

## 補足 1) EU/COLIPA のバリデーションデータからの論文データの確認、個別データからの評価のバラツキ原因の検討、およびグレイゾーン設置の影響についての検討

担当：大野泰雄

### 1) はじめに

EU/COLIPA のバリデーションの中心となった機関である ZEBET の Dr Spielmann より下記 2 論文の基礎となったバリデーションデータと用いられたプロトコルの提供を受けた。そこで論文データの確認作業と誤評価となった施設や被験物質を中心にデータの検討を行った。その結果を示す。

- 1) 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.
- 2) 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.

### 2) 論文データとの整合性について

#### 施設について

第二および第三相のバリデーション論文に示された全ての施設のデータが入手できた。なお、論文では施設名は匿名とされていたが、個々のデータをつき合わせることでにより推定した。

#### PIF 値の整合性について

chlorpromazine、prometadine、rose bengal、penicilline G について論文に示された PIF 値と提供データに示された値と比較した。その結果両者の値は全く同じ値ではなかったが、データ解析に用いた用量作用曲線の推定のためのソフトウェアが両者で異なることによるものであることがデータとともに Dr Spielmann より提供された Bjorn Peters and Hermann-Georg Holhutter の論文に示されている (ATLA : In print)。また、両者の PIF 値に大きな差はなく、相関係数は 0.965 であることを確認した。なお、Hoffman の prometadine については 2 倍程度の差があったが、それほど大きな差ではないとされた。一方、Warsaw の rose bengal の PIF データは論文 (1490.2) と報告 (108.128) に 10 倍の差があったが、phase II データに示された用量作用曲線から、これはデータの転記ミスであると推定された。

#### MPE 値の整合性について

MPE 値に関しては以下の表に示したように、nalidixic acid sodium salt を例に、大きな差が有ることが確認された。被験物質全体としても、論文値と提供データからの計算値の相関は 0.799 と、この他の薬物についても大きな差があった。

Nalidixic acid sodium salt の MPE 値について

施設名（論文における施設番号）	論文	送付データ（Nalidixic fr）
Beiersdorf（Lab 4）	0.790	0.195
FRAME（Lab 9）	0.842	0.17
Hoffmann（Lab 11）	0.633	0.643
P&G（Lab 1）	0.312	0.214
Warsaw（Lab 10）	0.168	0.081
ZEBET（Lab 6）	0.102	0.242
Henkel（Lab 3）	0.717	0.616
Loreal（Lab 2）	0.417	欠如
Unilever（Lab 3）	0.539	0.440

この原因についてはデータとともに提供された Bjorn Peters and Hermann-Georg Holhutter の論文に議論されている（ATLA：In print）。上の用量作用曲線推定のためのソフトの相違以外に MPE 計算のために使用した測定点数が提供データでは多くなったことによる。

光毒性評価結果の整合性について

提供されたデータから、false negative や false positive 等について解析した。なお、この解析においては評価報告書の 4-2-2-2) に示した畑尾の解析とは異なり、被験物質は全て別の物として扱い、送付データから論文の結果を調べた。また、同一の被験物質を複数の施設で試験を行っているがそれらの試験数は施設数とした。phase II と phase III の結果をまとめて以下に示す。

	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			

PIF, MPE の強い刺激を採用しての判定	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	

これらの結果から、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であり、3T3-NR 法の信頼性についてはそれらの両面から確認された。また、評価の一致率が  $(71 + 217) / 323 = 0.891$  と約 90% ということは極めて予測性が良いと言える。

なお、PIF と MPE の両方の指標を計算し、強い方の結果を採用することにより false negative を 0.5% 程度減らせた。また、false negative は gray zone を設けることで減少したが、完全には無くならなかった。しかし、動物実験データの信頼性について宮地先生から疑問が呈されていることや、ヒトでのパッチテストでも陽性物質として著明な物質でも 1% 前後の陽性率であること (Spielmann *et al*, ATLA 28, 777-814, 2000)、また、最終的にヒトで試験することを考えれば、false negative が 5.88% であるという値は充分低いと言える。

### 3) 用量作用曲線の検討

スクリーンに投影されたバリデーションデータから、施設により評価に相違のあった物質を中心に、用量作用曲線を検討した。その結果、①データには光照射群で非照射群より viability が高くなることもあること (Beiersdorf : hexachlorophen, FRAME : bergamot oil, Hoffmann : acridine)、②薬物添加群でも同様の事があること (Henkel : furosemide, Hoffmann : PABA, Warsaw : chlorhexidine)、③薬物濃度の上昇にともない viability があがることもあること (Beiersdorf : neutral red, Henkel : neutral red, Hoffmann : neutral red, ZEBET : neutral red)、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こと (Henkel : PABA)、⑤光照射で影響は出ていないが、光非照射群で viability が上がり結果として MPE 値が大きくなった場合 (Hoffmann : penicilline)、⑥非照射群のデータにバラツキの極めて大きい場合 (P & G : 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone, 5-methoxypsoralen, methylcoumarin, acridine, amiodaron, furosemide など) があることが判明した。ただし、これらと予測の施設間のバラツキとの関係については対応性を明らかにすることはできなかった。

なお、用量作用曲線からみるとかなりはっきりしているものでも PIF 値あるいは MPE 値で陽性と捉えられないことがあった (Hoffmann : amiodaron, musk, Warsaw : amiodaron, bergamot, ZEBET : amiodarone, bergamot, FRAME : bergamot, Henkel : bergamot, fenofibrate 等)。それらは、低用量域でのデータが重なるとき、非照射の用量作用曲線が横軸に平行のとき、用量作用曲線がなだらかなときにその傾向が認められた。

これらの結果は施設により技術レベルに大きな差があることを示している。技術レベルの向上あるいはプロトコル上での改善が必要と思われた。また、特に境界付近の結果が得られた時は chart 上でのデータの分布と用量作用曲線の形を検討する必要があると思われた。

送付データによる解析による IC50 値レベルでの施設間の差に関しては用量反応曲線が 50% まで落ちていなく結果が多く、施設間差を評価できなかった。

4) 施設間の評価結果のバラツキの検討

phase II 試験の 8-9 施設のデータおよび phase III の 4 施設のデータにおいて false negative となった物質についてその特性を以下に示した。

	試験 数	false negative	probable	コメント	水溶性	ethanol 溶解性
Amiodarone	9 %	1 12.50	2 25.00	Henkel 社のみ で細胞毒性が 高用量でも出 ていない。	塩酸塩で 0.07g/100ml	1.28
Anthracene	8 %	2 28.57			不溶性	1g/67ml
Fenofibrate	8 %	1 14.29		Henkel 社のみ	実質的に不溶性	slightly sol
Furosemide	8 %	4 42.86	1 14.29		slightly sol	less soluble
Ketoprofen	8 %	1 14.29		Warsaw のみ	slightly sol	soluble
Musk ambrette	8 %	1 14.29		Henkel 社のみ		
Nalidixic sodium salt	8 %	1 14.29		Warsaw のみ	0.1g/ml	0.9g/ml
Ofloxacin -h	8 %	1 14.29	1 14.29	FRAME と P&G		
Demeclocycline hydrochloride	4 %	1 25.00		P&G のみ		

amiodarone については水溶性が低いことによる artifact および細胞毒性が比較的強いことによる影響が考えられる。(Henkel 社のみ 1mg/mL でも細胞毒性が現れていないが、他の施設では 50µg/mL 以下で細胞毒性が現れている。)

anthracene については水溶性が極めて低いことから培養液中での分離等による影響が考えられる。(Henkel 社と ZEBET のデータは他施設とはかけ離れていた。また、Henkel 社では 5mg/mL でもなんら細胞毒性が現れていない。)

fenofibrate については Henkel 社のみ、ketoprofen については Warsaw 社のみ、Musk ambrette については Henkel 社のみが、nalidixic acid sodium salt では Warsaw 社のみ、demeclocycline については P & G のみ他とはかけ離れた用量作用曲線を示しており、

何らかの technical error と思われる。

ofloxacin については FRAME と P & G が他の施設とはかけ離れた用量作用曲線を示しており、やはり何らかの technical error と思われる。

furosemide については施設により差があるだけでなく、同一施設でも結果に差のあることがある。また、false prediction が出た理由が不明であり、更に検討を要する。

なお、2 回の繰り返し実験を行っているが、2 回とも誤評価しているものは少なく、多くは一方が正しい予測をしている。

これらの結果も技術レベルを向上させることにより、誤判定を防ぐ必要性を示している。特に、被験物質の溶解法や溶解の確認についての教育も必要であることを示している。また、2 回の繰り返し実験での評価が食い違い、陰性となった時 (P & G : amiodaron MPE, Warsaw amiodaron PIF, furosemide MPE, FRAME : bergamot MPE, Henkel : furosemide MPE, P & G : ofloxacin MPE) には被験物質の溶解等に留意しながら再試験を行うことにより、誤評価を最小にできるものとする。

## 5) グレイゾーンの設置について

OECD のガイドライン案では PIF が 2-5, MPE が 0.1-0.15 の間をグレイゾーンとして “probable phototoxicity” と評価することが提案されている。今回、このグレイゾーンの設置による影響を検討したところ、1-1) および 1-3) に記載した表でも判るように、false negative を完全になくする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) まとめ

Dr Spielmann より提供されたデータパッケージにより論文データの確認ができた。また、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る。しかし、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。また、グレイゾーンの設置により false negative を減らすことができることが確認された。