

## 付録 パリテーションデータの質に関するチェックシート

●研究名：

文献名：

著者：

- 信頼できる機関の指導で行われたバリテーションか？
- 評価施設は何施設か？
- 評価物質は何物質か？
- プロトコル、SOP を入手することが可能か？
- 生データをどのように加工したデータが記載されているか？
  
- 質を良くするためのデザイン上の工夫がされているか？
  - 機器や SOP について記載がされているか？
  - 信頼性、妥当性の高い評価項目 (Prediction Model : PM) が用いられているか？
  - in vivo のデータソースはどのようなものか記載がされているか？
  - 一つの物質を評価する際に、同じ用量で複数の測定が独立に行われているか？
  
- 提出されたデータのチェックが行われているか？
  - 提出されたデータの形式について記載されているか？
  - 提出されたデータのチェック項目について記載されているか？
  
- データ解析のためのデータの固定はどのように行われているか？
  - PM の計算方法は各施設で計算するか特定の施設で計算するか？
  
- 結果はどうであったか？
  - プロトコルや SOP の逸脱について記載されているか？
  - 解析から除外されたデータについて記載されているか？
  - 施設により実験条件が異なった場合の影響について記載されているか？
  - 施設内再現性は十分か？
  - 施設間再現性は十分か？
  
- その他注目すべきことはあるか？
  - データの質を低下させる可能性についての考察が記載されているか？

#### 4-2-2-2) 試験結果のピボ試験結果の対応性

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、被験物質存在下でソーラーシミュレーターの 335 nm 以下の UVB をフィルターで除いた紫外線を照射して、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されている。

本章ではこの 2 つのパラメーター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<sup>1-3)</sup>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、+/-、+、A (光アレルギー性) というあいまいな書き方であったため、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。

Table 4-2. 公表データのみまとめ (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, 括弧内の数字は異なる判定をした施設の割合)

化合物名	In vivo data		1st val.	2nd val.		UV filter 論文	
	Animal	Human	PIF	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				
Tetracycline	+	+	PI				
Piroxicam	-	+	NP				
Amiodarone	+	+	PI	PI (3/9)	PI (1/9)	PI (1/4)	PI
Bithionol	+	+	PI	PI	PI (1/9)	PI	PI
Neutral red	NA	+	PI	PI	PI		
Rose Bengal	-	+	PI	PI	PI		
Cinnamic Aldehyde	-	-	NP				
Chlorhexidine dihydrochloride	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				
Benzophenone-4	-	+		+/-	+/-	NP(1/4)	NP(1/4)
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(1/ 9)		
Ketoprophen	-	+		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 (2/9)	PI		
Nalidixic acid	+	+		PI (2/8)	PI (1/8)		
Norfloxacin	+	+		PI	PI		
Ofloxacin	+	+		PI (1/8)	PI		
Protoporphyrine IX	+	NA		PI	PI		
Protoporphyrine IX diNa	+	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 benzilidene camphor	-	-				NP	NP
3-Benzilidenl camphor	-	-				NP	NP
Terephtalidine dicamphor sulphonic acid	-	-				PI (1/4)	PI
Polyacrylamidom ethy benzylidene-camphor	-	-				NP	NP

## 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えることができる。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、benzylidene camphor sulphonic acid、4-methyl benzylidene camphor、3-benzylidene camphor、terephthalidine dicamphor sulphonic acid、polyacrylamidomethyl benzylidene camphor

II) 香料 (4 種) : 6-Methylcoumarine、cinnamic aldehyde、bergamot oil、musk ambrette

III) 抗生物質、抗菌薬 (9 種) : Tetrachlorosalicylanilide、doxycycline、tetracycline、chlorhexidine dihydrochloride、penicillin G、demeclocycline、nalidixic acid、norfloxacin、ofloxacin

IV) 抗炎症薬、消炎鎮痛薬 (3 種) : Piroxicam、ketoprofen、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 (抗寄生虫剤)、thiourea (防腐剤)、5-MOP (白斑治療)、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。

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、その溶解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。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補助剤は 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性の影響を正當に評価することは難しい。また、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。しかしこの点についても、それぞれの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ことから、溶解性の影響の有無について結論を下すことは適切ではないと考える。

同様に Phase III 研究においても被験物質の溶解性の影響を考察できるような結果となっていない。

以上の実験結果から被験物質の溶解性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、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 42-3, 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の中では 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
+	+	23	18
+	-	3	2
-	+	1	1
-	-	9	7
評価被験物質数合計		36	28

+: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
+	+	18	13
+	-	0	0
-	+	4	4
-	-	11	9
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 4-5. 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
+	+	23	19
+	-	3	2
-	+	1	1
-	-	10	9
評価被験物質数合計		37	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。

Table4-6. *In vivo, in vitro* 判定対応表 (Human vs. PIF)

<del>Vitro</del> / Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	23	1	24
Non-phototoxic	3	9	12
Total	26	10	36

Sensitivity: 88.5%, Specificity: 90%, Positive predictivity: 95.8%,  
 Negative predictivity: 75%, Accuracy: 88.9%

Table4-7. *In vivo, in vitro* 判定対応表 (Human vs MPE)

<del>Vitro</del> / Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	18	1	19
Non-phototoxic	2	8	10
Total	20	9	29

Sensitivity: 90%, Specificity: 88.9%, Positive predictivity: 94.7%,  
 Negative predictivity: 80%, Accuracy: 96.6%

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

<del>Vitro</del> / Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	18	4	22
Non-phototoxic	0	11	11
Total	18	15	33

Sensitivity: 100%, Specificity: 73.3%, Positive predictivity: 81.8%,  
 Negative predictivity: 100%, Accuracy: 87.9%

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

<del>Vitro</del> / Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	13	4	17
Non-phototoxic	0	9	9
Total	13	13	26

Sensitivity: 100%, Specificity: 69.2%, Positive predictivity: 76.5%,  
 Negative predictivity: 100%, Accuracy: 84.6%

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

<del>Vitro</del> / Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	23	1	24
Non-phototoxic	3	11	14
Total	26	12	38

Sensitivity: 88.5 %, Specificity: 91.7%, Positive predictivity: 95.8%,  
 Negative predictivity: 78.6%, Accuracy: 89.5%

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

Vitro \ Vivo	Phototoxic	Non-phototoxic	Total
Phototoxic	19	1	20
Non-phototoxic	2	9	11
Total	21	10	31

Sensitivity: 90.5%, Specificity: 90%, Positive predictivity: 95%,  
 Negative predictivity: 81.8%, Accuracy: 90.3%

次に感度、特異性、陽性予測力、陰性予測力、一致率を Table 4-10 にまとめた。全体として、これらの数値は 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陽性検出力は PIF で 95.8%、MPE で 94.7%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	88.5	90	100	100	88.5	90.5
Specificity	90.0	88.9	73.3	69.2	91.7	90
Positive predictivity	95.8	94.7	81.8	76.5	95.8	95
Negative predictivity	75	80	100	100	78.6	81.8
Accuracy	88.9	96.6	87.9	84.6	89.5	90.3

#### 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する。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して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 細胞を用いたニュートラルレッド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質を陽性する陽性検出力は PIF で 95.8%、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結果に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。

#### 参考文献

- 1) Spielmann, H. et al., (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.
- 2) Spielmann, H. et al., (1998) 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.
- 3) Spielmann, H. et al., (1998), 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. はじめに

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 (CV) 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 細胞を用いたニュートラルレッド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<sup>1-4)</sup>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、再現性を調べるのが常道であり、これがもっとも重要な点であると考えられる。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.
- ・ 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. Spielmann 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<sup>2)</sup>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、著者の施設又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)<sup>1)</sup>や Spielmann (1995)<sup>4)</sup>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 を見る事ができない。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<sup>3)</sup>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(1995)に箱ヒゲ図にて記載されている。20被験物質中6物質(No.7:Tetracycline, 1:Promethazine, 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:Bithionol, 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, 12(1998)による物質毎のデータのバラツキを示す CV 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、これは数字が求めたもの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にも係わらず、UV filter 物質を用いた試験<sup>3)</sup>では、施設内より施設間において CV 値が悪いとされている。もっとも、この論文では data variability を問題にしていなると記載されている。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、施設間の再現性は悪いという印象を誰もが持つ。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、Chlorpromazine、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のが、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。

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)	npt *
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)	pt**
Bithionol	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)	pt
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)	pt
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)	pt

\* npt : 非光毒性物質、\*\* pt : 光毒性物質

#### F. 動物実験に対する 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。

ちなみに、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。

#### D. 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。こ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、施設により誤ったデータが蓄積される可能性もある。非水溶性物質の扱いなど、プロトコルを改良しなければ、信頼性の高い試験法とは呼べないとする。

#### E. 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。

#### F. 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する。

#### 参考文献

- 1) Spielmann, H. et al., (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.
- 2) Spielmann, H. et al., (1998) 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.
- 3) Spielmann, H. et al., (1998), 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) H. Spielmann et al. (1995) EEC/COLIPA In Vitro Phototoxicity Program: Results of the first Stage of Validation, Elsner P, Maibach HI (eds): Irritant Dermatitis, New Clinical and Experimental Aspects. *Curr Probl Dermatol. Basel*, Krager 23, pp.256-264.

#### J. 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。施設によっては誤った評価をする場合がある。Spielman et al の論文<sup>2)</sup>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。

#### 4-2-2-4) 総合評価

担当：大森 崇

##### A. はじめに

ここでは、4-2-2-1)から 4-2-2-3)で個別に論じられた議論に基づき、光毒性試験の代替法として、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法が妥当であるかどうかについて総合的な評価を行うことにする。

なお、必要な場合には補足を加えている。B 節ではデータの質について、C 節ではビボ試験結果との対応性について、D 節では試験間の信頼性について要約し、E 節で総合評価をまとめる。

##### B. データの質について

4-2-2-1)では、データの質について議論をした。3つの文献の中で、Phase II 研究はデータの質を評価する上で多くのことが記載されているが、他の2つの研究では、質を評価する上での記載は非常に少ない。データの質という点からは、文献のみで確認することは限界があるので、報告されている結果を確認することを目的に含めた研究を実施することが必要となるかもしれない。

##### C. ビボ試験結果との対応性について

ビボ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、ビボ（ヒト、動物）と予測モデル（PIF、MPE）の関係を検討した。組み合わせにより異なるが、評価した被験物質は、26～38であった。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 88.5%、特異度 91.7%、陽性予測力 95.8%、陰性予測力 78.6%、一致率 89.5%であり、MPE では、感度 90.5%、特異度 90.0%、陽性予測力 95.0%、陰性予測力 81.8%、一致率 90.3%と全体として高かった。この結果は、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。

ただし、これらのバリデーション研究で用いられたデータは多くはなく、被験物質の溶解性の影響等について本試験方法の課題もある。

##### D. 試験結果の信頼性について

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 研究で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測定値から算出された 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（80 物質中1施設1物質が1回しか測定されていない）、再現性は悪くなかった。

施設間再現性については、Phase II 研究と UV Filter 研究で評価がされているが、両者で評

価方法は異なっている。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) という指標が導入され評価されている。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 の比較がされており、一般に施設内の値に比べ、施設間の値の方が大きい (PIF、MPE のいずれも最高値は約 200%であった) という結果が得られている。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 の値での施設間再現性は低いと思われる。ところで、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、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。

#### E. 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、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率は 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いえるだろう。

ただし、この結論はあくまでも文献上からの評価である。我々の検討では生データやデータ検討会や MT 会議の議事録等を得ているわけではない。したがって、データの質を十分に確かめることはできておらず、したがって、文献に試験結果が正しく反映されているか否かについての確認はできていない。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、偽陰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り、この試験法について更に検討する余地があると思われる。

よって、我々はこの試験法を代替法として、我が国で導入する場合には、大規模ではないにしてもこの結果を確認することを目的とした、質の高いデータに基づくバリデーション研究を実施する必要があると考える。

### 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、keratinocytes、hepatocytes、macrophage、carcinoma 等様々の細胞種が利用されている<sup>11-12)</sup>が、fibroblasts、keratinocytes を用いた報告が多い。使用している光源は、UVA であった。評価の指標では、細胞内小器官の機能を指標とした方法 (MTT assay、NR-uptake 等)、細胞膜損傷 (LDH-leakage)、DNA 合成阻害および酸化傷害を指標とした方法が用いられている。各試験法の報告結果から、細胞による感受性の差が見られている。fibroblasts と keratinocytes との比較では、ヒト keratinocytes の感受性は Balb/c 3T3 と比較して高くないという報告がある<sup>8)</sup>。また、各種細胞の感受性の差を細胞内成分の差 (EGF レセプター発現、グルタチオン含量等) ではなく細胞内への化学物質の取り込み量の差によると考察している報告<sup>11)</sup>がある。このように細胞による感受性の差は報告されているが、各種細胞を用いた光刺激性予測は可能であると報告されている。

##### 4-3-1-2) その他の細胞を用いた試験法 (Table 4-15)

微生物を用いた試験法と哺乳類以外の細胞を用いた試験法がある。これらも主にスクリーニングを目的とした試験法と考えられる。使用されている微生物では酵母が主に用いられている。また、原生動物である *Tetrahymena thermophila* や *Artemia salina* (brine shrimp) 等が利用されている。光源は UVA が用いられている。評価の指標は、主に増殖抑制であった。試験法の特徴として、簡便で安価なことから大規模なスクリーニングに適している<sup>15)</sup>と報告されている。

##### 4-3-1-3) 培養皮膚モデルを用いた試験法 (Table 4-16)

3次元培養皮膚モデルを用いた試験法は主にスクリーニングを目的とした試験法と考えられる。ヒト fibroblasts または、ヒト fibroblasts と keratinocytes を用いて作製した皮膚モデルを用いたものである。評価の指標は MTT assay が用いられている。*in vivo* 結果との対応は良好と報告されている。

#### 4-3-1-4) 生体膜損傷を指標とした試験法：光溶血性試験 (Table 4-17)

生体膜損傷を指標とした試験法では、赤血球を用いた光溶血試験法が使用されている。これは、生体膜脂質過酸化を中心とした膜損傷を評価する試験法であり、主に光毒性反応のメカニズム評価法として利用されている。評価の指標は溶血により放出されたヘモグロビン量の測定である。使用している赤血球はヒト赤血球がほとんどである。光源は UVA が主体であるが、一部 UVB または UVA と UVB の併用が報告されている。試験法の報告からはソラレン等の DNA 関与の光毒性反応は検出できないが、分子状酸素の関与する反応は評価できる<sup>18,19)</sup>と報告されており、反応メカニズムによる差別化が可能という結果が得られている。また、*in vivo* 光毒性結果との対応評価からスクリーニング法としても有用であるという報告<sup>21)</sup>もある。

#### 4-3-1-5) タンパク質に対する作用を指標とした試験法 (Table 4-18)

タンパク質に対する作用を評価する試験法は、メカニズム評価に重点を置いた試験法として報告されている。タンパクに対する作用は、光によるタンパク質の過酸化と光によるタンパク質への共有結合が評価されている。光タンパク過酸化では、ヘモグロビンの光過酸化反応を利用したものが報告されている。また、光タンパク結合ではヒト血清アルブミン、 $\gamma$ -グロブリン、インシュリンが用いられ、それらに対する光結合能について評価している。光源は UVA が主体である。光タンパク結合は、*in vitro* 光感作性試験法として評価されている。ヘモグロビンの光過酸化反応は単独での報告は少なく、光溶血性試験と併用で報告されている。これらの報告のなかで、光毒性物質のタンパクへの作用について、光刺激性物質は一重項酸素を発生することからアミノ酸残基を酸化するが、光感作性物質はタンパクと結合するものが多いという報告<sup>26)</sup>があり、光刺激性反応と光感作性反応の識別への利用の可能性を示唆している。

#### 4-3-1-6) その他の化学物質を用いた試験法 (Table 4-19)

メカニズム評価に重点を置いた試験法として、分子状酸素の関与を評価するため、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。脂質過酸化反応では、リノレン酸、スクワレンが利用されている。活性酸素種の補足剤としては、ヒスチジン、トリプトファン、グルタチオン、NADH の利用が報告されている。光源は UVA である。これらの評価法は単独での報告は、NADH によるもののみであり、その他はいくつかの評価法を組み合わせで報告されている。これらの試験法は、光毒性メカニズム評価への利用が中心で、広範囲の化学物質に対する *in vivo* 結果との対応性について検討した報告はなかった。

#### 4-3-1-7) 試験法の組み合わせ (battery) による評価 (Table 4-20)

各種 *in vitro* 試験法の予測精度を高めるため、試験法を組み合わせで評価している報告が見られた。これらは DNA に対する作用を確認できる真核細胞を用いた試験法と生体膜損傷を指標とした方法の組み合わせや、異なったメカニズム評価を組み合わせたものであった。この中では、光溶血性試験法と酵母を用いた試験法の組み合わせでモルモットによる光毒性結果との一致性が高まったという報告<sup>32)</sup>が見られた。

#### 4-3-2) 各種 *in vitro* 光毒性試験法の評価

文献調査の結果、各試験法は主にスクリーニングを目的とした試験法とメカニズム評価に重点を置いた方法に大別されたが、スクリーニング評価では単層培養系での報告が多かった。使用されている光源は UVA がほとんどであり、UVB 単独での評価報告は少なかった。メカニズム評価では、赤血球溶血性試験法の報告が多かった。化学物質を用いた評価法は単独での利用はほとんど見られず battery 試験として評価されていた。また、各試験法の中で、プレバリーデーションを含むバリーデーション評価が実施されたものは、ヒト keratinocytes による試験法<sup>16)</sup>、皮膚モデルを用いた試験法<sup>17)</sup>、赤血球溶血性試験法<sup>20), 31)</sup>が挙げられる。これらの評価結果はいずれも良好であったと報告されている。また、試験法の組み合わせによる評価では、スクリーニングを目的とした試験法とメカニズム評価法の組み合わせや、一定の化学物質の光毒性反応を詳細に検討するための組み合わせがあり、それぞれの用途に応じた battery が検討されている。このような組み合わせ評価は試験法の精度を高めるための有効な手段であると考えられる。特に光溶血性試験法は、脂質膜過酸化のメカニズム評価法として広く利用されていることから battery を考える場合には有用な試験法であると考えられる。また、HSA 等を用いた光タンパク結合反応とヒスチジンの光過酸化反応の組み合わせは、光刺激性反応と光感作性反応の簡易識別に有用であることが示唆されている。したがって、Balb/c 3T3 細胞を用いた光刺激性試験代替法以外の代替試験法としてこれらの代替試験法が有望であると考察される。

#### 参考文献

- 1) Colombain M, Goll V, Muyard F, Girard C, Bevalot F, Richert L. (2001) A bioassay using the human hepatoblastoma cell line HepG2 for detecting phototoxicity of furocoumarins. *Planta Med.* 67(7) 644-6.
- 2) Freeman RG, Murtishaw W, Knox JM. (1970) Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity. *J. Invest. Dermatol.* 54(2) 164-9.
- 3) Lasarow, R.M., R.R. Isseroff and E. Gomez. (1992) Quantitative in vitro assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay. *J. Invest. Dermatol.* 98, 725-729
- 4) Lock, S.O. and J.V. Friend. (1986) Phototoxicity testing in vitro: Evaluation of mammalian cell culture techniques. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 789-793
- 5) Maier, K., R. Schmitt-Landgraf and B. Siegemund, (1991) Development of an in vitro test system with human skin cells for evaluation of phototoxicity. *Toxicol. in Vitro*, 5, 457-461
- 6) Traynor NJ, Barratt MD, Lovell WW, Ferguson J, Gibbs NK. (2000) Comparison of an in vitro cellular phototoxicity model against controlled clinical trials of fluoroquinolone skin phototoxicity. *Toxicol. In Vitro.* 14(3) 275-83.
- 7) Wilhelm KP, Biel S, Siegers CP. (2001) Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine.* 8(4) 306-9.
- 8) Clothier R., Willshaw A., (1999) The Use of Human Keratinocytes in the EU/COLIPA Study on UV Filter Chemicals, *ATLA* 27 247-259
- 9) Van Graft M, Boot JH. (1996) Photodynamic effects of protoporphyrin on the cellular level—an in vitro approach. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 32(7) 394-8.
- 10) Rosen JE, Prahalad AK, Schluter G, Chen D, Williams GM. (1997) Quinolone

- antibiotic photodynamic production of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cultured liver epithelial cells. *Photochem. Photobiol.* 65(6) 990-6.
- 11) Vandenberg AL, Cuveele JF, Proot P, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA. (1997) Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. *J. Photochem. Photobiol. B.* 38(2-3) 136-42.
  - 12) Morgan J, Potter WR, Oseroff AR. (2000) Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative. *Photochem. Photobiol.* 71(6) 747-57.
  - 13) Daniels, F., J. (1965) A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J. Invest. Dermatol.* 44, 259-263
  - 14) Misra RB, Joshi PC. (1999) Phototoxicity evaluation--*Tetrahymena thermophila* as an alternative model. *Indian J. Exp. Biol.* (8) 750-7.
  - 15) Ojala T, Vuorela P, Kiviranta J, Vuorela H, Hiltunen R. (1999) A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Med.* 65(8) 715-718.
  - 16) Augustin C, Collombel C, Damour O. (1997) Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 13(1-2) 27-36.
  - 17) Edwards S.M., T.A. Donnelly, R.M. Sayra and L.A. Rheins, (1994) Quantitative in vitro assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin2TM. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10, 111-117
  - 18) Kahn G, Fleischaker B.E. (1971) valuation of phototoxicity of salicylanilides and similar compounds by photohemolysis. *J. Invest. Dermatol.* 56(2) 91-97.
  - 19) Hetherington, A.H. and B.E. Johnson, (1984) Photohemolysis. *Photodermatology*, 1, 255-260
  - 20) Pape. WJ, Maurer T, Pfannenbecker U, Stelling W. (2001) The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation program on phototoxicity (phase II). *Altern Lab Anim.* 29(2) 145-162.
  - 21) Sugiyama, M., H. Itagaki, T. Hayashi, N. Murakami and S. Kato (1994a) In vitro assay to predict phototoxicity of chemicals: (1) Red blood cell hemolysis assay. *AATEX*, 2, 183-191
  - 22) Vargas F, Mendez H. (1999) Study of the photochemical and in vitro phototoxicity of chlorthalidone [2-chloro-5-(1-hydroxy-3-oxo-1-isoindolinyl)benzene sulfonamide]. *Pharmazie.* 54(12) 920-922.
  - 23) Traynor, N.J., B.E. Johnson and N.K. Gibbs, (1996) Photohaemolysis assay for drugs phototoxicity complicated by 'bleaching' of released haemoglobin. *Toxicol. in Vitro*, 10, 619-624
  - 24) Pennington, R.U. and M.D. Barratt, (1990) Molecular basis of photocontact allergy. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 12, 91-103
  - 25) Barratt, M.D. and K.R. Brown, (1985) Photochemical binding of photoallergens to