Altern. Animal Test. EXperiment. 10 (2), 126- 132 (2004)

第6章　まとめ

担当：大野泰雄

文献的情報およびZEBETより提供された個別データに基づいて光毒性試験とその代替法について調査した。その結果は以下のように要約できる。

6-1）動物での光毒性試験について

*in vivo*で光毒性を評価する方法については、かなり古くから研究がなされてきたが、ガイドラインとして正式に認められたものは未だ存在していない。この理由としては動物愛護運動への配慮もあるが、古くから様々な試験法が検討されてきたため、一つの試験法に集約すること、もしくは一つの試験法を選択することが困難なためと考えられる。しかし、経皮投与による試験法についてはモルモットを用いた森川らの方法（1975）を基礎とした方法が化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブックに記載され、化粧品および化粧品原料の光毒性評価に広く用いられており、大枠のコンセンサスが得られていると考えられる。動物を用いる最新の光毒性評価法としてはOECDガイドライン案が提案されている。このガイドライン案は「Acute Dermal Photoirritation Screening Test」と「Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test」の2部から構成されている。動物福祉の観点から無用な試験の実施を避け、また強刺激性物質の試験を最小限にすることに重点が置かれている。これらの方法は、施設内の再現性は高いと考えられるが、試験法の施設間バリデーションは実施されていないため、施設間の再現性については考察できない。また、ヒトと動物との結果の対応性に関する情報は充分とは言えず、*in vivo*光毒性試験についてfalse positiveやfalse negativeの頻度についての考察は困難である。

6-2）*In vitro*光毒性試験一般について

*in vitro*で光毒性を評価する方法には単層培養細胞を用いる方法や培養皮膚モデルを用いる方法、溶血性試験、蛋白変成試験など様々な方法が試みられている。しかし、施設間バリデーションが実施されたものは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する光毒性試験方法（3T3-NR法）のみである。この方法は96ウェルプレートに播種したBalb/c 3T3細胞を被験物質で60分間前処理後、50分間光照射した後、新鮮な培地に交換し、更に24時間培養した後、ニュートラルレッド取り込み法により細胞毒性を検討するものである。一般に、この3T3-NR法には次のような長所および短所があげられる。

長所：

Ⅰ）験法が比較的簡単である。
Ⅱ）細胞播種して結果が得られるまで3日という短期間で試験が終了する。
Ⅲ）96ウェルプレートを用いるので、インキュベータのスペースをとらない。
Ⅳ）マイクロプレートリーダを用いて測定するので、測定が簡単である。
Ⅴ）再現性の高い安定した結果が得られる。
Ⅵ）バリデーションの結果より、OECDガイドライン案ではBalb/c 3T3細胞を推奨しているが、原理的にはどのような細胞でも用いることができる。

短所：

Ⅰ）太陽類似光の光源の種類によって波長特性が異なる為、化学物質との光化学反応や毒性として発現してくる生物学的な反応も変ってくる。そのため、ランプの波長特性を予め把握しておくと同時に、その試験条件下での細胞毒性の発現について十分な背景データをとっておく必要がある。
Ⅱ）UV測定器についても同様に、UV強度を検出する為の波長ウィンドウがメーカー

Presented by Medical*Online

によって異なっており、エネルギー値のみで照射条件を設定することは危険である。

Ⅲ）緩衝液に溶けないような被験物質については、正確なデータを得にくい可能性がある。

Ⅳ）現時点では代謝活性化の過程を含む光毒性試験が組めない。

Ⅴ）光毒性の有無を定性的に判断するための試験系であり、生体での用量・濃度反応関係については必ずしも評価できない。

6-3）3T3-NR 法の施設間バリデーションについての Spielmann らの報告結果について

6-3-1）バリデーションデータの質について

3T3-NR 法についての EU/COLIPA による施設間バリデーションの報告データの信頼性について Spielmann らの文献報告から検討した。その結果、比較的データの質に関係する情報が記述されていた Phase II 試験の報告を除き、OECD で示された代替法のバリデーション基準（1996）を満足しているか否かを判断するために必要な情報が十分に提供されているとは言えなかった。なお、文献レベルでのバリデーション研究の質を評価する一つの方法として、データの質に関する記述がどこまで記載されているかをチェックするためのチェックリストを作成した。もちろん、このようなチェックリストを用いたとしても、文献のみによる質の検討には限界がある。別途、詳細なバリデーションデータ情報を入手して再評価する必要があると考えた。そこで、Dr Spielmann に依頼して、バリデーションデータを入手し、個別データのレベルから論文データの質を検討した。その結果、論文データの裏付け、用量作用曲線の検討、及び評価結果の施設間のバラツキに関する基礎データを得ることができた（補足 1）。

6-3-2）被験物質の選択について

評価の対象となった被験物質数は 44 化学物質であり、*in vivo* での光毒性の有無が明らかであったものとしては、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 種であった。紫外線吸収剤の比率が高いが、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。水溶性の低い被験物質について、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。しかし、被験物質の溶解剤などが 3T3-NR 法に与える影響について充分議論できるようなプロトコールとはなっていない。

6-3-3）*in vivo* 試験結果との対応性について

In vivo 試験結果との対応性として、我々は 3 つの研究のデータをまとめて、*In vivo*（ヒト、動物）と予測モデル（PIF、MPE）の結果との関係を検討した。文献に記載された被験物質について、1）論文間での重複を避ける、2）塩部分のみ異なる場合は同じ物質とする、3）*in vivo* データが明確に示されているもののみ採用するという条件で吟味したところ、採用できた有効被験物質数は、26 ～ 38 であった。これらについて、評価指標として、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率を求めた。この結果、ヒト試験を優先した場合のヒトまたは動物の結果と PIF の関係は、感度 91.6%、特異度 78.6%、陽性予測力 88.0%、陰性予測力 84.6%、一致率 86.8%であり、MPE では、感度 94.7%、特異度 75.0%、陽性予測力 85.7%、陰性予測力 90.0%、一致率 87.0%と全体として高かった。この結果から、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効な試験法であると思われる。特にヒトで陽性とされている物質を陽性とする感度が PIF で 91.6%、MPE で 94.7%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

Presented by Medical*Online

ている。また、2つのパラメーター（PIF、MPE）を併用することにより巾広い薬物について光毒性の程度についての数値データが得られ、また、false negative を減らすことができ、評価に有用であると思われた。

なお、6-4）で示した様に、ZEBET より提供された個別データの解析から施設間の評価の食い違いの多くが技術的なものによることが確認された。プロトコールを改善し、それに従って適切に試験を遂行することにより、更に誤評価が減るものと考えられた。一方、光毒性陽性物質として用いた furosemide の評価結果のばらつきは技術的なものとして説明できなかった。しかし、furosemide の光毒性は 1985-1990 年にドイツ、オーストリア、スイスの光パッチテストグループが行った臨床試験で陰性であったこと（Holzle *et al.*, 1991）、また、公開シンポジウムの席で、furosemide による臨床での光毒性はアレルギーによるものであるとの指摘が臨床医師よりなされたことから、バリデーションで急性の光毒性陽性物質として furosemide を用いたのは適切では無かったと考えられる。

6-3-4）3T3-NR 法の信頼性について

信頼性については、報告により記載が様々であった。施設内再現性については、UV Filter に関する Phase Ⅲ研究結果から評価することが望ましいと思われる。この研究は 4 つの施設で 20 物質を評価しており、報告には各施設で行われた 2 回の試験について個々の用量反応曲線から算出された PIF、MPE の値がそれぞれ記載されている。2 つの PIF 値の比でみた場合、3 倍を越える物質は、のべ 80 物質中わずか 4 物質であり、施設内再現性は悪くなかった。

施設間再現性については、それぞれの研究で評価方法が異なっている。Phase Ⅰ研究では施設毎に得られた PIF 値を被験物質毎に集計して箱ヒゲ図で示された。その結果は 95％信頼限界の幅は 15 物質中 1 物質を除き比較的狭いが、最大値と最小値の間に 10 倍以上の大きな差のある物質が 6 個と多いことを示している。Phase Ⅱ研究では、得られたデータを復元抽出することにより用量反応曲線を繰り返し再現し、その変動を評価する CV（classification variability）という指標を用いて評価されている。11 施設で 30 物質を評価した Phase Ⅱ研究では、CV の最高値は、PIF で 18.8％、MPE で 20.0％となっており、それほど大きな値とはなっていない。一方、UV Filter に関する Phase Ⅲ研究では、測定されたデータを施設間、実験間、繰り返しの 3 つの要因に分け、変動係数が評価指標とされている。この係数も CV（coefficients of variation）として標記されているが、Phase Ⅱ研究の CV とは本質的に異なる指標である。UV Filter 研究では、施設間と施設内の CV が比較されており、一般に施設内の値に比べ、施設間の値の方が大きかった（PIF、MPE のいずれも最高値は約 200％であった）。物質によっては、PIF や MPE の値が 10 倍以上異なるものもあった。したがって、PIF や MPE の値をもとに評価した場合、施設間再現性は低いと思われる。一方、これらの指標とは離れて、光毒性の判定の食い違いに注目した場合、施設により食い違いが生じた被験物質の数は、11 施設で評価された Phase Ⅱ研究では、判定不能とされた 1 物質を除いた 29 物質中 PIF で 13 物質、MPE で 11 物質である。このうち、3 施設以上食い違ったのは PIF で 3 物質、MPE で 1 物質であり、それ以外の場合、判定に食い違いを生じた施設数は 11 施設中の 2 施設以下であった。また、4 施設で評価された Phase Ⅲ研究では、判定の食い違いが生じた被験物質の数は、20 物質中 PIF で 4 物質、MPE で 3 物質であった。以上の結果から、この結果は、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、PIF や MPE の値レベルでの施設間の再現性は高いとは言えないが、光毒性の判定の施設間再現性という観点からは、再現性を有する試験法であると思われる。

即ち、PIF や MPE の値のバラツキが光毒性の予測性に大きな影響を与えている場合は少ないが、施設によって他施設とかけ離れた値が得られたということである。

本来、再現性を調べる場合、施設毎の生データをもとに解析するのが常道であり、

Presented by Medical*Online

これがもっとも重要な点である。そこで、今回の結果についてもその後ZEBETよりバリデーションの個別データの提供を受け、施設による評価の相違の原因についての検討を実施した。その結果、furosemideの場合を除き、一部の施設のみ他者とかけ離れた用量作用曲線を示している場合が多いことが確認され、大きなバラツキの現れた事例のほとんどが技術的な原因によると推定された（補足1）。

6-3-5）文献情報に基づく総合評価

以上より、文献上に記載された要約指標の値に基づき総合的に判断した場合、3T3-NR法は、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率は特異度を除き90％前後と高く、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り、かつ結果の判定の観点からはある程度の施設間再現性を有する試験法であると言えるだろう。

なお、文献上からの評価では生データやバリデーションにおけるデータ検討会やmanagement会議の議事録等によるデータの確認はできない。したがって、データの質を十分に確かめることはできない。また、3つの文献で評価された物質数は決して多くはなく、偽陽性が高めになる可能性があることを考慮すると、本方法のみで光毒性の有無を判定することにはリスクがあると思われた。そこで、次項に示したようにDr. Spielmannよりバリデーションデータのパッケージの提供を受け、論文データと判定能力の確認および評価結果のバラツキの要因について検討した。

6-4）Dr. Spielmannより提供されたEU/COLIPAのバリデーションデータ集による検討

Dr. Spilmannより直接入手したデータパッケージによる論文データの確認と評価結果のバラツキの要因について検討の結果、Phase IIおよびPhase IIIのバリデーションに関する論文データを確認することができた。一方、PIF値とMPE値の論文データとの整合性を調べたところ、PIF値については若干数値が異なっていたもののほとんど同じ結果が得られていた。また、転記ミスと思われる相違が一点認められた。一方、MPE値に関しては大きな差が認められた。これらの値の相違の理由については用量作用曲線推定のためのソフトが更新されたこと、及びMPE値計算のために使用した測定点数が提供データでは多くとったことによることが確認された。

また、提供されたデータファイルから、実施された全ての試験結果を用い、評価結果を*in vivo*光毒性試験結果と比較したところ、MPE値による評価では偽陰性が6.30％，陽性物質をprobableとしたものが1.68％，偽陽性が10.58％，陰性物質をprobableとしたものが1.17％，陰性物質を正しく陰性と評価したものが83.52％，陽性物質を正しく陽性としたものが91.17％であった。PIF値による評価ではそれぞれ9.24％，8.40％，2.35％，4.7％，88.23％，81.51％であった。このようにデータファイルからの評価によってもその結果は論文での評価とほとんど同じ結果であり、3T3-NR法が光毒性を予測する能力が高い事が確認された。

一方、被験物質による濃度－細胞毒性曲線が施設により大きく異なっている場合が多く認められた。これらは光毒性の判定に影響を与えた可能性があり、本試験に関する実際の試験に従事する者への技術教育が重要であることが示された。

光毒性の有無に関して誤判定の現れた理由についての検討では、多くの場合1施設のみが、かけ離れた用量作用曲線を示したために生じたことによる誤判定であることが明らかになった。この原因として、被験物質の水溶解性が判定に影響を及ぼした可能性について検討したが、水溶性の低い物質の取り扱いに関する技術的なミスによるものと思われる場合もあったが、水溶性の高い物質についても誤判定が認められ、被験物質の水溶解性のみが原因とは考えにくかった。また、furosemideに関しては半分近くに施設で偽陰性となっていたが、データからはその原因を判断できなかった。

また、OECDのガイドライン案に示されたグレイゾーン（probable phototoxicity）

Presented by Medical*Online

の設置の効果についてはこの設置により false negative を完全になくすことはできなかったが、19 件から 14 件へとかなり減少することが判明した。

6-5）*in vivo* 光毒性に関する文献調査

Dr. Spielmann らのバリデーションで用いられた被験物質の光毒性に関して確認のための文献調査を行った。特に、Furosemide が false negative になった施設が多かったことに関連して、*in vivo* で光刺激性を示した論文について検討した。即ち、Selvaage & Thune はヘアレスマウスで陽性であると報告している（Selvaage & Thune *et al.*, 1997）。また、Mauget-Faysse らは Furosemide が強い光を浴びたヒトに起きた眼毒性の原因物質の可能性があるとしており（Mauget-Faysse *et al.*, 2001）、furosemide が *in vivo* で光毒性を示す可能性を否定することはできなかったが、ドイツ、スイス、及びオーストリアの医師によるヒト光パッチテスト結果（Neumann *et al.*, 2001）では陰性であったと報告されている。一方、*in vitro* 実験で Vargas *et al*（1998）は Furosemide の光照射により一重項酸素を生ずること、また、溶血と脂質過酸化反応を起こすことを示しているが、末梢白血球細胞系では陰性であったと述べている。このように furosemide の光毒性に関しては *in vivo* および *in vitro* いずれにおいても試験系により、また報告により相違があり、その理由については今後の検討課題と思われた。但し、その後公開シンポジウムの席で専門の臨床医師より、臨床的に認められるのは光アレルギーであることが指摘された。これ以外の被験物質については neutral red を除き、文献等でそれらの光毒性を確認することができた。

6-6）3T3-NR 法の受け入れに関して

新しい試験法を行政的に受け入れる際には試験法の普及性、若干の修正に対する頑健性、教育訓練及び専門性の必要性、必要な装置や材料の入手の容易さ、コストとそれに見合う有用性、試験法導入に要する時間、動物愛護の立場から 3Rs の面からの妥当性等について考慮する必要がある。今回検討した 3T3-NR 法はこれらの点でほぼ満足できるものである。この方法は動物実験代替法の側面以外にも、時間的、経済的な面から有利な点も多く、本実験方法がリスクとベネフィットのトータルバランスの点からも優れたものであると考えられる。

今回の光毒性試験の導入で大きな問題は光源である。どのような光源が妥当であるかについてはさらに検討を加えなければならない。光毒性試験を普及させるためには、色々なメーカーの光源についてデータを蓄積する必要がある。

なお、光毒性試験は化粧品のみならず、医薬品や医薬部外品、また、一般化学物質の安全性評価に必要である。また、局所作用のみならず全身的作用、複合作用や代謝による影響などについても十分配慮する必要性も大きい。そのための諸因子を含めた幅広い *in vitro* 実験方法の開発について要望するものである。

6-7）推奨する試験プロトコールについて

Balb/c 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法による光毒性試験はヒトや動物の光毒性データとの対応や施設間での再現性も良く、光毒性の評価に有効である事が示された。一方、使用する細胞の種類や光源等、必ずしもガイドライン案で示された方法で試験が可能であるとは限らない。そこで、基本的にはこの OECD のガイドライン案に準じた試験法を、データの信頼性を損なわないと思われる範囲で照射条件や用いる細胞株、試験の方法などに自由度を持たせて改変した方法を標準的試験プロトコールとして提案した。

なお、今後の課題として以下の点が指摘される。

① *in vivo* において光刺激性発現の場は皮膚であることを考慮すると、皮膚細胞の活用や測定指標（Neutral red の取り込み）の見直しが必要となるかも知れない。

Presented by Medical*Online

②評価パラメーターであるOECDのガイドライン作成段階で設定されたPIFやMPEのcut-off値の妥当性については実際にはバリデーションが実施されていない。これについては今後のデータの蓄積により再検討が必要となるかも知れない。

③代謝活性化については検出感度向上の観点から将来検討すべきと考えられる。

④bergapten（bergamot oil中の香料成分）等を含む香料に対して本3T3 NRU法の感度が低いことが報告されており、その原因の解明とそれらの光毒性を正確に評価する新たな*in vitro*試験法の開発が必要である。

⑤難溶性物質や製品を評価可能な3次元皮膚モデルの使用や他の*in vitro*試験とのbatteryが考えられるが、今後の課題である。

6-8）結論

文献に記載された情報のみではデータの質や再現性を十分に明らかにすることはできなかった。しかし、ZEBETのDr Spielmannより入手したデータファイルを用いた検討により論文で示された結果の大筋の確認とバラツキや誤評価の原因究明を行うことができた。

論文及びデータファイルの両方を用いた解析の結果、3T3-NR光毒性試験法は、以下に述べるような限界があるが、*in vivo*結果との対応が良く、被験物質の光毒性の有無を評価するのに有効である、と結論できる。

以下に本光毒性試験法の主な限界を例示する。

①光感作性を検出するための方法ではなく、光刺激性を評価するための方法である。

②通常、適切な溶解溶媒のない物質や培養液と混和しても直ぐに分離してしまう物質への適用は困難である。また、着色物質では正しい評価が出来ない場合がある。揮発性の高い物質についても試験系への適応に際しては注意が必要である。

③UV-Bは内因性光増感物質と反応して細胞毒性を起こすためUV-B吸収が原因となる光毒性物質の作用はとらえ難い可能性がある。

④光毒性発現に代謝活性化を要する物質の評価には適さない可能性がある。

⑤本試験試験法で光毒性物質と評価された物質を使用する際の適切な使用用量や濃度については*in vivo*試験等で確認する必要がある。

なお、技術的な理由によって、誤評価やバラツキが認められる事例がバリデーションで認められたことから、上記を含めた細胞毒性試験法の特性を良く理解した上で訓練を十分に受けた者が試験に利用しなければならない。また、原因不明の誤評価もわずかであるが認められたこと及び本試験法では感度の低い物質群の存在することも報告されており、今後もそれらの原因について基礎的な検討を進めていく必要がある。更に、光源の変更など、試験法を若干変更した場合の頑健性等については不明確なところもある。このような場合には少数の被験物質を用いて試験法の妥当性について確認しておく必要がある。

引用文献

Hozle, E., Neumann, N., Hausen, B., Przybilla, B., Schauder, S., Honigsmann, H., Bircher, A., and Plewig, G. (1991) Photopatch testing：the 5-year experience of the German, Austrian, and Swiss Photopatch Test Group, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 25, 59-68

Mauget-Faysse, M., Quaranta, M., Francoz, N., BenEzra, D., Mauget-Fa, M. (2001) Incidental retinal phtotoxicity associated with ingestion of photosensitizing drugs, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 239, 501-508

Neumann, NJ., Holzle, E., Plewing, G., Schwarz, T., Panizzon, RG., Breit, R., Ruzicka, T., and Lehmann, P. J. (2000) Photopatch testing：the 12-year experience of the German, Austrian, and Swiss photopatch test group, *Am. Acad. Dermatol.*, 42, 183-192

Selvaag, E., Thune, P. (1997) Phototoxicity to sulphonamide-derived oral antidiabetics and

Presented by Medical*Online

diuretics : investigations in hairless mice, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., 13, 4-8

Presented by Medical*Online