

### In vivo光毒性試験についての結論

1. in vivo光毒性試験の正式なガイドラインは存在しないが、経皮投与試験は、広く行われており、大枠のコンセンサスが得られていると考えられる。
2. 各試験法の施設内再現性は高いと推定されるが、施設間再現性は不明。
3. false positiveやfalse negativeの議論は不可能であるが、光増感物質とされているものが、false negativeとなることがある。

### In vitro光毒性試験法

### In vitro光毒性試験法

#### 1 スクリーニングを目的とした試験法

##### 1) 単層培養細胞を用いた試験法

##### (a) 哺乳類細胞

Human: keratinocytes, fibroblasts, Hepatocytes, carcinoma, lymphocytes  
Animal: fibroblasts, kidney cells, macrophages, hepatocytes (rat, rabbit, monkey, mouse)

##### (b) 評価の指標

Neutral red uptake assay  
MTT reduction assay  
DNA synthesis (trium uptake, B-oso d(formation)  
LDH leakage assay  
Colony formation assay

##### 2) その他の細胞を用いた試験法

発生物: *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*  
その他: *Tetrahymena thermophila* (原生動物), *Artemia Salina* (brine shrimp)

##### 3) 培養皮膚モデルを用いた試験法

豚豚モデル及び鼠鼠豚豚モデル

#### 2 メカニズム評価を目的とした試験法

##### 1) 生体膜損傷を指標とした試験法

Red blood cell photohaemolysis (human red blood cells, calf red blood cells)

##### 2) タンパク質に対する作用を評価する試験法

Haemoglobin photo-oxidation  
Photobinding to protein (human serum albumin, gamma-globulin, insulin)

##### 3) その他化学物質を用いた試験法

Lutefolic acid peroxidation  
Histidine-Triphenylmethane-Glutathione (photo-oxidation)

### 各in vitro光毒性試験法のまとめ (文献調査結果)

#### 1 スクリーニング評価を目的とした試験法

哺乳類細胞の単層培養系の報告が多い。

光源: 主にUVA

細胞の感受性: fibroblasts > keratinocytes

in vivo結果との対応は良好。

#### 2 メカニズム評価を目的とした試験法

1) 光溶血性試験法 (生体膜脂質過酸化を指標) の報告が多い。  
分子状態の関与する反応を評価できる。

光源: 主にUVA 赤血球: ヒト

2) 光タンパク結合性の評価は in vitro光感受性評価に利用可能。  
光源: UVA

3) 化学物質を用いた試験法はメカニズム評価への利用の報告のみ。

#### 3 試験法の組み合わせによる評価

試験精度向上のためのバッテリー-の報告。

## 今回、3T3-NR法を選択した理由

本法は、光毒性試験の代替法の中で、数回のバリデーションスタディが実施され、評価が進んでいる事。

OECDガイドラインに提案され、受け入れの為の国際的な議論が進んでいること。

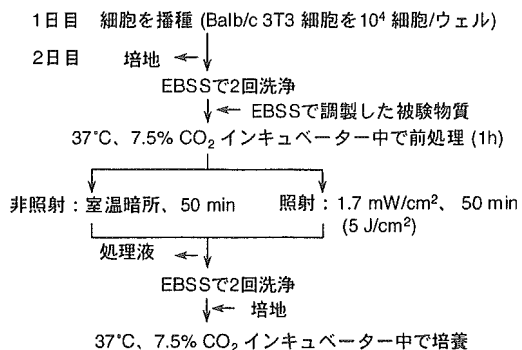
## 選択された具体的な理由

- In vivoのデータと極めて良い対応を示す。
- 感度が良く、簡便な方法である。
- 短期間 (3日) で結果が得られる。
- 施設内の再現性も良い。
- 一般的な細胞毒性試験に用いる細胞株が使用できる。
- 代替法として、動物を用いない。

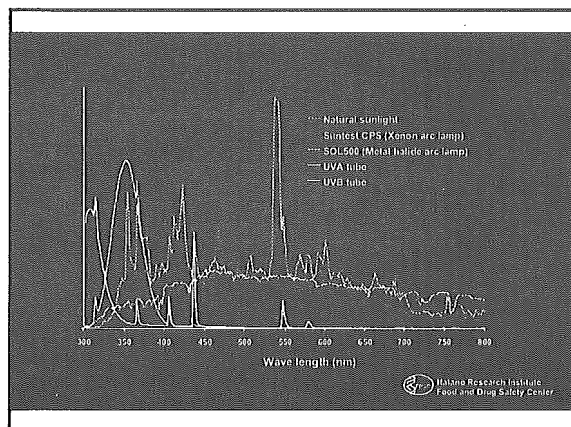
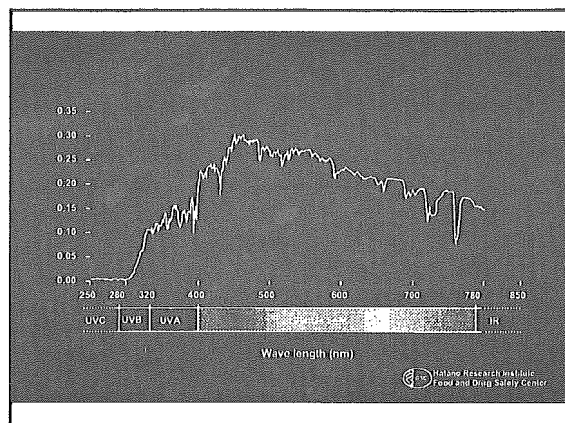
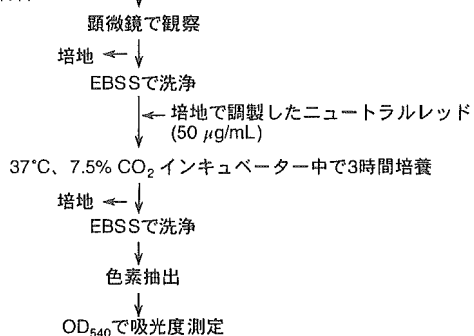
### 3 T3-NR法の問題点

- 光源の種類によって波長特性が異なるため、化学物質との光化学反応により毒性発現に影響がある。よって、波長特性を予め把握し、十分な背景データをとっておく必要がある。
- 現時点では、S9mix中の補酵素などの妨害により代謝活性化の系が組み込めない。
- 施設間の再現性がやや良くない (PIF, MPE 値)。

### 3T3-NR 法による光毒性試験 (EU/COLIPA 法)



3日目



16th Meeting of the Japanese Society of  
Alternative to Animal Experiments  
4-5 December, 2002  
Sohyo Kalkan, Tokyo

**EVALUATION OF  
IN VITRO PHOTOTOXICITY TESTS**

*Comments from the EU*

Zentralstelle zur  
Erfassung und  
Bewertung von  
Ersatz- und  
Ergänzungsmethoden zum  
Tierversuch

Horst Spielmann  
Head of ZEBET  
Berlin, Germany

BfR  
zebet

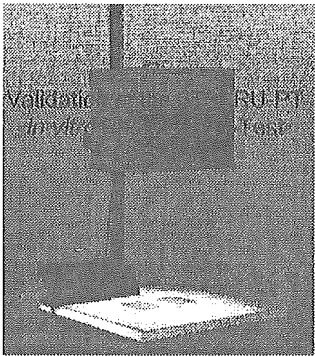
**Topics Covered**

| in vitro phototoxicity testing

- EU validation study of the in vitro 3T3 NRU PT
- OECD consultation and improvements of the test
- OECD acceptance

BfR  
zebet

**In vitro phototoxicity**



BfR  
zebet

**BACKGROUND of the validation study**

**OECD 1990/91**

No agreement on phototoxicity test in animals

- many different animal models  
guinea pigs, mice, rats, rabbits
- no standard protocol

**RECOMMENDATION:**  
*Tier approach*

1. *in vitro* testing
2. *in vivo* animal testing
3. *in vivo* testing in humans

BfR  
zebet

**EU - ECVAM - COLIPA - ZEBET  
Validation Project "In vitro Photoirritation"**

**GOAL STATEMENT**

"The goal of the EU/COLIPA In Vitro Photoirritation project is to determine if currently selected in vitro methods are capable of properly predicting the photoirritation potential to humans of chemicals applied via the systemic route or topically to the skin."

BfR  
zebet

**Definition of ACUTE PHOTOTOXICITY  
(Acute Photoirritation)**

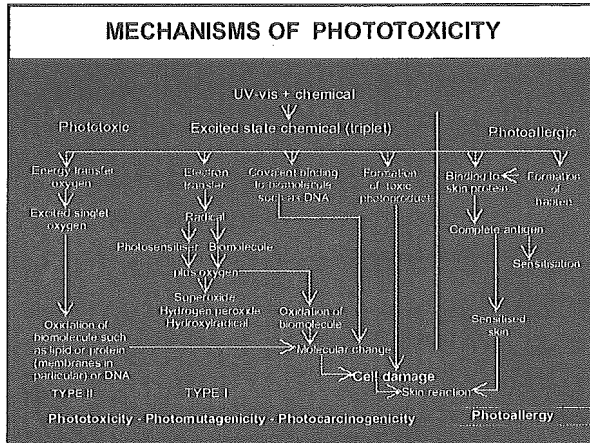
has to be distinguished from:

- ✗ Photoallergy
- ✗ Photomutagenicity
- ✗ Photocarcinogenicity

**Basic mechanism:**

UV + visible light (300 - 750 nm)  
+  
chemicals, absorbing light (300 - 750 nm)  
↓  
*activated chemical*

BfR  
zebet



### Topics Covered

- in vitro phototoxicity testing
- EU validation study of the in vitro 3T3 NRU PT
- OECD consultation and improvements of the test
- OECD acceptance

**BfR**  
**zobot**

### Design of Phase I (1992/93)

- ZEBET (BgVV and FRAME (UK) test new commercial assays
  - SOLATEX PI™
  - Skin<sup>2</sup>
  - (TESTSKIN)
- all laboratories test a new, simple 3T3-NRU phototoxicity test

**IMPORTANT:**

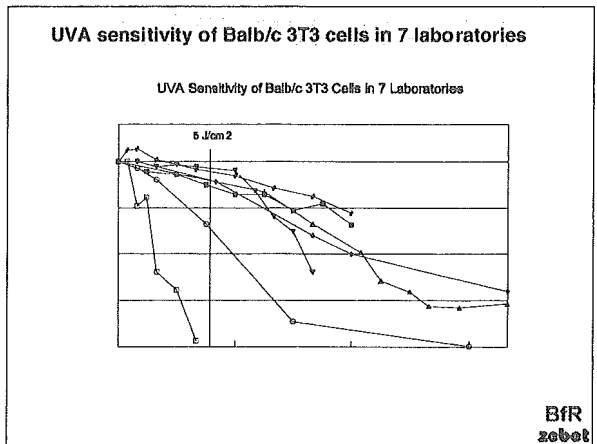
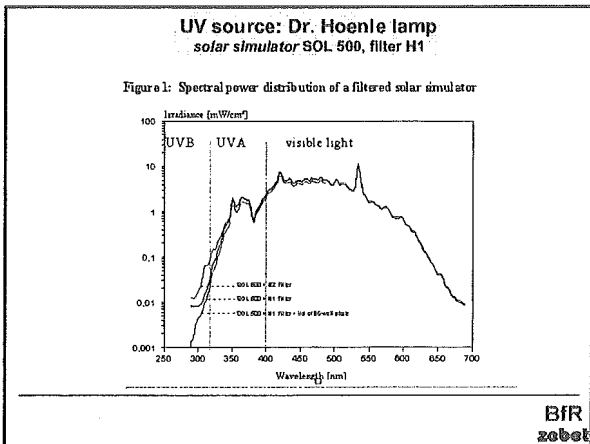
- 20 test chemicals used in all assays
- Selection of chemicals: COLIPA
- UV-Source Sol 500 } identical
- UV-Meter Dr. Hönlé }
- Coordination ZEBET

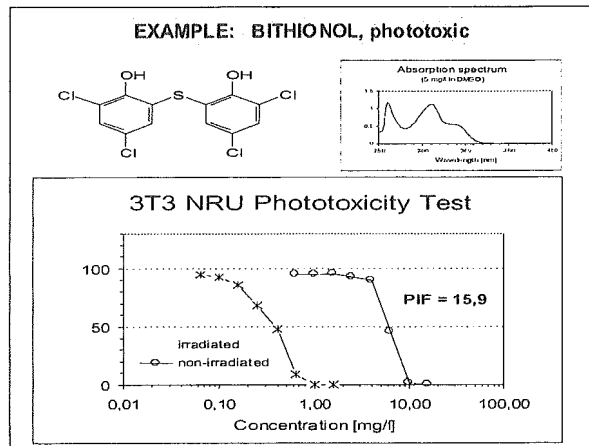
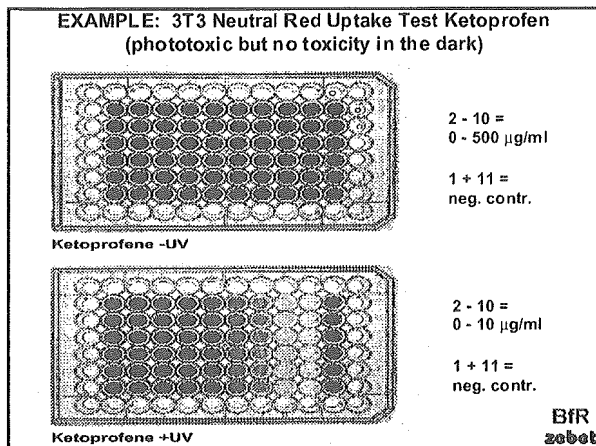
**BfR**  
**zobot**

### Additional Test Systems in Phase I

Hoffmann-La Roche	Yeast test (can dlda) SOLATEX PI™	Unilever	Histidine photo-oxidation Photobinding to proteins
Henkel	RBC haemolysis		
Ciba Geigy	RBC haemolysis	FRAME	Human lymphocytes (MTT)
Beiersdorf	RBC haemolysis RBC Hb oxidation Histidine photo-oxidation	ZEBET (BgVV)	Human keratinocytes (NRU) SOLATEX PI™ Skin <sup>2</sup> Living skin equi

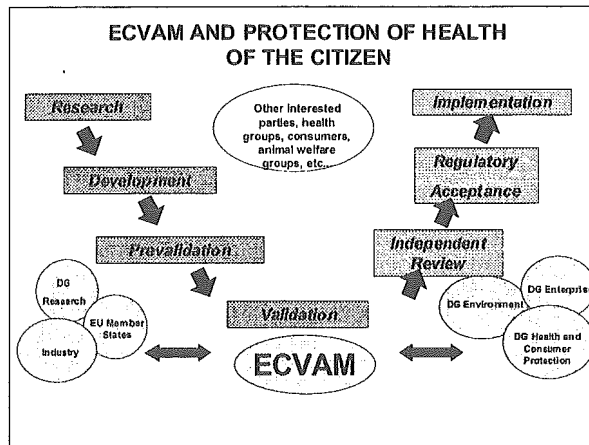
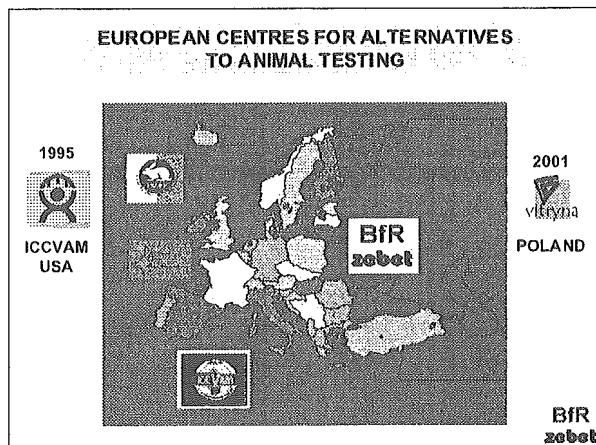
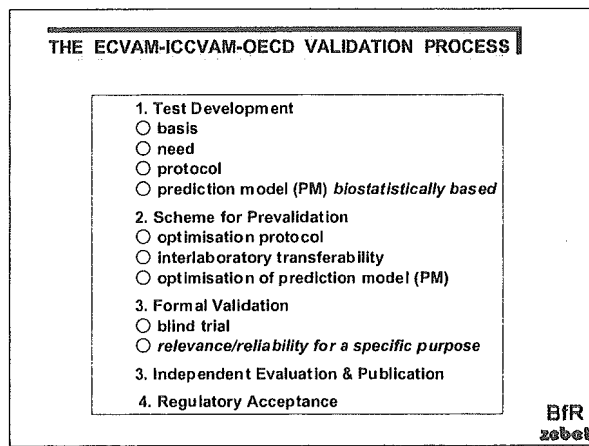
**BfR**  
**zobot**





**EU/COLIPA: RESULTS PREVALIDATION**

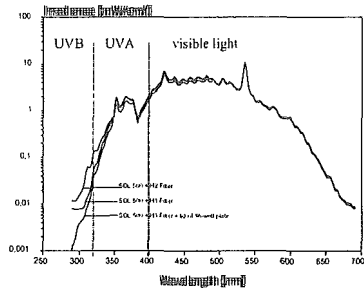
	Mechanistic Assays			Commercial Assays			Growth Inhibition Assays			
	Hisidine Plasma- oxidation	RBC Hemo- lysis	RBC Photo- oxidation	SO <sub>2</sub> - TUN PI	Skin? ZK 1300 ZK 1350	Yeast growth inhib.	human lympho- cytes MTT	human keratin- ocytes NRU	Common standard 3T3-NRU PT test	
<b>CLASS I (A) - Substances with low phototoxicity</b>										
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	-	(+)	+	+	+	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	++	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+
<b>CLASS II (A) - Substances with moderate phototoxicity</b>										
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CLASS III (A) - Substances with high phototoxicity</b>										
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	n.g.	-	-	-	-	-	-





## TG 432: Solution of the Irradiation Issue

Figure 1: Spectral power distribution of a filtered solar simulator



An additional figure in TG 432 shows an example of irradiance distribution with filter effects

BfR  
zebet

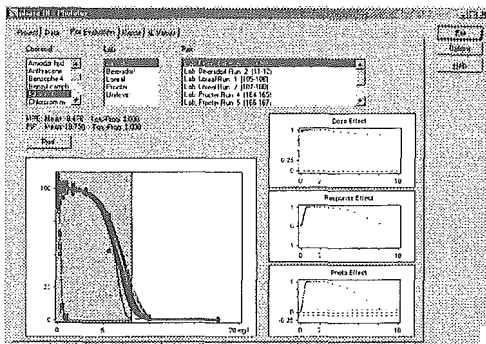
## Revised TG 432 : Reference Chemicals

Chemical and CAS No	PIF	MPE	Absorption Peak	Solvent
Amidone HCL [19774-93-4]	-3.25	0.27-0.54	342 nm (suborder)	ethanol
Chlorophenazine HCL [69-09-0]	-14.4	0.33-0.63	309 nm	ethanol
Nortriptyline HCL [70-58-96-7]	-71.6	0.34-0.90	316 nm	acetone/nile
Amilorone [120-12-7]	-16.5	0.19-0.81	356 nm	acetone/nile
Propargylamine DS, Diacetate [50863-01-5]	-43.3	0.54-0.74	402 nm	ethanol
L-Histidine [700-32-1]	no PIF	0.05-0.10	211 nm	water
Hydroquinone [101-83-4]	1.1-1.7	0.00-0.05	299 nm 317 nm (suborder)	ethanol
Sodium butyrate [131-27-3]	1.0-1.9	0.00-0.05	no absorption	water

- provide a biological confirmation of specific solar irradiation used
- verify that technical modifications (allowed by the increased flexibility of the Test Guideline) do not impair test sensitivity and test specificity
- verify that other cell lines / cells used, and endpoints other than NRU used do not impair test performance

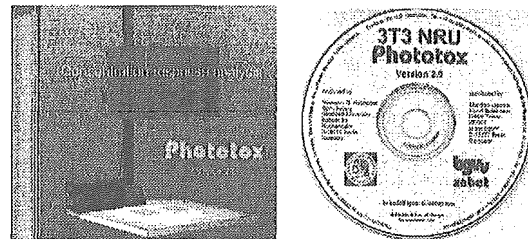
BfR  
zebet

## New Software



BfR  
zebet

## SOFTWARE 3T3 NRU PT Phototox Version 2.0



will be distributed free of charge by COLIPA | OECD

BfR  
zebet

## 3T3 NRU PT: summary of of changes...

### Draft TG 3T3 NRU February 2000

- v 13 pages
- v 55 paragraphs
- v no tables
- v 1 Figure
- v 14 Lit. references

### Draft TG 432 final 2002

- v 16 pages
- v 56 paragraphs
- v 1 Table
- v 3 Figures
- v 20 Lit. references

1 paragraph was deleted and 2 paragraphs were added.  
From the remaining 54 paragraphs only 1 was kept unchanged, and 53 paragraphs had to be revised!

BfR  
zebet

## OECD: acceptance of the 3T3NRU in vitro phototoxicity test

2000 EU accepts method B 41 into Annex V of EU Directive 67/548/EEC  
2000 OECD: circulation of draft guideline among member countries

[ improvement of biostatistics/prediction model + software required

ECVAM, COLIPA + OECD ] no funding for biostatistics available

[ ZEBET provided funding in 2001

[ ZEBET hosted OECD expert panel in October of 2001

[ acceptance of revised OECD TG 432 recommended

[ ZEBET sent Manfred Liebsch to OECD for 9 months

[ ML re-drafted OECD TG 432 in 2001/2002

SUCCESS ] OECD accepts revised version of TG 432 in May 2002

[ without ZEBET's active involvement this in vitro toxicity test would not yet have been accepted world-wide by the OECD.

BfR  
zebet

## Topics Covered

- *in vitro* phototoxicity testing
- EU validation study of the *in vitro* 3T3 NRU PT
- OECD consultation and improvements of the test
- | OECD acceptance 2002

BfR  
zebet

OECD TG 432,  
accepted May 2002

### OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS

#### DRAFT PROPOSAL FOR A NEW GUIDELINE: 432

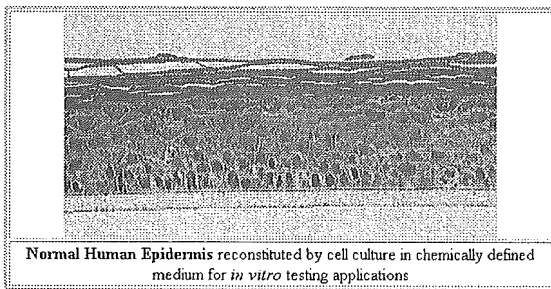
##### *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test

###### INTRODUCTION

1. Phototoxicity is defined as a toxic response from a substance applied to the body which is either elicited or increased (apparent at lower dose levels) after subsequent exposure to light, or that is induced by skin irradiation after systemic administration of a substance.
2. The *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test is used to identify the phototoxic potential of a test substance induced by the excited chemical after exposure to light. The test evaluates photo-cytotoxicity by the relative reduction in viability of cells exposed to the chemical in the presence versus a absence of light. Substances identified by this test are likely to be phototoxic *in vivo*, following systemic application and distribution to the skin, or after topical application.

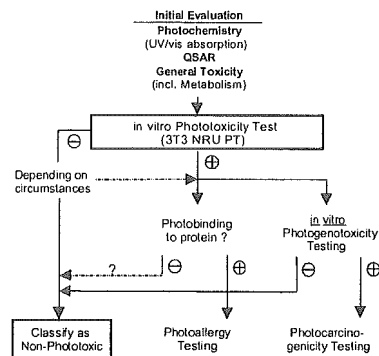
BfR  
zebet

## Human skin model



BfR  
zebet

## Phototoxicology: Hazard Identification



BfR  
zebet

## CONCLUSION

- Within a very short period after acceptance by the EU member states the OECD has accepted the 3T3NRU *in vitro* phototoxicity test
- The international OECD commenting process contributed to a significant increase in flexibility of the *in vitro* phototoxicity test guideline TG 432
- The Expert involvement guaranteed that an increase in flexibility did not reduce the test performance of the 3T3 NRU PT
- The EU Commission will amend its TG B 41 according to OECD TG 432 in the very near future

BfR  
zebet

rabbits are happy due to progress  
in *in vitro* phototoxicity testing!



BfR  
zebet



## バリデーションデータの評価

資生堂、基盤研究センター薬剤開発研究所  
畑尾正人

## はじめに

- 1) バリデーションデータの質
- 2) 試験結果のピボ試験との対応性
- 3) 試験法の再現性
- 4) 総合評価

## 評価した資料

### • Phase I 研究

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

### • Phase II 研究

The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation  
Study: Result of Phase II (Blind Trial). Part I: The 3T3 NRU  
Phototoxicity Test, H. Spielmann et al., Toxicology in Vitro 12 (1998),  
305-327.

### • Phase III 研究

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.

## 評価した資料

### 各研究の関係

#### Phase I 研究

プレバリデーション研究

#### Phase II 研究

ブラインド下で行われたバリデーション研究 (メイン)

#### Phase III 研究

さらに物質を加えた追加研究

## 評価した資料

Phase	物質数	評価施設数	一施設当たりの繰り返し	予測モデル (PM)	記載されているPM値
I	20	7	2	PIF	全ての施設の平均値
II	30	11	2	PIF MPE	各施設の平均値
III	20	4	2	PIF MPE	各施設の値

## 評価した資料

### 被験物質 (44種類)

- 紫外線吸収剤 (10種類)
- 香料 (4種類)
- 抗生物質、抗菌薬 (9種類)
- 抗炎症薬、消炎鎮痛薬 (3種類)
- その他薬剤 (11種類)
- その他 (7種類)

#### 4-2-2-1) バリデーションデータの質

(報告書 p.29)

#### 議論になったこと

- ・「データの質」とは何か？  
→文献で報告されたデータが信頼できるかどうか
- ・文献から「データの質」は評価できるか？  
→完全には無理、しかし何もできないわけではない

#### 着目した点

- ・文献中にデータの質を保つためにどのような工夫がなされていたのかをチェック

#### 内容

- A. はじめに
  - B. 質を確保するためのプロトコールやSOPの工夫
  - C. バリデーション研究期間中のプロトコールの変更や逸脱
  - D. 研究間の違い
  - E. データの監査
  - F. 質の評価
  - G. 提言
  - H. 結論
- 付録

#### この節のまとめ

- ・文献による質の評価では、生データがどのように得られ、どのように処理されたかという詳細まではわからない

- ・Phase II研究はデータの質を確保するためにどのようなことを行ったかがよく記載されている

例えば、

- データを収集したときに、
  - 規定どおりデータが得られているか、
  - 全てのシートに記入されている数値の形式は正しいか、
  - SOPからの逸脱がないか
- 等がチェックされたことの記載、
- プロトコール逸脱のデータの扱いについての記載

#### 4-2-2-2) ビボ試験との対応性

(報告書 p.36)

### 着目した点

- ・文献に記載されているデータに基づく解析
- ・個々の研究で得られた成績を総合するとどのような成績になるのかを調べる

### 内容

- A. データの説明
- B. 評価された化学物質の種類と性状の適切性
- C. 評価された化学物質数・製品数に関する適切性
- D. 試験法の性能に関する適切性
- E. 試験法の有用性に関する結論とその科学的妥当性
- F. まとめ

### この節のまとめ

- ・各研究における判定（多数決）と vivo データの比較

### この節のまとめ

	vs. Human		vs. Animal		vs. Human (or animal)	
	PIF	MPE	PIF	MPE	PIF	MPE
感度 (物質数)	88.5 (26)	90.0 (20)	100 (18)	100 (13)	88.5 (26)	90.5 (21)
特異度 (物質数)	90.0 (10)	88.9 (9)	73.3 (15)	69.2 (13)	91.7 (12)	90.0 (10)
陽性予測力 (物質数)	95.8 (24)	94.7 (19)	81.8 (22)	76.5 (17)	95.8 (24)	95.0 (20)
陰性予測力 (物質数)	75.0 (12)	80.0 (10)	100 (11)	100 (9)	78.6 (14)	81.8 (11)
一致率 (物質数)	88.9 (36)	96.6 (29)	87.9 (33)	84.6 (26)	89.5 (38)	90.3 (31)

### この節のまとめ

- ・各指標の値は高く、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効

### 4-2-2-3) 試験法の信頼性

(報告書 p.44)

### 着目した点

- ・文献評価の限界を強調、批判的な考察

### 内容

- A. はじめに
- B. 施設内再現性
- C. 施設間再現性
- D. 対照物質の再現性
- E. 予測モデルによる評価の再現性
- F. 動物実験に対するin vitro試験の再現性と信頼性
- G. 結論
- H. 要望
- I. その他
- J. 要望

### この節のまとめ

#### 施設内再現性

- ・記載はほとんどなく判断できない

#### 施設間再現性

- ・IC50による評価は記載されていない
- ・1～3施設の誤評価を見逃していいのか疑問  
例えば、PABAのMPE判定は5/9が陰性、4/9が陽性と判断
- ・バラツキが大きく評価に影響している物質もある  
例えば、4つの施設のProtoporphyrin IXのPIF値はそれぞれ  
388.13、45.97、206.478、16500.8

### この節のまとめ

#### 対照物質の再現性

- ・記載がなく判断できない

#### 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再現性を比較できない

### この節のまとめ

#### その他

- ・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
- ・試験プロトコルや評価基準の見直し  
(グレーゾーンあってもよい)が必要ではないか

### 4-2-2-4) 総合評価

### 内容

- A. はじめに
- B. データの質について
- C. ピボ試験結果との対応性について
- D. 試験結果の信頼性について
- E. 総合評価

### この節のまとめ

#### 施設間再現性

- ・陽性、陰性の判定の食い違いに着目した場合、施設間再現性を有している
- 例えば、Phase II研究で11施設中3施設以上の食い違いは、MPEで29物質中1物質

### この節のまとめ

#### Balb/c 3T3細胞を用いたNR法は

- ・ vivoデータとの対応はよく、光毒性ポテンシャルを予測する上で有効
- ・ 結果を判定する上である程度の施設間信頼性を有する

#### しかし

- ・ 文献上の評価であり、データの質は十分に確かめられていない
- ・ 評価された物質数は決して多いとはいえない

### この節のまとめ

#### 現在の報告書作成後

- ・ 評価したバリデーション研究データを入手
- ・ 今後文献に記載されたデータに問題がないか確認

### この節のまとめ

#### 結論

- ・ 我々は本方法は今後光毒性評価に有用な方法となると考える。

## ZEBETより入手した EU/COLIPAデータ によるチェック

1

## 論文データと送付データの相違

λ PIF値とMPE値が両者で異なっていた。  
(対応) 詳しく検討した。

2

## 方法

- データのレベル  
論文出版後に作られた新しいソフト  
(PHOTOTOX) により算出されたPIFとMPE
- 使用するデータ  
Phase II論文のデータ

3

## 方法

- 解析方法  
(1)論文データと送付データによるPIF、  
MPEの相関関係の検討  
(2)論文データと送付データによる感度、特  
異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率  
の比較

カットオフポイント

- ①論文基準 PIF: 5, MPE: 0.1
- ②OECDガイドライン基準 PIF: 2-5, MPE: 0.1-  
0.15 をprobable positive

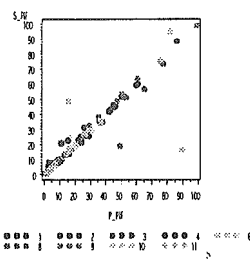
4

## 結果

(1)論文データと送付データによるPIF、  
MPEの相関関係の検討

PIF  
 $r=0.965$

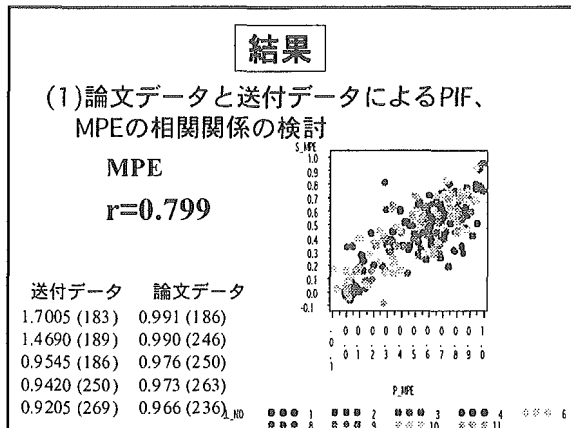
送付データ	論文データ
485257.0(186)	2073655.0 (186)
101747.0(241)	50844.1 (241)
46789.0(60)	46497.0 (60)
45719.0(182)	41216.2 (182)
40552.4(263)	32827.4 (244)



## PIF値に大きな差のあった物質

- ¥ Lab 11 のPrometadine  
論文 496.6、送付データ 192.2
- ¥ Lab 6のRose bengal  
論文 1490.2、送付データ 108.1

6



**結果**

(2)論文データと送付データによる感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率の比較

①論文基準

・Phase II 研究

PIF	感度	特異度	陽性予測力	陰性予測力	一致率
論文データ	89.2 (203)	84.4 (45)	96.3 (188)	63.3 (60)	88.3 (248)
送付データ	86.0 (200)	90.9 (44)	97.7 (176)	58.8 (68)	86.9 (244)

**結果**

(2)論文データと送付データによる感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率の比較

②OECD基準

・Phase II 研究

PIF	感度	特異度	陽性予測力	陰性予測力	一致率
論文データ	88.0 (183)	95.1 (41)	98.8 (163)	63.9 (61)	89.2 (224)
送付データ	85.2 (182)	95.2 (42)	98.7 (157)	59.7 (67)	87.1 (224)

**結果**

(2)論文データと送付データによる感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率の比較

①論文基準

・Phase II 研究

MPE	感度	特異度	陽性予測力	陰性予測力	一致率
論文データ	93.1 (203)	84.4 (45)	96.4 (196)	73.1 (52)	91.5 (248)
送付データ	93.0 (200)	79.5 (44)	95.4 (195)	71.4 (49)	90.5 (244)

**結果**

(2)論文データと送付データによる感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率の比較

②OECD基準

・Phase II 研究

MPE	感度	特異度	陽性予測力	陰性予測力	一致率
論文データ	92.9 (198)	88.4 (43)	97.4 (189)	73.1 (52)	92.1 (241)
送付データ	92.9 (196)	81.4 (43)	95.8 (190)	71.4 (49)	90.8 (239)

**結論**

送付データと論文データの比較を行った

- 相関係数  
PIFは0.97と高い、  
MPEは0.80とPIFに比べ低い
- 感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率  
送付データは論文データに比べ  
PIFは感度、陰性予測力、一致率は低下、  
MPEはすべての項目が低下

12

## 入手データを用いた in vivo結果との対応性および gray zone設置の影響の解析

13

## phase IIおよびphase IIIデータによる対応性解析 (1)

	MPEでの評価		PIFでの評価	
	試験数 *	%	試験数	% PIF計算不能を 除いた計算
false negative	15	6.30	22	9.24
positiveをprobableに	4	1.68	20	8.40
false positive	9	10.58	2	2.35
negativeをprobableに	1	1.17	4	4.70
true negative	71	83.52	75	88.23
true positive	217	91.17	194	81.51
総数	323		317	
陽性物質試験数	238			
陰性物質試験数	85			

\*: 施設毎の該当する被験物質数を総和した値

14

## phase IIおよびphase IIIデータによる対応性解析 (2)

(PIF, MPEの強い刺激判定を採用しての評価)

	試験数	%
false negative	14	5.88
positiveをprobableに	5	2.1
false positive	9	10.58
negativeをprobableに	1	1.17
true negative	71	83.52
true positive	217	91.1
総数	323	
陽性物質試験数	238	
陰性物質試験数	85	

15

## 送付データからの解析のまとめ

- 光毒性の有無に関する生データからの解析結果と論文からの解析結果はほとんど同じ。
- 評価の一致率は約90%と極めて良かった。
- PIFとMPEの両方の指標を計算し、強い方の結果を判定に利用することによりfalse negativeを0.5%程度減らせた。
- gray zoneを設けることでfalse negativeは減少したが、完全には無くならなかった。

16

## 濃度作用曲線の解析結果

- ① 濃度作用曲線の施設間差が大きかった。
- ② 光照射でviabilityが高くなるがあった。
- ③ 薬物濃度の上昇にともないviabilityがあがることがある。
- ④ 中間用量以上で光照射による毒性増強が見られない場合がある。
- ⑤ 光照射の影響はないが、光非照射群でviabilityが上がった結果としてMPE値が大きくなった場合があった。

17

## 濃度作用曲線検討から 判ったこと

- 施設により実験技術に大きな差があった。
- プロトコールの改善が必要かも知れない。
- 濃度作用曲線を見て判定することが必要。

18

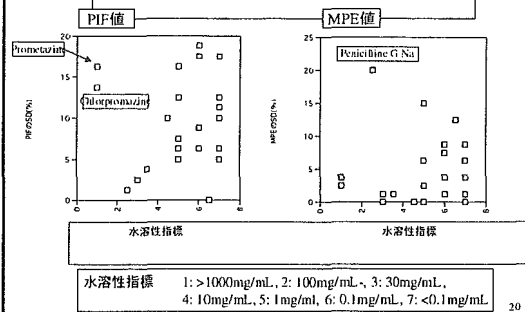


### 光毒性の判定に差のあった被験物質

	試験数	false negative	probable	水溶性	ethanol溶解性
Amliclarone	9	1	2	0.07g/100ml	1.38
Anthracene	8	2		不溶性	1g/67ml
Fenofibrate	8	1		実質的に不溶性	slightly sol
Furosemide	8	4	1	slightly sol	less soluble
Ketoprofen	8	1		slightly sol	soluble
Musk ambrette	8	1			
Nalidixic Na	8	1		0.1g/ml	0.9g/ml
Ofloxacin -h	8	1	1		
Demeclocycline HCl	4	1			

19

### 3T3-NR法における評価のバラツキと水溶性との関係



20

### まとめ

- Spielmann教授より提供されたデータファイルにより論文データの確認ができた。
- 評価結果がばらついた原因の多くが技術的なものであると推定され、被験物質の溶解や光照射条件、また、培養方法についての訓練が必要と思われた。
- Furosemideについては施設による評価に差がある原因を推定できなかった。
- グレイゾーンの設置によりfalse negativeを減らすことができた。
- 水溶性の低いものでばらつきが大きい傾向があった。

21

### 評価会議および評価委員会による総合評価

- ¥ 3T3-NR法は光毒性の有無を判断するための方法として信頼性が高い。
- ¥ データのバラツキを最小限にするための技術訓練が必要である。

22

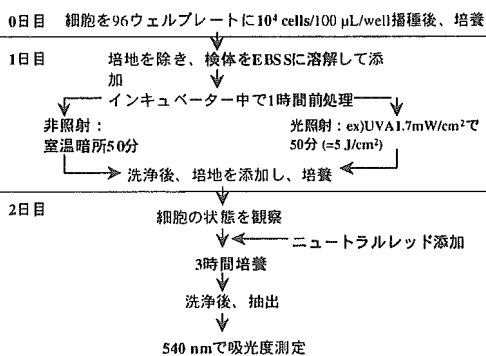
## 推奨する 光細胞毒性試験プロトコール

食品薬品安全センター  
秦野研究所  
田中憲穂

## はじめに

代替法評価委員会での光細胞毒性試験法の評価結果に基づき、基本的にはOECDガイドライン (GL) 案に準じて、照射条件や細胞株、試験条件などの具体的方法についての留意点をまとめ、推奨プロトコールとしてまとめた。

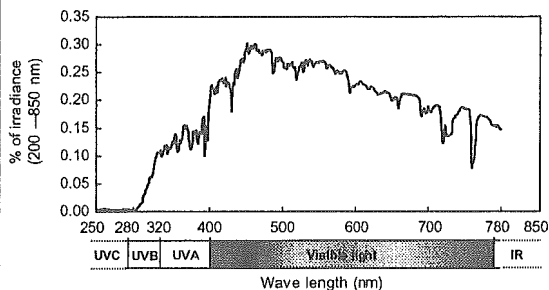
## 光細胞毒性試験の方法



## 試験実施上のポイント

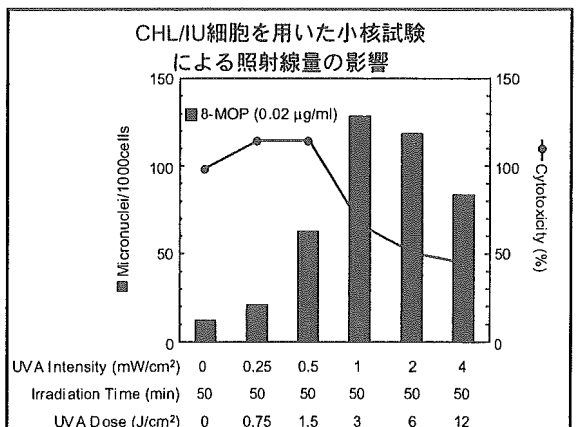
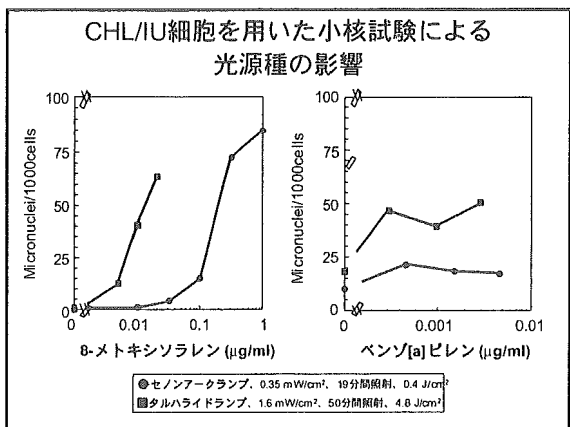
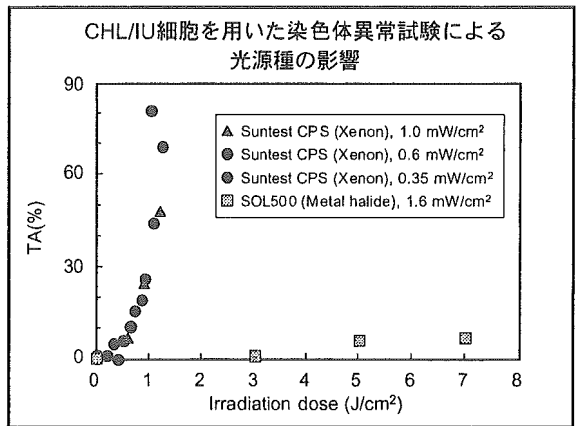
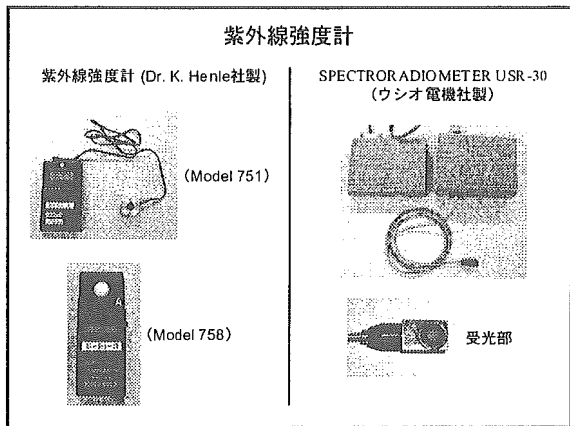
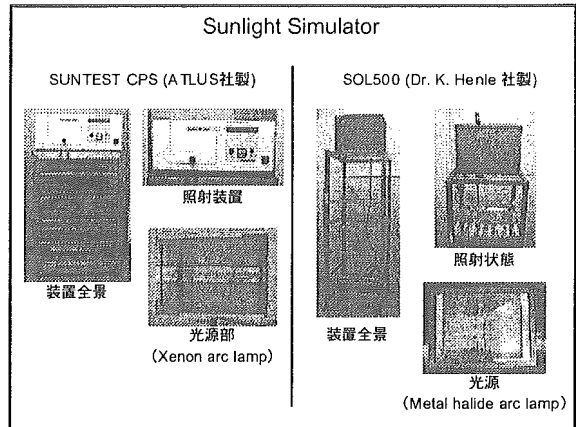
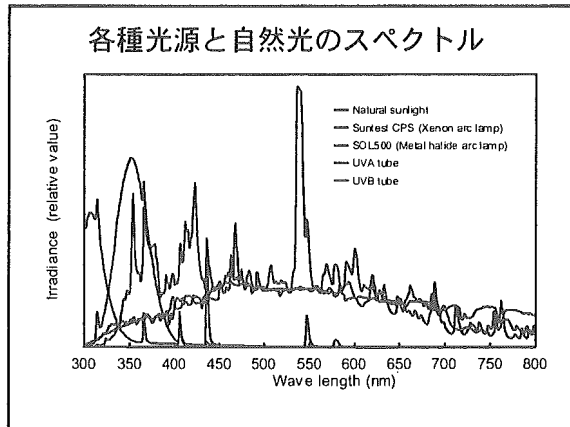
- ¥ 照射光源 (太陽類似光)
- ¥ 線量測定器
- ¥ 用いる細胞種
- ¥ 適用する細胞毒性試験法
- ¥ 照射時間と線量

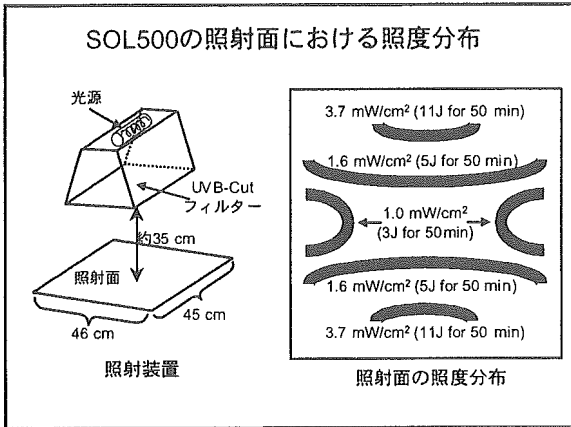
## 自然太陽光のスペクトル (1999年9月9日、秦野)



## 光源(ランプ)の種類とUV線量計

- ¥ OECDのGL案 (March, 2002) では太陽類似光を推奨している。バリデーションでは、Dr.Honle社のメタルハライドランプが用いられ、このデータをもとに案が作られている。
- ¥ 他の光源を用いる場合は、背景データが十分にあり、評価されている事が望ましい。メタルハライドランプやキセノンランプが一般的である。
- ¥ UV線量計はその機器の特性により示す値が異なり絶対的な表示でない。同じ機器で定期的に校正して用いるとよい。

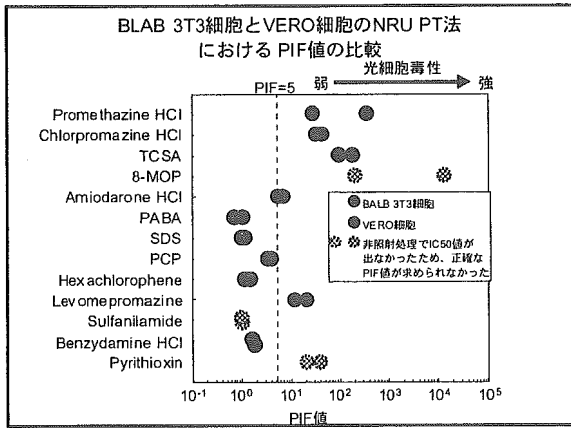




### 使用する細胞種

¥ OECD GL案ではBALB3T3細胞を使用しているが、他の細胞でも可としている。

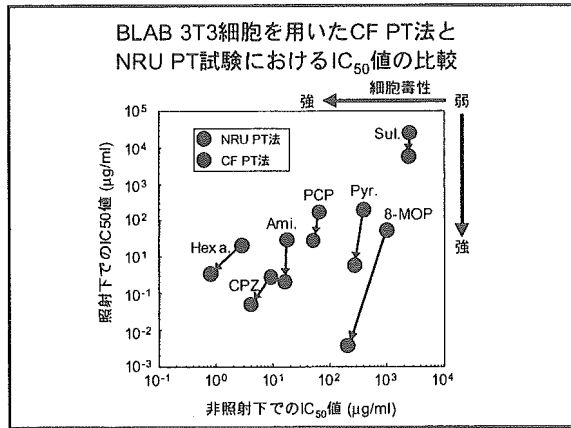
¥ 他の細胞を用いる場合は、十分な背景データがあり、評価されていることが必要である。



### 適用する細胞毒性試験

¥ OECD GL案ではニュートラルレッドアッセイ (NR法) が適用される。NR法は通常の細胞毒性試験でも安定した方法として評価されている。

¥ 十分に評価されていれば他の方法でも良い。例えば、コロニー形成法、CV法、MTT法なども考えられる。



### 代謝活性化法の適応

¥ 化学物質は代謝されて毒性を発現するもの、逆に、無毒化されるものがあり代謝系の導入が望ましいが、現時点ではできない。

¥ その理由として、添加するS9の蛋白や添加される補酵素による妨害が示唆されている。