

- Itagaki, H., Ohno, T., Hatao, M., Hattori, C., Hayasaka, A., Hayashi, M., Hori, H., Imai, K., Imazeki, I., Ishibashi, T., Kakuma, M., Kato, M., Kawakami, A., Kitazawa, M., Kogiso, S., Miyazaki, S., Mori, M., Nakajima, K., Nakajima, M., Nakamura, M., Omori, T., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saiji, K., Sano, Y., Sasaki, T., Sato, S., Shimada, H., Shimogo, S., Sugawara, H., Sugimoto, S., Takizawa, M., Tamaki, C., Tanaka, N., Teramoto, N., Tsuchiya, T., Ueno, H., Ugai, Y., Wada, S., Wakuri, S., Wang, X., Watanabe, I., Yamakita, O., Yoshida, M., Yoshimura, I. and Yukiya, S. (1998b) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-VII. Details of the MTT Assay, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 119-130.
- Ohno, T., Futamura, Y., Harihara, A., Hatao, M., Hayasaka, A., Hayashi, M., Hirata, Z., Imazeki, I., Itagaki, H., Iwata, T., Kakuma, M., Kato, I., Kato, M., Kawakami, A., Kazama, A., Kido, A., Maki, D., Matsuda, M., Mitsuoka, C., Miyazaki, S., Mizuno, F., Mori, M., Morimoto, K., Moriysu, M., Nakajima, K., Nakamura, M., Nakano, N., Nishitomi, T., Ohkoshi, K., Okamoto, Y., Omori, T., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saiji, K., Sasaki, K., Sasaki, T., Sato, S., Shimogo, S., Shionoya, H., Sugawara, H., Sugimoto, S., Takagaki, K., Takizawa, M., Tanaka, N., Teramoto, N., Torishima, H., Tsuchiya, T., Wada, S., Wakuri, S., Wang, X., Watanabe, I., Ymagata, Y., Yamakita, O., Yamamoto, R., Yoshimura, I. and Yukiya, S. (1998c) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-VIII. Details of the Neutral Red Uptake Assay, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 87-98.
- Borenfreund, E. and Puerner J.A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red, *Toxicol Lett.*, 24, 119-24
- 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., 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.

#### 4-2-2) バリデーションデータの評価（バリデーションとしての妥当性、結果の従来法との相関性、統計解析の妥当性）

##### 4-2-2-1) バリデーションデータの質

担当：大森崇、小島肇夫

##### A. はじめに

バリデーションは特定の代替法の妥当性を評価する上で欠かせないステップである。特に代替法が行政的に受け入れられるか否かを判断するためには当該行政上の対象とする物質群について複数の施設でその妥当性が示されなくてはならない。この施設間バリデーションにおいては、明確に定められた同一のプロトコルを用いて複数の

施設で試験を実施するものであり、個々の施設ではプロトコルに厳格に従って試験を実施する必要がある。その際、必要に応じて SOP を充実させることが重要であり、定められた SOP の遵守状況は研究の結果に大きな影響を与える。また、各施設で実施された試験データの収集方法や状況、評価時に計算から除外されるデータの取り扱い等も、施設間バリデーション研究の質を評価する上で重要な要素である。

このようなデータの質を第三者がチェックするためには、プロトコル、生データ、データの修正記録、データ検討会の議事録等を確認する必要がある。公表論文からこれらをチェックすることは、一般に非常に難しい作業である。しかしながら、データの質に関する記述が公表論文にまったくないわけではない。ここでは、今回の評価の対象となった EC/COLIPA で実施された Balb/c 3T3 細胞を用いた光刺激性試験代替法の施設間バリデーション研究結果が記載されている文献<sup>1-3)</sup>に基づき、このバリデーション研究の質について検討した。

通常、施設間バリデーション研究は、事前の予備的な検討とそれによって作成されたプロトコルを検証する段階の 2 つの相で行われる。EC/COLIPA で実施された施設間バリデーション研究の場合も、予備的な検討として Phase I 研究 (Spielmann *et al.*, 1994) が、検証段階として Phase II 研究 (Spielmann *et al.*, 1998a) が実施された。さらに、陰性物質の評価に関する情報を得るために、Phase III 研究 (Spielmann *et al.*, 1998b) として UV filter chemicals を被験物質に加え、追加研究が実施され、その結果が報告されている。Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red の取り込みを指標とする光毒性試験法 (3T3-NR 法) の施設間バリデーションについて報告している文献はこの 3 報のみであったことからここでは、この 3 つの報告の内容について評価を行う。我々が評価した文献は下記の 3 報である。

#### ・ 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 : Results of Phase II (Blind Trial). Part 1 : 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.

また、ここでは、3 報のデータの質について評価を行う上で我々が注目した点をチェックリストとしてまとめた。このリストは、まだ十分な検討を必要とするものであるが、今後の代替法バリデーション研究のデータの質をチェックする上での参考になるであろう。

### B. 質を確保するためのプロトコルや SOP の工夫

3 つの研究のいずれについても、実施されたプロトコルの詳細は不明であった。また、どのような SOP に基づくのかも文献には明確に示されてはいなかった。文献に記載された範囲において、データの質を確保する上で工夫がなされていたと思われる点を以下に示した。

#### B-1 Phase I 研究

- ・すべての施設で同じ UVA 照射器 (SOL500) が用いられた。

- ・細胞の継代数の標準化が行われた。しかし、これは実施前に行われたことかどうか不明であった。
- ・試験における最高用量（濃度）が定められ、その用量で光照射しても毒性が見られない場合には光毒性を無しと判断した。

## **B-2 Phase II 研究**

- ・用いられる UV 照射器は同一のもの（SOL 500）に統一された。（実際には 1 施設が異なる照射器を使用した。）
- ・SOP は主施設がドラフトを作成し、すべての施設で確認され、必要に応じて改訂され、承認されたものが統一 SOP として使用された。（細部が施設ごとに独自の方法を用いる可能性があったかどうかは不明である。）
- ・被験物質は試験に関与しない第三者によりブラインド化され配布された。
- ・Phase I で用いられていた予測モデルである PIF は、照射の有無による 2 つの用量反応曲線から得られる IC50 から算出されるが、用量反応曲線の形により IC50 が得られない場合には値として PIF を得ることができないため、そのような場合においても計量値としての得ることができる MPE も予測モデルとして評価尺度に加えられた。
- ・各施設における個々の被試験物質評価は、同一の試験を独立に 2 回行うことによるとされた。

## **B-3 Phase III 研究**

- ・基本的に Phase II 研究の SOP に従い試験が実施された。
- ・被験物質溶解のための溶媒の使用法と被験物質の適切な濃度に関する SOP が新たに作成された。
- ・被験物質はブラインド化された。（Phase II と同じ）

## **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**

試験結果を評価する時、プロトコール違反や SOP 違反、また、データの不整合がないに越したことはないが、どのようにプロトコールや SOP を工夫しても、施設間バリデーションにおける誤りや誤解の発生の可能性を完全になくすることはできないであろう。また、試験実施前にプロトコールに不備等が見つかった場合にプロトコールの変更がなされることもあるだろう。プロトコールの変更、誤り・不明な点・記録不足などに対するデータの扱い、結果としての防止できなかった逸脱状況を調べることは、研究結果の質を評価する際に重要な点の一つであり、OECD の報告<sup>4)</sup>でも GLP 基準に準じて試験結果の作成、実施、記録が必要とされている。

3 つの研究の中で、この点について詳細な記載をしていたのは、Phase II 研究のみであった。これは Phase II 研究が検証試験として位置付けられた研究であったためかもしれない。しかし、施設間バリデーション研究は複数施設で試験が実施される研究であり、施設間の違いを評価することが研究の目的の一つであることを考慮すると、各施設から得られたデータの取扱いについての記載がなされていることが望ましい。以下に 3 つの研究におけるプロトコールの変更、データ収集時の手続き、プロトコールの逸脱について記載されている点をまとめた。

### **C-1 Phase I 研究**

- ・除外されたのか、求められなかったのかは不明であるが、用量当たりの例数が物質によって異なっていた。
- ・評価尺度（PIF）を計算できた物質は 20 物質中 15 物質であった。

### **C-2 Phase II 研究**

- ・MS EXCEL スプレッドシートによりデータの提出がされた。（詳細なフォーマット形式が指定されていたかどうかは不明）
- ・規定通りのデータが完全に得られているかどうかチェックされた。
- ・すべてのデータシートに記入されている数値の形式がチェックされた。

- ・濃度単位誤入力の有無のチェックがされた。
- ・SOPからの逸脱の有無と結果への影響がチェックされた。
- ・評価した9施設中1施設について、30物質中14物質が、照射の有無についての2つの試験が同時に行われなかったため、SOP不適合となった。
- ・vivoデータの質が不十分であるとみなされたため、1物質のデータがvivoデータとの対応性の評価の計算から除外された。(この物質を評価した施設が8施設あったため、256データ中8データが除外された。)
- ・被験物質の溶媒として、SOPにはEBSSを使用することが勧められていたが、必要な場合にはエタノール等の溶媒を用いることが記載されていたため、施設により使用された溶媒に差が生じた。(結果は大きな違いがなかったと考察された。)
- ・UV照射器にSOL 3を用いた一施設あった。(両者のスペクトルは非常に似ているため違いは小さいと考察された。)
- ・試験の最適な濃度の選択についてSOPに規定されていたが、低い濃度を選択した施設があった。
- ・同一実験を2回施行することになっていたが、2回の施行で異なる溶媒を用いた施設があった。

### C-3 Phase III 研究

- ・2回の試験のうちPIFまたはMPEが求まらないデータはなかった。
- ・PIFとMPEの値は各施設で同一のソフトを用いて求められた。

### D. 研究間の違い

3つの研究は一連の研究であるために、基本的には同一の試験方法で実施されている。しかし、研究が進むことにより、新たな進展が見られる。以下に研究間の違いをまとめた。

- ・予測モデルとして、Phase I研究ではPIFを用い、Phase II試験以降はPIFと共にMPEも用いられている。
- ・Phase III研究では被験物質はブラインド化されているが、ブラインド化の各物質について適切な溶媒や濃度範囲が指定されている。

### E. データの監査

実施された試験のデータの質を確保することは、データの信頼性、再現性、客観性を保証することになる。そのためには、評価に用いるデータの源となる各施設に対する規範と第三者による監査が必要となるであろう。ここでは、文献による評価について議論を進めているが、文献による評価ではこの作業を我々が行うのは実際上不可能である。また、今回検討したいずれの文献にも監査が、第三者により行われたという記載はなかった。また、文献には、PIFやMPEを求めるために使用された生データ、試験情報までは示されておらず、このレベルにおける質の評価は不可能であった。

### F. 質の評価

ここでは、EC/COLIPAで実施されたBalb/c 3T3細胞を用いたNR法のバリデーション研究結果が記載されている文献に基づき、質の評価を行った。3つの研究を比べると、特に主要なバリデーション研究となった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が行われていたのかがよく記載されている文献であるといえよう。他の2つの研究は、質について判断するために必要な情報に関してあまり詳細な記載がない。このことは、質が良いとか悪いということではなく、質について評価ができないということを意味する。その意味では、Phase II研究は、他の2つの研究に比べて信頼性の高い結果といえるであろう。代替法のバリデーションやその行政的受け入れのための基準についてはOECD (OECD, 1996) で示されているが、バリデー



ション研究を文献評価のみで行う際に報告される文献中にどのような記載が必要であるかを明確に記述した文書はない。後述するように、ここでは、これについてわずかながらの提言をしている。

また、項目 E で記述したように、文献による質の評価は、生データがどのように得られたかについてまでのことを知ることはできない。今後、動物実験代替法が化学物質の評価方法の一つとして行政的に受け入れられるようになるためには、バリデーション研究のデータの質を保証するために、何らかの形で第三者が生データや、試験の実施状況や研究の進行状況を確認するための記録等が必要となるかもしれない。

## G. 提言

試験の結果を評価する上で、データの質を論じることは重要であるが、文献評価の場合には、記載がされてなければ、どのようなことが行われているかは不明となってしまう。記述されていないことは、質がよいことを保証しているわけではなく、不明であるというだけであるので、第三者が文献を評価する場合には、その部分は不明であると判断するほかは無い。しかし、例えば、データの一致性のチェックが、その研究の中で行われているということが研究結果を報告する文献中に記載されていればチェックがされたことは知ることができる。このような記載がないものとあるものとは、質の評価を変えるべきであろう。我々が今回評価を行う際には、文献レベルでのバリデーション研究の質の評価法を構築する必要が生じた。これらを解決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されているかをチェックするためのチェックリストの使用があげられる。その際に問題になるのはどのような項目を用いるかであるが、参考にすべきものが特になかったため、Phase II 研究を参考にチェックリストを作成した。これを付録に示す。Phase II 研究を参考にした理由は、この研究の報告が、データの質という点に関してよく記載されていたためである。このようなチェックリストを利用した時にチェックができない項目が多い場合は、試験の質について言及できない試験ということになるであろうし、そうでない場合は、試験の質が配慮された試験ということになるであろう。このチェックリストはまだ改善される余地が十分にあるが、リストが公になり、ここで記載されている項目が注意して論文に記載されるようになれば、試験の質はおのずと高くなるであろうし、求められる研究のあり方だと思われる。

上記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は限界がある。例えば、各施設のそれぞれの用量反応曲線を得るための生データまで文献に記載されることはないであろう。つまり、文献による質の検討では、この本当に記載されている予測モデルの値等が正しいかどうかを確認するというような評価は不可能である。

## H. 結論

文献のみによる質の評価は十分には行えない。従って必要に応じて独自のバリデーションを行い、試験法の妥当性を確認する必要がある。このバリデーションの規模と内容は事前に得られているデータの質の評価結果に依存している。

## 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., Balls, M., Dupuis, J., Papa, W.J., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothie, 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.
- OECD, Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods. ENV/MC/CHEM/TG(96)9.1996