielmann *et al.*, 1998a）、光毒性の有無の判定での相違が起こる確率は少なかった。

さらに、*in vivo* との真度（accuracy）を用い場合、Phase II II では、PIF で 88％（219/256（Table4）（Spielmann *et al.*, 1995）、MPE で 92％（227/256（Table6）（Spielmann *et al.*, 1995）であった。Phase III III でも、PIF で 93％（74/80）、MPE で 94％（75/80）（Table V）（Spielmann *et al.*, 1998a）と高い数字を認めた。この数字をみると、MPE, PIF 値の施設による差は大きい場合もあるが、間違った評価をする確率は 1 割ほどであり、試験法の光毒性の有無の予知に関する信頼性は高いと判断できる。

G. 結論

施設内の再現性は高いが、施設間の再現性は高いとは言えない。しかし、バラツキが大きいからといって、*in vivo* 試験との一致性が低いわけではなく、被験物質毎の不一致率や真度を見る限り、信頼性は高い試験方法であると思われる。

H. その他

繰り返しになるが、信頼性の評価は論文の表や図からはできない。生データの存在

Presented by Medical*Online

が不可欠である。また、そのデータをどのように扱うかを検討したデータ検討会やMT会議の議事録からバリデーション研究のレベルを把握できる。生データの記録のない論文のみによる評価は、今後実施すべきでないと考える。

I. 要望

施設間のバラツキが大きく、弱い光毒性物質の評価には慎重な取り扱いを要する。このバラツキにより施設によっては誤った評価をする場合がある。Spielmann *et al* の論文（Spielmann *et al.*, 1995）の Table 4 から、PIF を用いた場合、false positive 数 8/45 はともかく、false negative 数 21/203 は多すぎると思われる。しかし、このうち 7 例は *in vivo* での光毒性が陽性であるとされた報告に問題がある可能性が強い Furosemide についての結果であること、3 例は MPE 法では 9 施設中 1 施設を除き、いずれも陽性と判断された非水溶性である Nalidixic acid-free acid であったこと、2 例は同様に MPE 法ではいずれの施設でも陽性と判断された Ofloxacin の結果であったことから、両者を合わせて評価することが望ましい。また、強い光毒性物質である Anthracene について 2 施設がいずれの方法でも false negative となったがこれらの施設では EBSS を溶媒として用いていることによるものと思われたことから、溶媒の選択などの試験プロトコールや評価基準の見直し（グレーゾーンがあっても良い）が必要ではないかと考える。

引用文献

Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L' Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T. F., Moldenhauer, F., Moore,L., Papa, W.J.W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and 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., Liebsch, M., Pape, W.J., Balls, M., Dupuis, J., Klecak, G., Lovell, W.W., Maurer, T., De Silva, O. and Steiling, W. (1995) EEC/COLIPA *in vitro* photoirritancy program：results of the first stage of validation, *Curr Probl Dermatol*, 23, 256-264

Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Papa, W.J., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, R., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J.M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and 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., Papa, W.J., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell W.W., and 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.

Presented by Medical*Online

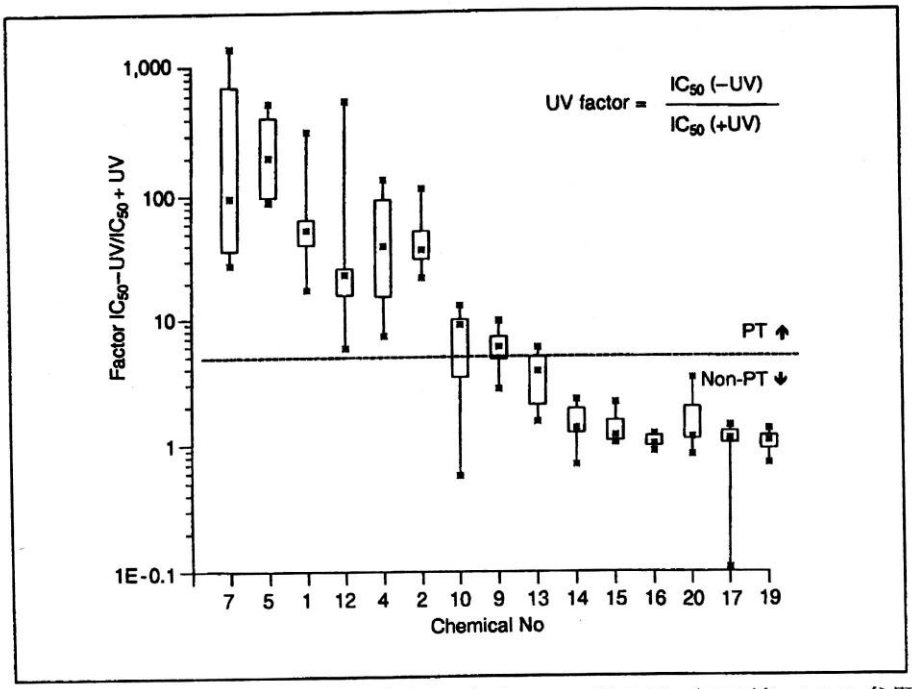

Fig 4-1　3T3-NR 法における光照射の有無による IC50 値の比（PIF 値 , 4-2-3 参照）のバラツキ（H. Spielmann *et al*. 1995）

4-3）3T3-NR 法以外の方法について

担当：岡本裕子

Balb/c 3T3 細胞を用いた光刺激性試験代替法以外の *in vitro* 光毒性試験法について文献調査を実施した。その結果、現在までに報告されている *in vitro* 光毒性試験法は、スクリーニングを目的とした試験法では細胞や微生物等の致死や増殖阻害等を指標とした評価が主体であり、細胞の種類、培養形態や毒性の指標について様々な試験法が評価されている。また、メカニズム評価に重点を置いた試験法では、光毒性の発現メカニズムの考察から光毒性反応の標的と想定される、生体膜の損傷、タンパク質に対する作用を評価する試験法が報告されている。さらに、光毒性反応に対する分子状酸素の関与が高いことから、脂質の過酸化反応を評価する方法や発生する活性酸素種を化学物質で捕捉する方法等が報告されている。また、一方で、*in vivo* 光毒性結果との対応性を高めるため、メカニズムの異なった試験法を組み合わせて評価する（battery）方法が報告されている。現在までに報告された各試験法の概要についてまとめた。

4-3-1）各種 *in vitro* 光毒性試験法のまとめ（文献調査）

文献調査の結果から得られた各種 *in vitro* 光毒性試験法について、スクリーニングを目的とした試験法及びメカニズム評価に重点をおいた試験法について、以下の 7 つの項目に分類した。

4-3-1-1）単層培養細胞を用いた試験法（Table 4-14）

単層培養細胞を用いた *in vitro* 光刺激性試験法は、主にスクリーニングを目的として評価されている。使用している細胞は、すべて哺乳類由来の細胞であり、fibroblasts（Freeman *et al*.,1970, Lasarow *et al*., 1992, Traynor *et al*., 2000）、keratinocytes（Maier *et al*.,1991, Clothier and Willshaw,1999, Wilhelm *et al*,2001）、

Presented by Medical*Online