

評価報告書

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の
組み合わせによる光毒性試験代替法

平成 22 年 1 月

国立医薬品食品衛生研究所

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる 光毒性試験代替法

目次

評価会議報告書	
・ 1	
第三者評価報告書	
・ 5	
バリデーション研究報告書	
31	
総括報告書	
第一次バリデーション研究報告書	
補完実験報告書	
バリデーション研究計画書	
59	
第一次バリデーション研究計画書	
補完実験計画書	
プロトコール	
69	
酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム	
酵母光生育阻害試験プロトコール（平成 15 年 11 月 25 日）	
酵母光生育阻害試験プロトコール（平成 18 年 12 月 6 日）	
赤血球光溶血試験プロトコール（平成 15 年 11 月 25 日）	
光毒性評価方法の提案	
・ 105	

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる
光毒性試験代替法の評価会議報告書

平成 21 年 8 月 5 日

JaCVAM 評価会議

井上 達（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）
吉田武美（昭和大学薬学部）
横関博雄（東京医科歯科大学）
中村和市（日本製薬工業協会）
小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）
吉田 緑（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 病理部）
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部）

吉村 功（東京理科大学）*

岡本裕子（日本化粧品工業連合会）*

*：バリデーション関係者のため、本評価に関してはオブザーバー

オブザーバー：JaCVAM 運営委員

大野泰雄（国立医薬品食品衛生研究所）
増田光輝（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）
小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 薬理部）
秋田正治（日本動物実験代替法学会会長）

光毒性試験代替法である酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法について、第三者評価委員会からの報告を受け、以下の7項目について審議した。本項目はOECD ガイダンス文書 No. 34 に示された検討項目である。

<検討項目>

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。
5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。
6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。
7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。

<審議内容>

1. 検討対象の試験法とその妥当性を示すデータは、透明で独立な評価を受けているか。
バリデーション結果は、厚生労働科学研究報告書には掲載されており、すでに公表されている。開発者の報告は論文になっているが、バリデーション研究の論文はない。
本評価は、独立した専門家による第三者評価機関によってなされた。
2. 当該試験法で得られるデータは、対象毒性を十分に評価あるいは予測できるものであるか。データは、当該試験法と従来の試験法の、代替法としての繋がりを示しているか。あるいは（同時に）そのデータは、当該試験法と、対象としているあるいはモデルとしている動物種についての影響との繋がりを示しているか。
 - ・ 難水溶性物質の評価が長所と挙げられているが、そのためのデータが少ない。一致度は70%程度である。
 - ・ 3T3-NRU との直接的な比較はなされていない。
3. 当該試験法は、ハザードあるいはリスク、あるいはその両方を評価するのに有用であるか。
 - ・ ハザード評価に有用である。リスク評価には利用できない。
 - ・ 偽陰性が少なく、偽陽性が多い。
4. 当該試験法とその妥当性を示すデータは、その試験法で安全性を保証しようとする、行政上のプログラムあるいは関係官庁が対象としている化学物質や製品を、十分広く対象としたものとなっ

ているか。当該試験法が適用できる条件及び適用できない条件が明確であるか。

バリデーション研究に用いた被験物質が少ないので、適用条件の詳細を明記できない。

5. 当該試験法は、プロトコルの微細な変更に対して十分頑健で、適切な訓練経験を持つ担当者と適切な設備のある施設において、技術習得が容易なものであるか。

- ・ 技術習得は容易である。
- ・ プロトコルの微細な変更に対する頑健性は不明である。
- ・ 特殊な機器は必要ない（ソーラシミュレーターを除く）。

6. 当該試験法は、時間的経費的に有用性があり、行政上で用いられやすいものであるか。

- ・ 時間と手間が掛かる。
- ・ 経済的にはメリットがある。
- ・ 偽陰性が少ない点で行政的な利点がある。

7. 当該試験法は、従来の試験法と比べて、科学的・倫理的・経済的に、新しい試験法あるいは改訂試験法であることが正当化されているか。

- ・ 科学的には異なる指標を組み合わせることで、偽陰性が少なくなることから妥当である。
- ・ 動物実験と比較して、倫理的に妥当である。
- ・ 経済的には安価になる。

8. 試験法への推奨

- ・ バリデーション結果が不足している。
- ・ 確定したプロトコルで多数の被験物質を用いた検証が必要である。
- ・ 難水溶性物質に有用であることを示す必要がある。

以上の審議の結果、JaCVAM 評価会議は、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる 光毒性試験代替法に関しては、評価会議が推奨した結果が得られるまで行政的な提案を行わないと結論した。

参考文献

1. 酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる 光毒性試験代替法の第三者評価報告書
2. OECD (2005) OECD Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO(2005) 14

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる
光毒性試験代替法の第三者評価報告書

平成 21 年 5 月 13 日
改定平成 22 年 5 月 17 日

光毒性試験代替法の第三者評価委員会

評価委員長	笛木 修	(医薬品医療機器総合機構)
評価委員	戸倉 新樹	(産業医科大学 皮膚科学)
評価委員	小野寺 博志	(医薬品医療機器総合機構)
評価委員	今井 弘一	(大阪歯科大学 歯科理工学講座)
評価委員	細井 一弘	(参天製薬株式会社 研究開発センター)
評価委員	山田 弘	(独立行政法人医薬基盤研究所基盤的研究部)
オブザーバー	小島 肇	(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

要旨および結論

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法の有用性を評価した。本評価法の提案者である(株)資生堂品質評価センター(以下、資生堂)による検討試験では、香料、紫外線吸収剤、医薬品、抗菌剤、染料といった分類から、既に *in vivo* で光毒性が評価済みの 24 物質の評価が行われており、十分な感度と *in vivo* 判定との一致率が得られている。この結果の普遍性を示すために、日本動物実験代替法学会により多施設バリデーション試験が実施された。一次バリデーション試験では 9 物質が用いられ、試験実施施設(6 施設)に 6 品目ずつ名称を隠し、コード化して供与された。試験に際しては実施に先立って技術講習会が行われ、GLP の原則に則ってプロトコールに従って実施された。施設内再現性を見たところ、1 施設(施設 b)で、特に再現性が悪く、この理由として他施設を借用して試験を実施したため、実験環境の制御に困難性があったことが挙げられている。施設間再現性についても 4 物質(Acridine、BMDM: 4-t-butyl-4-methoxydibenzoylmethane、CHD: Chlorhexidine および Bithionol)を除き、施設間で結果が一致せず、再現性は良好とはいえない結果であった。また、CHD および Bithionol は *in vivo* で陰性物質と判断されているものの、本試験結果では陽性との判断がなされており、逆に *in vivo* で陽性とされた物質で疑陽性あるいは陰性と判断される場合が存在した。一次バリデーション試験の結果において、施設 b の結果を除外し、疑陽性判定を陽性判定と見なした場合には *in vivo* 判定との一致率は 70%であった。

一次バリデーション試験の結果では、陽性物質の結果が疑陽性と判定され、結果がばらついたことから、この点を改善するために酵母光生育阻害試験の陽性結果の判定基準の変更やプレインキュベーション時間の設定等のプロトコール整備が行われ、補完試験が実施された。補完試験は一次バリデーション試験と同じ物質を用い、施設 b を除いた 5 施設で実施された。補完試験では疑陽性判定が少なくなり、施設内再現性および施設間再現性共に一次バリデーション試験に比して良好な結果が得られており、プロトコール改善の効果が認められているものと判断された。

プロトコール改善後の本試験法では、陰性物質を誤って陽性と判断する可能性はあるものの、陽性物質を誤って陰性と判断した事例はなく、安全性上の観点から *in vitro* 光毒性スクリーニングの手法として、利用可能であると考えられる。本試験法のメリットとしては、①水難溶性物質の評価が可能と考えられている。②必ずしも無菌操作が必要でなく、操作が簡便である。③比較的低コストである。等がある一方、デメリットとして、①組み合わせ(バッテリー)試験法のため、単一試験である 3T3-NRU 法に比べ試験に時間を要する。②疑陽性と判定される物質が存在する。等の問題点も存在する。また、以下に挙げるような問題点については現状で未解決であり、今後の課題と考えられる。①本試験法のメリットの一つと考えられている水難溶性物質の評価が十分に行われていない。少なくとも 4 水難溶性物質を用いたバリデーションの実施を要望する。②最終的に整備されたプロトコールにおける検討物質数は 9 物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。資生堂が過去の検討試験で用いた 24 物質程度(バリデーションが終了している物質を除く)を用いた追加検討を要望する。③3T3-NRU 法との直接比較がなされておらず、改定プロトコールでのデータを用いた結果において同等性あるいは優越性が明確に示されていない。④異なる光源を使用した際の結果の安定性についてバリデーションでは評価されていない。⑤温度上昇による結果の差異が言及されているが、この点に関する追加検討が実施されていない。⑥3T3-NRU 法と同様に、代謝活性化系が設定されていないため、経皮投与以外の全身曝露の際の安全性が評価できない。⑦バッテリーの 2 試験の実施順序を規定する必要性に関する検討がなされていない。⑧酵母光生育阻害試験における陽性判定のカットオフ値について再検討の余地がある。⑨赤血球光溶血試験の吸光度測定波長の選定

に再検討の余地がある。

以上のように、本試験法には光毒性物質のスクリーニング法として一定の有用性は認められるものの、十分な信頼性を持って実用化するためにはまだ検討すべき問題点が残っていると考えられる。

評価結果

1. 試験法の科学的および規制面からの妥当性

In vitro 光毒性試験法としては、既に 3T3 細胞を用いてニュートラルレッドの取り込みを指標とした光毒性試験法（3T3-NRU 法）が OECD の専門家会議で承認されているが、3T3-NRU 法では水難溶性の薬物において評価結果のばらつきが大きくなる可能性が示唆されている（平成 14 年度厚生労働科学研究報告書）。今回提案された評価手法は、3T3-NRU 法と同等の結果が期待でき、また、水難溶性物質に対しても比較的容易に対応が可能である。また、いずれの試験法も簡便であり、必ずしもクリーンベンチでの操作を必要としない点もメリットの一つと考えられる。

酵母光生育阻害試験は、細胞膜と細胞小器官への作用に対する毒性を通じた細胞死や増殖抑制を指標とする方法であり、赤血球光溶血試験は細胞膜破壊を指標とする方法である。提案された組み合わせ（バッテリー）試験法は両者を用いることにより、多様な作用機序に基づく光毒性を評価できると共に、光毒性のメカニズムに関する情報を得ることが出来ると考えられる。

光毒性につながる光化学反応には、光により励起された化学物質の緩和過程により、いくつかの反応がある。それらは電子伝達に基づく機構（タイプ I）、酸素のエネルギー伝達に基づく機構（タイプ II）およびそれ以外の機構に大別される。これらの機構は水の有無や媒体の種類などの試験系により大きく変化する。例えば、水系ではタイプ II の反応が中心と考えられ、有機溶媒ではタイプ I のラジカル反応が中心と考えられている。反応系が水系の赤血球光溶血試験や培養細胞を用いた光毒性試験では主にタイプ II の光毒性を捉えていると考えられるが、酵母光生育阻害試験では種々の媒体が使用可能であり、より広範囲の化合物の光毒性を捉えることができるものと期待される。

単細胞生物である酵母では、基本的に細胞に対する全ての影響を観察できるものと想定されるが、赤血球を用いた系で光毒性を検出できた物質の一部は、酵母を用いた系では捉えられない可能性がある。これは赤血球の膜構造が細胞膜のみから構成されるのに対し、酵母では細胞膜に加え、グルカン等の多糖類から構成される細胞壁が存在するためであり、酵母の膜構造が赤血球より安定であることに起因すると考えられる。すなわち、酵母を用いた系では膜破壊作用の弱い物質の光毒性は捉えにくいものと考えられる。また、細胞壁の存在により、被験物質あるいは光活性化体が細胞内標的部位に到達せず、疑陰性の結果を導く可能性がある。これらのことから、細胞膜に障害を与える光毒性物質の評価においては、赤血球光溶血性試験の感度が高いと考えられる。

一方、酵母は有機溶媒に強く、エタノール、メタノール、アセトンおよび DMSO (Dimethyl sulfoxide) を直接濾紙上に滴下しても阻止円の広がりは全く認められていない。この点、赤血球溶血性試験では 1% の DMSO 添加でも溶血が生じる場合がある。

すなわち、酵母は細胞膜に障害を与えるタイプの光毒性に関する検出感度は若干低いことが、耐溶媒性が高いこと、細胞の生存・生育に関わる全ての過程への影響を検討できることから、広範囲の被験物質や多くの作用機序による光毒性の検出に適用できると考えられた。これに対し、赤血球光溶血試験の方は細胞膜に障害を与えるタイプの光毒性に関する検出感度が高く、作用機序が明確であることと、弱い作用を感度良く検出できる利点があると考えられた。したがって、これら二つの方法を組み合わせることにより、想定される状況を幅広くカバーできるものと考えた。

2. 試験プロトコール構成の妥当性

「酵母光生育阻害試験」および「赤血球光溶血試験」の光毒性検出メカニズムとして、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカル、あるいは光励起された化学物質自体が生体へ及ぼす作用を、細胞膜破壊や細胞内小器官に対する影響として検出する。バッテリー試験法は初めに「酵母光生育阻害試験」を評価し、陰性の場合に「赤血球光溶血試験」を実施し、両試験が陰性の場合に光毒性なしと判定する。なお、バリデーション報告書（2008年1月）では、本バッテリー試験法では両者の組み合わせで評価するところに大きな意味を有することから、施設での作業のしやすさの関係から「赤血球光溶血試験」を先に実施しても差し支えないことをプロトコールに明記すべきと指摘されており、試験の順序を規定することの可否については検討が必要と考えられた。

「酵母光生育阻害試験」はまず、4%ポテトデキストロース寒天培地に酵母菌を含有させた6ウェルマイクロプレートを作製する。被験物質は最高溶解濃度もしくは投与可能な最高濃度を含む5倍希釈で4系列準備する。溶媒としては精製水、エタノール、アセトン、メタノールおよびDMSOを用いることができ、最も高い溶解度を与える溶媒を選択する。滅菌したアルミ箔上に必要枚数の濾紙円板を並べ、溶解被験物質、溶媒、陽性対照を濾紙上に滴下する。用意した6ウェルマイクロプレートに滴下濾紙を密着させる。

照射光源としては資生堂における開発時はUVA（紫外線A波）を照射するトランスイルミネータ（Vilber Lourmat社製）が用いられたが、バリデーション研究時にはUVB（紫外線B波）から可視光領域までをカバーするMetal halide lamp（Dr. Honle GmbH社製）、パワーサプライ（Dr. Honle GmbH社製）を装備したSOL500（Dr. Honle GmbH社製）が用いられた。フィルターはUVBをカットするH1を使用し、紫外線強度計（Dr. Honle GmbH社製もしくは（株）トプコン製）でUVAの強度を測定し、（株）トプコン製紫外線強度計を用いる場合には紫外線強度をDr. Honle GmbH社製に補正した上で照射している。

照射終了後、照射、非照射マイクロプレートを反転させ、25℃で72時間培養している。阻止帯の直径の測定はノギスを用いて直交する方向で平均を求め、濾紙円板の直径を差し引いて照射プレートと非照射プレートの差で評価する。阻止帯の明瞭度合いも参考として記録する。

阻止帯の差（Z; mm）＝照射プレートの阻止帯－非照射プレートの阻止帯

各プロトコールの概要は以下のとおりである。

「酵母光生育阻害試験」について一次バリデーション試験結果より陽性対照である8-MOP（8-メトキシソラーレン）を含めいくつかの陽性被験物質（阻止帯の差が5mm以上となるべき物質）の阻止帯がグレーゾーン（2mm≦阻止帯の差<5mm）に分類されたことから、陽性対照物質が陽性となる新たな試験条件の設定が必要となり、以下の条件が補完試験に向けて設定された。

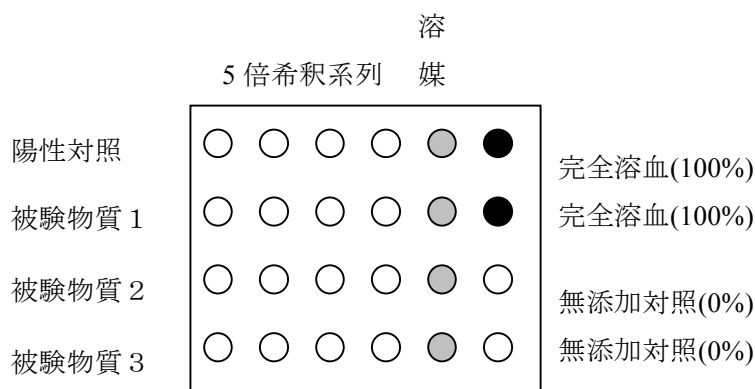
	一次バリデーション試験		補完試験
線量	8.5J/cm ²	→	20J/cm ²
8-MOP濃度	0.01% (0.1 mg/mL)	→	0.1% (1 mg/mL)
ブレインキューベーション	なし	→	5時間

以上の条件変更により、陽性物質の疑陰性は認められなくなり、Bithionol、6-MC (6-methylcoumarin)、SLS (Sodium lauryl sulfate) の3品だけが疑陽性結果となった。なお、バリデーション報告書中に、

「酵母光生育阻害試験」のカットオフ値（5mm）について、3～4mm に変更することで施設間再現性が良くなることから再検討すべきと指摘されており、カットオフ値見直しの要否について、検討が必要と考えられた。

「赤血球光溶血試験」は上清液の吸光を、マイクロプレートリーダーを用いて測定し、赤血球膜破壊による溶血度を算出する手法で、プレート中に浮遊している赤血球と反応させるため、膜破壊や蛋白変性を生じない溶媒を選択する必要がある。

被験物質溶液は精製水、アルコール、アセトンおよび DMSO が用いられ、陽性対照としてアクリジン 10%(w/v)アセトン溶液を 5 倍希釈で 4 系列調整している。使用した赤血球はヒトからヒツジに変更されている。赤血球混濁液にジエチルエーテル添加後攪拌、超音波処理を施した完全溶血(100%コントロール)を作成し無添加対照(0%)との基準に用いている。



同じプレートを 4 枚作成し、2 枚は照射用で残りは非照射用とし 2 度繰り返す。

光源は資生堂における開発時はトランスイルミネータ（Vilber Lourmat 社製）が用いられたが、バリデーション研究時からはソーラーシミュレーター、SOL500（Dr.Honle 社製）を用い、短波長紫外線部領域(UVB)をカットする H1 フィルターを用い、光源が安定した時点で紫外線強度計(UVA-Meter, Dr.Honle 社製)で測定し、6.2 J/cm²を照射している。「赤血球光溶血試験」では照射後のプレートを攪拌、遠心分離し上清をマイクロプレートリーダーに移して、540nm 領域での吸光度を測定した。光溶血度の算出は非照射（2 プレート）の平均を求めた上で照射（2 プレート）の平均を基に計算する。なお、バリデーション研究報告書(2004 年 8 月)において、吸光度の測定波長は 540nm より 525nm 前後の波長を用いる方が良かったのでプロトコールでも波長を変更することを検討すべきと指摘されており、吸光度の測定波長については検討が必要と考えられた。

溶血度の差 (L;%) = 照射プレート[100 X (OD 被験物添加 - OD 溶媒添加) / (OD 完全溶血平均 - OD 無添加対照平均)] - 非照射プレート[100 X (OD 被験物添加 - OD 溶媒添加) / (OD 完全溶血平均 - OD 無添加対照平均)]

L < 5 で光毒性は陰性、5 ≤ L < 10 で疑陽性、10 ≤ L で陽性と評価される。

3. バリデーションに用いられた物質の分類

資生堂における検討試験における光毒性評価の対象物質としては、以下のものが用いられている。

1) 香料

Musk ambrette、Musk ketone、Musk xylene、Phantolid、Galaxolide、8-methoxypsoralen (8-MOP)、

5-methoxypsoralen (5-MOP)、6-methylcoumarin (6-MC)

2) 紫外線吸収剤

Parsol 1789、Parsol MCX、ASL-24、ASL-24S、Escalol 507(D)

3) 医薬品

Sulfanilamide、Indomethacin、Piroxicam、Chlorpromazine (CPZ)

4) 抗菌剤

TCC、Bithionol、TBS、TCSA

5) 染料

Rose bengal、Acridine、Anthracene

これらは、いずれも光毒性物質、あるいは光アレルギー物質、または両方の性質をもつものとして知られている。ただし光アレルギー性物質は多かれ少なかれ光毒性を有するため、全ての物質を光毒性評価の対象物質とみなしうる。これらの中で、臨床的あるいは古典的実験系で特に重要とされるのは以下である。

TCSA は強い光毒性と光アレルギー性を有する物質であり、過去に欧州で多くの光アレルギー性接触皮膚炎の患者が発生した。

8-MOP は DNA に光結合する強い光毒性を有するが、光アレルギー性はほとんど生じない。そのために光化学療法に利用されている。5-MOP も同様に強い光毒性を持つ。

Musk ambrette, Bithionol, 6-MC は光アレルギー性接触皮膚炎を起こすことが知られている。上記物質より光毒性は弱いと思われる。

医薬品の中では sulfanilamide が UVB を作用波長に持つ物質として知られている。Piroxicam は光アレルギー性光線過敏症を起こす。Chlorpromazine や Indomethacin の光線過敏症の頻度はそれより低い。

バリデーション試験においては、EU/COLIPA あるいは資生堂における *in vivo* での評価結果を基に以下の 9 物質が選択されている。

1) 香料

Anthracene

2) 紫外線吸収剤

4-t-butyl-4-methoxydibenzoylmethane (BMDM)

3) 医薬品

Amiodaron、Chlorpromazine (CPZ)

4) 抗菌剤

Bithionol、Chlorhexidine (CHD)

5) 染料

Acridine、6-methylcoumarin (6-MC)

6) その他

Sodium lauryl sulfate (SLS)

BMDM は Parsol 1789 と同じ物質であるが、名前を区別化して用いられているため、資生堂の検討試験での Parsol 1789 とは入手先が異なるか、あるいは純度が異なると思われる。

CHD、SLS は陰性コントロールとして検討されたものとする。

4. 試験法の正確性を評価する物質の *in vivo* および参照データ

資生堂における検討試験で用いられた物質について、臨床的頻度を加味し、モルモットの *in vivo* のデータをもとにすると各物質の光毒性の強さは以下のように考えられる。

1) 強い光毒性をもつグループ

TCSA,8-MOP, 5-MOP, Phantolid, Galaxolide, Acridine, Anthracene

2) 中等度の光毒性をもつグループ

Musk ambrette, Musk ketone, Musk xylene, 6-methylcoumarin, Sulfanilamide, Piroxicam, Chlorpromazine, TCC, Bithionol, TBS

3) 弱い光毒性をもつグループ

Parsol 1789, Parsol MCX, ASL-24, ASL-24S, Escalol 507(D), Indomethacin, Rose bengal

本バッテリー評価で光毒性(+)とされた物質は、TCSA、8-MOP、5-MOP、Phantolid、Galaxolide、Acridine、Anthracene、Chlorpromazine であり、Chlorpromazine を除いて全て上記 1)のグループに含まれている。また本評価で光毒性(-)とされた物質は、TCC、Sulfanilamide、Indomethacin、Piroxicam、Parsol 1789、Parsol MCX、ASL-24、ASL-24S、Escalol 507(D)、Musk ambrette、Musk ketone、Musk xylene であった。

従って、光毒性のバッテリー評価では、Chlorpromazine をやや過大評価し、Sulfanilamide、Piroxicam、Musk をやや過少評価している可能性があるものの、臨床的実態あるいは *in vivo* 試験の結果とほぼ一致していると考えられる。

バリデーション試験において用いられた物質について、臨床的頻度を加味し、モルモットの *in vivo* のデータをもとにすると各物質の光毒性の強さは以下のように考えられる。

1) 強い光毒性をもつグループ

Acridine、Amidaron、Anthracene

2) 中等度の光毒性をもつグループ

Bithionol、CPZ、6-MC

3) 弱い光毒性をもつグループ

BMDM

4) 光毒性がないまたは極微のグループ

CHD、SLS

本バッテリー評価では、施設 b は他施設と結果が異なり、また被験物質の光毒性を反映した結果ではないために、評価から除外したい。その上で、光毒性(+)と評価された物質は、Acridine、Amidaron、Anthracene、CPZ であった。また光毒性(-)と判定された物質は、Bithionol、6-MC、BMDM、CHD、SLS であった。よって 1)のグループに属する物質はすべて陽性、2)のグループに属する物質の 1 つが陽性で 2 つが陰性、3)および 4)に属する物質はすべて陰性であった。光感受性物質（臨床的には光アレルギー）として知られる Bithionol と 6-MC の光毒性が過小評価されたともいえるが、これらの物質による光線過敏症が光アレルギー性機序で起こっていることを考慮すると、各物質の光毒性を概ね正當に評価していると考えられる。

5. すべてのデータおよび結果

1990年に資生堂の社内で光毒性試験代替法の検討が開始され、赤血球光溶血試験法ならびに酵母光生育阻害試験法の導入、バッテリー試験法の導入を検討され、1997年に代替法による評価フロー提案がなされた。2003年2月15日に光毒性評価方法の提案がなされ、2004年1月から4月にかけて、(株)コーセー研究本部品質保証センター(以下、コーセー)、(財)食品薬品安全センター秦野研究所(以下、食薬センター秦野研)、東洋ビューティ(株)中央研究所(以下、東洋ビューティ)、日本メナード化粧品(株)総合研究所(以下、日本メナード化粧品)、マルホ(株)京都R&Dセンター(以下、マルホ)、資生堂の計6機関でバリデーションが実施された。同年8月にはバリデーション研究報告書が提出された(第一次バリデーション結果)。しかし、酵母光生育阻害試験において陽性対照が明確に捉えられるように条件の変更が必要であるとの結論から、2006年7月～9月末まで、前記6機関のうち、東洋ビューティを除く5機関で、酵母光生育阻害試験のバリデーション補完実験が実施された(補完試験結果)。これらの経緯から提出された複数の実験データの結果を以下の3つに大きく分類した。

5.1 資生堂における検討試験結果

5.2 第一次バリデーション結果

5.3 補完試験結果

2006年末に補完研究報告書が提出され、2008年1月に光毒性試験代替法バリデーション研究報告書が提出された。なお、各機関で実施されたすべての試験結果について、詳細な情報が提出されており、これらを用いて評価した。

5.1 資生堂における検討試験結果

資生堂における検討試験結果については、別添する。

5.2 第一次バリデーション結果

5.2.1 被験物質

EU/COLIPAでの*in vivo*評価結果、ならびに資生堂の*in vivo*評価結果をもとに下記の陽性(P)ならびに陰性(N)、または光毒性が考えられない化学構造の物質(E)を選択された。なお、各施設には、それぞれ物質名を隠してコード化し、異なった組み合わせの陽性物質3種と陰性物質3種の計6種をそれぞれ供された。

表 1.

物質名(略名) P(陽性):4 N(陰性):5 の9を選択	In vivo 判定(資生堂の結果を優先)		
	本バリデーション 採用の評価	資生堂の評価 (評価点)	EU/COLIPA での評価
Amiodaron	P		P
Anthracene	P	P(1.8)	P
Bithionol	N	N(0)	P
Chlorhexidine (CHD)	N		N
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P
5-Methoxypsoralen (5-MOP)	P	P(2.7)	P
Sodium lauryl sulfate (SLS)	N		N
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (EDA)	E	E(1.0)	
4-t-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (BMDM)	N	N(0)	
Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Piroxicam	N	N(0)	N
Rose bengal	N	N(0)	E
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	P	P(1.5)	P?
8-Methoxypsoralen (8-MOP)	P	P(4.8)	P
6-Methylcoumarin (6-MC)	N	N(0)	P
Acridine	P	P(2.1)	P

5.2.2 酵母光生育阻害試験の結果

総じてバラツキが多く実際の使用には耐えない結果であった。a 施設では *in vivo* で陰性の Bithionol を陽性、同じく *in vivo* 陰性の CHD を疑陽性と判定した。b 施設では誤った判定結果が目立ち、*in vivo* 陽性の Amiodaron、CPZ が陰性あるいは疑陽性と判定された。また、*in vivo* 陽性の Anthracene でも 1 回目は疑陽性と判定された。c 施設、d 施設でも誤判定が目立ち、*in vivo* 陽性の Anthracene で陰性、d 施設では *in vivo* 陽性の Amiodaron、Acridine が陰性と判定された。e 施設、f 施設も誤判定が目立ち、e 施設では *in vivo* 陽性の CPZ、Acridine が疑陽性あるいは陰性と判定され、f 施設では CPZ、Acridine が陰性と判定されるなど多くの間違いが目立った。さらに、各施設 2 回の実験間で結果に差が見られなかったのは a、f 施設のみであり、b、c、e 施設では 2 回の実験データを比べるとバラついた結果が目立った。

表 2. 酵母光生育阻害試験の結果

施設	回数(2回のデータを要求)	a			b			c			d			e			f		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	P	P		E	P		E	E		E	E							
Amiodaron	P	P	P		N	N		P	E		E	E							
CHD	N	E	E		N	N		N	N		N	N							
CPZ	P	P	P		E	N								E	E	E	N	N	
Bithionol	N	P	P		E	N								E	E	E	E	E	
SLS	N	N	N		N	N								N	N	N	N	N	
Acridine	P							P	E		E	E		P	E		E	E	
6-MC	N							N	N		E	E		E	E		E	E	
BMDM	N							N	N		N	N		N	N		N	N	

<2mm: Negative, 2mm<diameter<5mm: Equivocal, >5mm: Positive

5.2.3 赤血球光溶血試験の結果

吸光度計の波長を 525nm で測定した結果、酵母光生育阻害試験の場合と同様に陽性物質が明確に特定されず、さらに 2 回あるいは 3 回の試験で異なる結果が、a、b、c 施設で認められた。2 回の試験ですべての結果が一致したのは d、e、f 施設であった。*In vivo* で陽性の Amiodaron は b 施設で疑陽性だった以外は a、c、d いずれの施設でも陰性判定とされている。また、*in vivo* で陰性の CHD、Bithionol は実施したいずれの施設でも陽性と誤判定されている。更に、b 施設では SLS を、c 施設では 6-MC をいずれも陽性と誤判定している。

表 3. 赤血球光溶血試験の結果、(波長 525nm で測定)

施設	回数(2回のデータを要求)	a			b			c			d			e			f		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	E	P		P	P		E	E		P	P							
Amiodaron	P	N	N		N	E		N	N		N	N							
CHD	N	P	P		P	P		P	P		P	P							
CPZ	P	P	P	P	P	P								P	P	P	P	P	
Bithionol	N	P	P		P	P								P	P	P	P	P	
SLS	N	N	N		N	P								N	N	N	N	N	
Acridine	P							P	P		P	P		P	P	P	P	P	
6-MC	N							P	N	N	N	N		N	N	N	N	N	
BMDM	N							N	N		N	N		N	N	N	N	N	

<5%: Negative, 5%<hemolysis<10%: Equivocal, >10%: Positive

吸光度計の波長を 540nm で測定した結果、陽性物質が明確に特定されなかった。波長 525nm の結果と類似結果で、さらに Anthracene が a、b 施設で疑陽性判定となり、e 施設で CPZ が 2 回陰性と判定されている。

表 4. 赤血球光溶血試験の結果、(波長 540nm で測定)

施設	a			b			c			d			e			f		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	E	E		E	E		E	N		P	P						
Amiodaron	P	N	N		N	E		N	N		N	N						
CHD	N	P	P		E	P		P	P		P	P						
CPZ	P	P	P	P	N	P								N	N	E	P	P
Bithionol	N	P	P		P	P								P	P	P	P	P
SLS	N	N	N		N	P								N	N	N	N	N
Acridine	P							P	P		P	P		P	P	P	P	P
6-MC	N							P	N	N	N	N		N	N	N	N	N
BMDM	N							N	N		N	N		N	N	N	N	N

<5%: Negative, 5%<hemolysis<10%: Equivocal, >10%: Positive

酵母光生育阻害試験結果ならびに赤血球光溶血試験結果における一次バリデーションの判定基準は以下の通りである。すなわち、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験結果の両者あるいは一方が陽性の場合には、陽性物質と判定される。また、両者が疑陽性あるいは一方が疑陽性で他方が陰性の場合には疑陽性物質と判定され、両者が陰性の場合のみ陰性物質と判定される判定基準が採用されている。

表 5. 一次バリデーションの判定基準

		赤血球光溶血試験		
		陽性	擬陽性	陰性
酵母光生育 阻害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	擬陽性	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性	陽性	擬陽性	陰性

5.2.4 施設内再現性

b ならびに c 施設における、施設内の実験の繰り返して結果が異なった施設ならびに被験物質の組合せを示す。とくに b 施設では多くの被験物質の結果が異なった。この理由としては b 施設では、自社に十分な実験機器がなかったため、他施設を借用して試験を実施した結果、実験環境の制御に困難性があったことが挙げられている。

表 6. 施設内再現性

施設	被験物質	In vivo	可能性
b	A (Anthracene)	P	EまたはP
	B (Amiodaron)	P	NまたはE
	C (CHD)	N	EまたはP
	D (CPZ)	P	NまたはEまたはP
	F (SLS)	N	NまたはP
c	B (Amiodaron)	P	NまたはE (cut-off値ぎりぎり)
	H (6-MC)*	N	NまたはP

(*光溶血試験で1回目と2回目が大きく異なっているが、追加試験で補正されているため評価には影響を与えない。(1回目と2回目が大きく異なる場合は3回目を実施して提出する。2回のデータを得ることがプロトコールに記載)

5.2.5 施設間再現性

施設間再現性は必ずしも良いとは言えなかった。すなわち、Acridine、BMDM、CHD および Bithionol 以外では施設間で結果が一致せず、半数以上の物質で再現性が不良であった。なお、CHD と Bithionol では *in vivo* における判定では陰性であるが、本法ではすべての施設で陽性と判定された逆の結果が得られている。ただ、陽性物質が各施設共通で陰性と判断されることはなかった。

表 7. 施設間再現性、その 1

物質名(略名)	コード	In vivo 判定	施設コード					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	E	E	P		
Amiodaron	B	P	P	N	P	E		
CHD	C	N	P	P	P	P		
CPZ	D	P	P	E			E	P
Bithionol	E	N	P	P			P	P
SLS	F	N	N	P			N	N
Acridine	G	P			P	P	P	P
6-MC	H	N			N	E	E	E
BMDM	I	N			N	N	N	N

感度、特異度ならびに一致度を表に示す。疑陽性判定を陽性判定と見なした場合に *in vivo* 判定との一致率は、b 施設を除外した 5 施設では 70%、すべての施設では 64%であった。疑陽性を陽性とするれば、陽性物質を誤って陰性といわないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

表 8. 施設間再現性、その 2

	施設コード (bを除く)					平均
	a	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/13 (77%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/17 (47%)
一致度 I	4/6 (67%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/30 (60%)
一致度 II	4/6 (67%)	5/6 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	21/30 (70%)

	施設コード (bを含む)						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/16 (63%)
感度 II	3/3 (100%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	15/16 (94%)
特異度	1/3 (33%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/20 (40%)
一致度 I	4/6 (67%)	0/6 (0%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/36 (50%)
一致度 II	4/6 (67%)	2/6 (33%)	5/6 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	23/36 (64%)

感度 I : 陽性物質を陽性と判定した割合

感度 II : 陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度 : 陰性物質を陰性と判定した割合

一致度 I : in vivo判定と実験判定が一致した割合

一致度 II : 擬陽性判定を陽性判定とみなしたときに in vivo判定と実験判定が一致した割合

表 9. 施設間再現性、その 3

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A Anthracene (P)	a	P	(E)	P	F SLS (N)	a	N	N	N
	b	E	E	E		b	N	P	P
	c	E	N	E		e	N	N	N
	d	E	P	P		f	N	N	N
B Amiodaron (P)	a	P	(N)	P	G Acridine (P)	c	P	(P)	P
	b	N	N	N		d	E	P	P
	c	P	(N)	P		e	E	P	P
	d	E	(N)	E		f	E	P	P
C CHD (N)	a	E	P	P	H 6-MC (N)	c	N	N	N
	b	N	P	P		d	E	N	E
	c	N	P	P		e	E	N	E
	d	N	P	P		f	E	N	E
D CPZ (P)	a	P	(P)	P	I BMDM (N)	c	N	N	N
	b	N	E	E		d	N	N	N
	e	E	N	E		e	N	N	N
	f	N	P	P		f	N	N	N
E Bitlisonol (N)	a	P	(P)	P	36試験中14試験でBatteryでの評価が酵母試験単独から変化しており、両者の組合せが大きな意味を持っている。				
	b	E	P	P					
	e	E	P	P					
	f	E	P	P					

施設間再現性の結果から、実験条件に問題があった施設 b を除けば、施設間の違いは陽性と疑陽性、疑陽性と陰性の範囲に収まっていた。赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。酵母光生育阻害試験、または赤血球光溶血試験単独結果とそれらを組合せた結果と異なる施設が多く、バッテリー試験の有用性が認識できた。しかし、in vivo と比べて第一次バリデーション試験の評価条件では

必ずしも良好な結果とを示したとは言えず、改善の必要があった。2回の実験の再現性吟味と、酵母-赤血球試験での総合判定には用量反応関係を利用すべきと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある場合は慎重な判定を行うべきであることが示された。

5.2.6 吸光度測定における波長の影響

赤血球光溶血試験における吸光光度計の波長を 540nm の場合と 525nm の場合とを比較した。525 nm での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果が得られた。

表 10. 吸光度測定における波長の影響

	施設コード (540 nmで評価)						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	100	0	67	67	50	100	63.9
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.9
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度 I	67	0	67	50	50	67	50.0
一致度 II	67	33	83	67	67	67	64.0

	施設コード (525 nmで評価)						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	100	67	67	67	100	100	83.3
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.9
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度 I	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度 II	67	33	83	67	83	67	77.8

感度 II：陽性物質を陽性または疑陽性と判定した割合

一致度 II：疑陽性判定を陽性判定とみなしたときに *in vivo* 判定と実験判定が一致した割合

5.3 補完試験結果

第一次バリデーション結果にもとづいて、陽性物質として採用した物質が、いくつかの施設でグレーゾーンに落ちており、結果がばらついていることを改善するために、陽性対照である 8-MOP の適用濃度の変更や、Rose bengal を用いたプレインキュベーション時間の検討、光源の種類や光源を覆う暗幕などのプロトコル整備が提案され、酵母光生育阻害試験の補完試験が実施されている。その結果について下記に示す。

5.3.1 酵母光生育阻害試験の結果

第一次バリデーション結果と異なり、陽性物質が明確に陽性と判定された。一方、陰性物質が陽性と判定される場合が増加した。d ならびに f 施設の 1 物質のみで結果がばらついたが、全般的に良好な再現性が認められている。

表 11. 酵母光生育阻害試験の結果

	a			b			c			d			e			f		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	P	P				P	P		P	P							
Amiodaron	P	P	P				P	P		P	E							
CHD	N	N	N				N	N		N	N							
CPZ	P	P	P										P	P		P	P	
Bithionol	N	P	P										N	N		P	P	
SLS	N	N	N										N	N		E	E	P
Acridine	P						P	P		P	P		P	P		P	P	
6-MC	N						E	E		N	N		P	P		P	P	
BMDM	N						N	N		N	N		N	N		N	N	

5.3.2 施設内再現性

施設内の実験反復で結果の異なった c、d、f 施設での被験物質を表に示す。陽性対照については 2 回の判定がすべての施設で(++)であり、3 被験物質については表の通り、施設内で判定の違いが生じていた。この結果は前研究より施設内再現性が良くなっており、プロトコールの改訂によって施設内再現性は改善されたと考えられる。

表 12. 施設内再現性

施設	被験物質	In vivo	可能性
c	H (6-MC)	N	±または+(赤血球の問題)
d	B (Amiodaron)	P	±または+
f	F (SLS)	N	±または+

判定基準は、一次バリデーションの判定基準と同様の基準を用いた。

表 13. 補完試験の判定基準

		赤血球光溶血試験		
		陽性	擬陽性	陰性
酵母光生育 阻害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	擬陽性	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性	陽性	擬陽性	陰性

5.3.3 施設間再現性

表 14. 施設間再現性

物質	施設	酵母	赤血球	総合		物質	施設	酵母	赤血球	総合
A Anthracene (P)	a	P	(E)	P		F SLS (N)	a	N	N	N
	b						b			
	c	P	N	P			e	N	N	N
	d	P	P	P			f	E	N	E
B Amiodaron (P)	a	P	(N)	P		G Acridine (P)	c	P	(P)	P
	b						d	P	P	P
	c	P	(N)	P			e	P	P	P
	d	P	(N)	P			f	P	P	P
C CHD (N)	a	N	P	P		H 6-MC (N)	c	E	N	E
	b						d	N	N	N
	c	N	P	P			e	P	N	P
	d	N	P	P			f	P	N	P
D CPZ (P)	a	P	(P)	P		I BMDM (N)	c	N	N	N
	b						d	N	N	N
	e	P	N	P			e	N	N	N
	f	P	P	P			f	N	N	N
E Bithionol (N)	a	P	(P)	P	Batteryでの評価が酵母試験単独から変化したのは 30試験中4試験まで減少した。					
	b									
	e	N	P	P						
	f	P	P	P						

補完試験における施設間再現性は SLS、6-MC を除いてすべて *in vivo* 結果と一致した。なお、SLS の場合は f 施設のみ疑陽性判定となり、他が陰性判定、6-MC の場合は c 施設のみ疑陽性判定となり、他が陽性判定であった。しかし、第一次バリデーションの結果と比較すると飛躍的にほとんどの化学物質で一致していることが示された。

表 15. 施設間再現性

物質名(略名)	コード [△]	In vivo 判定	施設コード [△]				
			a	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	P	P		
Amiodaron	B	P	P	P	P		
CHD	C	N	P	P	P		
CPZ	D	P	P			P	P
Bithionol	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	E
Acridine	G	P		P	P	P	P
6-MC	H	N		E	N	P	P
BMDM	I	N		N	N	N	N

すべての施設（3 または 4 施設）で判定が陽性となった陰性物質は 2 物質（CHD および Bithionol）であった。物質 C は、本研究で実施された酵母光生育阻害試験でも用量反応関係がほぼ見られなかったため、陽性判定は赤血球光溶血試験のためであることが示された。

表 16. 施設間再現性

	施設コード (赤血球光溶血試験は 540nm の値を使用)					平均
	a	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	8/17 (47%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

プロトコール改訂により、陽性物質の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面ではプロトコール改訂の成果があったものと考えられた。また、バッテリー試験法での判定は、感度 I、感度 II ともに 100% であった。プロトコール改訂によって、前研究では疑陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたため、更に特異度も改善されたことから、プロトコール改訂は有用であったと考えられた。陽性物質の阻止帯の差の施設間差がやや大きくなったことは、プロトコール改訂の一つの結果と考えられる。さらに、すべての施設（3 または 4 施設）で、バッテリー試験法での判定と *in vivo* の結果が一致したのは 9 物質中 5 物質で、前研究の 2 物質より多かった。

6. 試験法の正確性

本試験法が *in vitro* 光毒性スクリーニング法として、未知の化学物質に光毒性が存在するかどうかを容易に知ることができ、さらに評価法の最も重要な所要条件と考えられる疑陰性や疑陽性が少ないことも正確性に影響するが、とくに疑陰性すなわち陽性物質を陰性と誤って判断することが 100% ない実験方法である必要がある。さらに実験方法の結果が正確で頑健性があることが実験方法としての信頼性を大きく左右するものであると考えられる。一次バリデーション試験の結果では、施設内再現性は施設 b で特に悪く、さらに施設間再現性も 4 物質（Acridine、BMDM、CHD および Bithionol）を除いて結果が一致しなかった。一次バリデーション試験ではかなり大幅なデータクリーニングが必要であり、施設 b の結果を除外して疑陽性判定を陽性判定と見なした場合でも *in vivo* 判定との一致率は 70% であり大きくばらついた。一次バリデーション試験では全く不正確な結果であり試験プロトコールの見直しが必要であった。酵母光生育阻害試験の陽性結果の判定基準の変更やプレインキュベーション時間の設定等を行ない補完試験が実施された。補完試験のプロトコールでは疑陽性判定が少なくなり、施設内再現性および施設間再現性共に一次バリデーション試験に比して良好な結果が得られ正確性が向上した。

今回のバリデーションでそれぞれの試験結果の正確性に影響を及ぼす主な要因として、光源、評価基準、その他の項目に分けて考える。

6.1 光源

使用された光源の種類や強さは実験の正確性に大きな影響を与えると考えられる。当初本実験方法を資生堂(株)が開発した時点の光源はトランスイルミネーター (UVA) であったが、バリデーション試験では人工太陽光であるソーラーシミュレーター (SOL500、Dr. Honle 社製) が使用された。こ

のソーラーシミュレーターでは太陽光と類似したスペクトル分布が得られ、UVB から可視光までの光波長も含まれている。さらに、照射線量についても、光源の変更に伴い変更が行われたが、酵母光生育阻害試験においては、最終的に阻止帯を明瞭化するために照射量を当初の $8.5/\text{cm}^2$ から $20\text{J}/\text{cm}^2$ としたことも実験の正確性の向上に貢献したものと考えられる。

各施設の実験環境が異なることから、第一次バリデーションの際にプロトコルに記載されていないことが相まって各施設独自の工夫がみられた。その中で光照射中に暗幕を使用した施設と使用しなかった施設があった。暗幕を用いれば反射により光照射の強度が上がり、さらに暗幕で密閉された状態で環境温度が上昇することが考えられ、温度上昇が細胞に与える影響も懸念された。そのため暗幕の有無も施設間におけるバラツキの原因の1つで、実験結果の正確性に影響することが考えられた。なお、プロトコルを改訂した補完試験では統一され、結果のバラツキが少なくなり、さらに導き出された結果が正確となったと考えられる。

6.2 評価基準

酵母光生育阻害試験では、第一次バリデーションでは、阻止帯の直径を 2mm 以上を陽性、2mm 未満を陰性とした。このため、陽性扱いとなった本来陰性であるべき物質も数多くみられ、これが一致率の低下を招いたことから、改訂されたプロトコルでは、5mm 以上を陽性、5mm 未満を陰性として補完試験を行った結果、一致率と施設間のバラツキの大幅な向上がみられた。また、陽性対照である 8-MOP の場合に $0.1\text{ mg}/\text{mL}$ では阻止帯が小さくはっきりしていないことから、明らかな阻止帯が観察された $1\text{ mg}/\text{mL}$ を陽性対照とし、陽性対照物質の試験条件として濃度 $1\text{ mg}/\text{mL}$ と設定することが結果の正確性に寄与したと考えられる。

6.3 その他

酵母光生育阻害試験の第一次バリデーションではプレインキュベーションの設定はなかったが、プレインキュベーションを行うことによって最終の阻止帯の差が大きくなることを見いだされた。その結果、プロトコルを改訂した補完試験ではプレインキュベーション時間を 5 時間と設定することが、阻止帯により明確な差をつけることができ、結果としてより正確な結論を導き出された。また、赤血球光溶血試験における吸光度測定における波長の影響についても、吸光度計の波長を 540nm の場合と 525nm の場合とを比較した結果、525nm での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果が得られた。しかし、今回の補完試験プロトコルでは各施設の吸光度計のフィルター入手等の問題から 540nm が採用された。

一般的に実験の正確性に影響する要因として、酵母ならびに赤血球の種類やロットによるバラツキ、実験器具や材料の違いによるバラツキ、実験環境や実験者の習熟度、プロトコル遵守などが考えられる。改訂されたプロトコルではこれらの点も記載され、実験方法の結果の正確性に貢献していると考えられる。とくに、今回の第一次バリデーション結果と、補完後の最終結果を比較すると、正確性が向上していることが明らかである。補完実験の最終プロトコルによって、本法を用いて未知物質の光毒性を予知することが十分に可能であり他の方法による光毒性試験結果と正確性に劣らない方法であると結論づけられる。

7. 試験法の信頼性 (*in vivo* との比較)

陽性化合物 4 種と陰性化合物 5 種の計 9 種の化合物を用いた第一次バリデーションでは、データ解析から除外することが妥当と判断された 1 施設のデータを除き且つ疑陽性判定を陽性とみなした場合、感度は 100%、特異性は 47%、一致度は 70%をそれぞれ示した。また、判定基準あるいはプレインキュベーション時間等について見直しを行って実施された補完試験では、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となる改善点が認められ、疑陽性は存在したものの、疑陰性は示されず、陽性化合物の見落としを少なくする改善が行われた。今回のバリデーションで用いられた化合物は 9 種類と限られており、当結果のみから *in vivo* の予測性を判断することは困難であるが、3T3-NRU 法に近い評価が可能な試験系であると言える。

最終的に整備されたプロトコールにおける検討物質数は 9 物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。資生堂が過去の検討試験で用いた 24 物質程度（バリデーションが終了している物質を除く）を用いた追加検討を要望する。その上で、今後、当該試験系を用いてのデータが蓄積され、*in vivo* との相関性が保証されるまでは、一次スクリーニングとしての活用が望ましく、被験化合物の光毒性評価においては、動物試験の併用を考慮すべきと考えられる。また、経口投与等による全身暴露を考えた場合には、代謝活性化系の導入についても検討すべきと考えられる。

8. データの質

8.1 資生堂における検討試験

8.1.1 GLP 原則の遵守

施設が GLP 認定施設でないこと、プロトコールの様式が GLP に則っていない等の理由から、提出データは厳密に GLP に準拠して作成されたものとは言えない。しかし、試薬調製記録や試験結果等の生データが適正に記録・保管されており、今回の申請に際して生データが提出され、データの追跡解析は可能であった。また、データの修正手続きについては通常の GLP 試験と同様に行われていた。これらのことから施設内バリデーションは「GLP 精神に準じて、試験が実施された」と見なしてよいと考えられた。

8.1.2 プロトコール違反

赤血球光溶血試験のまとめのデータには被験物質ごとに 3 回の試験結果しか示されていなかったが、実際にはより多くの試験が行われていたとの問題点が指摘された。この理由について提案者はデータに食い違いが生じた時は実験を繰り返し、3 回同じ結果が出た時点で終了すると決められていたと回答した。本件は試験の信頼性に影響を与えるべきものであり、また、3 回同じ判定結果が出た時に終了するとのことは試験法プロトコールにも明記されていなかった。しかし、事前に提出された個別データ中にそれら採用されなかったデータも含まれており、恣意的に隠したものではないとされた。また、このようにすると 3 回の試験結果の平均を取って評価するというプロトコールが意味を持たなくなる。そこで、多施設バリデーションの際には正当な理由がない限り行った試験結果すべてを採用すべきであると指摘された。また、繰り返し試験の結果は平均して評価することをプロトコールに明確に記載すべきであるとされた。

8.1.3 その他、試験実施上の問題点等

提案施設は光毒性試験について長い経験があり、担当者も十分な経験を受けたものであり、技術的には問題ないと考えられる。

8.1.4 データの信頼性

生データと個別データ、まとめの結果と対比については、多くのデータについて二次データとの相関性が確認されたことから、データの信頼性に問題はないと考えられた。

8.2 一次バリデーション試験

8.2.1 GLP 原則の遵守

試験実施前に GLP についての基本的な事項を説明したが、試験結果には多くの記載ミスや転記ミスがあった。これらはデータ整理担当者レベルで確認され、被験物質コードの開示前に修正されたこと、また、全ての生データ或いはそのコピーを事務局に提出してもらったことから、適正に処理され、データの信頼性には問題ないとする。また、GLP 施設からのデータにはこれらのミスは少なかったことから、GLP 施設でないところには、試験開始前に GLP 教育をより徹底することや、あるいはバリデーション参加施設を GLP 施設のみに絞るか、または安全性試験を GLP 原則に則って実施してきた施設のみに絞ることも必要かもしれないとの意見も出た。なお、実際に GLP 施設のみにすることはバリデーション参加者がかなり減少し、受託機関のみになってしまう可能性もあり現状では困難と思われた。

8.2.2 プロトコール違反

プロトコール違反をどう扱うかについて、バリデーション委員会で審議された。その結果、単純な試験濃度ミス・測定ミスがある記載データについては、明らかなミスと判断できるデータを削除した上で採用されている。

8.2.3 その他、試験実施上の問題点等

施設内のバラツキが特定の施設に大きかったことから、予備的なバリデーションを実施し、参加希望施設の技術レベルを確認することが必要であろう。また、今回の試験法では、光源の特長の把握等が必要であったことや、試験法の詳細についての知見が重要であったことから、プロトコールの精緻化の重要性と参加施設の技術レベルの確認が必要であることが示唆された。

8.2.4 データの信頼性

技術上の問題はあったが、データクリーニングを行い、生データとの突合せを実施したことから、最終的なデータの信頼性は高いと思われる。

8.3 補完試験

補完試験に参加した 5 施設は、いずれも一次バリデーション試験に参加し、酵素光生育阻害実験のデータについて評価を受けた経験を有することから、技術的な側面からデータの質への懸念はないものと考えられた。光毒性試験代替法バリデーション報告書（2008 年 1 月 7 日）の「3-6) 実験条件の記録」に、実験は GLP の精神に則って実施され、定められた様式で、測定機器や実験条件を記録したと記載されている。さらに、一次バリデーション試験では多くの記載ミスや転記ミスがあったが、補完試験では一次バリデーション試験の経験を生かしてデータシートを改善した結果、転記ミスが 2 件のみに減少したことから、補完実験のデータの信頼性に問題はなかったと考えられた。補完試験後の中間報告会において、阻止円の測り方をプロトコールに文章として記載したほうが良いとの意見が出され、プロトコールの改訂がなされたことから、データに影響する要因について適切な対応がなされているものと考えられた。

9. 他の科学的な報告

バッテリー試験法に関わる 2 報の論文について、以下に記述する。

9.1 A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients

Altern. Animal Test. Experiment., 9(1), 29-39 (2002)

赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法および 3T3-NRU 光毒性試験法についての評価を行うとともに、それぞれの試験法を組み合わせた時の予測性についても評価を行った。実験では、*in vivo* で陽性を示す化合物 9 種および陰性を示す化合物 14 種の計 23 種の化合物を用いた。実験の結果、酵母光生育阻害試験法が最もモルモットを用いた *in vivo* 試験の成績と一致する結果を示した (表 17)。各試験法それぞれに疑陰性が認められたが、赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法を組み合わせたバッテリー試験法では、疑陰性を除外することが可能であった (表 17)。

さらに、赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法および 3T3 NR 光毒性試験法のそれぞれの組み合わせによる光毒性評価について検討を行った。赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法、3T3-NRU 光毒性試験法と赤血球光溶血試験法の組み合わせの評価では、単独での評価で見られた疑陰性を除外することができた (表 18)。

以上、異なるメカニズムによる光毒性発現を検出する試験法を組み合わせることにより、予測性の向上が認められた。また、水難溶性化合物の評価が可能な点を含めると、赤血球光溶血試験法と酵母光生育阻害試験法を組み合わせたバッテリー試験法の有用性が示されたものと考えられる。

表 17 Evaluation of *in vitro* methods in terms of five parameters

Parameter	RBC assay	Yeast assay	NRU PT	Battery system
			using BALB/3T3 clone A31	RBC-Yeast
Sensitivity	67%	89%	67%	100%
Specificity	71%	79%	79%	64%
Predictive value (+)	60%	73%	67%	64%
Predictive value (-)	77%	92%	79%	100%
Equivalence	70%	80%	72%	76%
False negative	8-MOP	Phantolid	Phantolid	-
	5-MOP		Galaxolide	
			TCSA	

表 18 Evaluation of the three battery systems

Parameter	Battery system		
	RBC-Yeast	Yeast-NRU PT	NRU PT-RBC
Sensitivity	100%	89%	100%
Specificity	64%	73%	64%
Predictive value (+)	64%	67%	64%
Predictive value (-)	100%	92%	100%
Equivalence	76%	83%	76%
False negative	-	Phantolid	-

9.2 Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay

Altern. Animal Test. Experiment., 10(1), 1-17 (2004)

赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法およびバッテリー試験法において、光源の差異が試験成績に及ぼす影響を検討した。実験では、24種の化合物を用いた。光源は、solar simulator と UVA 照射器を用いた。いずれの試験法においても、光源の違いによる試験成績へ影響は認められなかった (表 19)。

表 19 Availability of the battery system in terms of correlation parameters.

Parameters *	YGI PT (%)		RBC PH (%)		Battery system (%)	
	Solar	UVA	Solar	UVA	Solar	UVA
Sensitivity	78	89	67	67	100	100
Specificity	87	80	73	73	73	67
Predictive value (+)	78	73	60	60	69	64
Predictive value (-)	87	92	79	79	100	100
Equivalence	81	81	71	73	81	77

Correlation parameters were calculated using the data for 24 cosmetic ingredients in Table 4.

*: Parameters reported by Balls *et al.* (1990).

Solar simulator を光源とし、赤血球光溶血試験法、酵母光生育阻害試験法、バッテリー試験法および 3T3-NRU 光毒性試験法の比較を行った。なお、3T3-NRU 光毒性試験法のデータは EU/COLIPA で実施されたバリデーションの結果を用いた。検討の結果、2種の試験法を組み合わせることにより (バッテリー試験法)、単独での評価に比較して光毒性予測力が向上することが認められた。また、バッテリー試験法は、3T3-NRU 光毒性試験法と同等の光毒性予測力を持つことが示された。

表 20 Comparison of correlation parameters for the YGI PT assay, the RBC PH assay and the battery system with the use of the solar simulator.

Parameters *	YGI PT (%)	RBC PH (%)	Battery system (%)	3T3 NRU PT (%)
Sensitivity	83	67	100	100
Specificity	75	63	63	50
Predictive value (+)	71	57	67	60
Predictive value (-)	86	71	100	100
Equivalence	79	64	79	71

Correlation parameters were calculated using the data for 14 chemicals in Table 4, *i.e.*, musk ambrette, 8-MOP, 5-MOP, 6-MC, EHMC, HMB, HMBS, piroxicam, CPZ, bithionol, TCSA, rose bengal, acridine and anthracene.

*: Parameters reported by Balls *et al.* (1990).

10. 3Rs への対応

酵母光生育阻害試験については、動物を使用しないことから、動物福祉面から代替法として、問題ないものとする。赤血球光溶血性試験ではヒツジの血液を用いている。ヒツジの血液については、ヒトの血液での代用可能性もあるが、本試験にて、陽性対照物質と 3 被験物質を評価する場合に必要なヒツジ赤血球量は血液約 2mL である。供血用動物の健康面、福祉面に適切な配慮がなされれば、

同一動物から間隔を空けて繰り返し採血することは可能であり、動物福祉面で特段の問題はないものと考えられた。

11. 試験法の有用性と限界（コスト、時間面からの妥当性など）

試験系である緬羊保存血ならびにドライイーストとも高価ではなく、光源装置を除くと、高価で特殊な機器や試薬等は必要としないことから、本試験法はコスト面で特に問題はないものと考えられた。また、3T3-NRU 法は水に難溶性の物質では評価結果にバラツキが大きくなる可能性が示されているが、本試験法は水に難溶性の物質に対応できる方法として、提案されている。さらに、本試験法は必ずしもクリーンベンチでの操作を必要としない簡便な方法であることから、技術のトランスファーは比較的容易と考えられた。しかしながら、酵母試験における非水溶性物質の評価については更に検討が必要とのことから、水に難溶性の物質への対応可能性を本試験法の有用性の根拠することについては明確ではないものと考えられた。よって、少なくとも4水難溶性物質を用いたバリデーションの実施を要望する。

本試験法の実施に費やす時間は、個々の試験はいずれも1日以内であるが、バッテリー試験法であり、単独の試験では陰性結果を判定できないことから、単独の試験結果で評価する3T3-NRU法より、時間を要する。いずれの試験系も陽性対照物質が設定されていることから大きな問題ではないが、緬羊保存血やドライイーストの反応性のロット間差の有無やドライイーストの保存条件や期間の試験データへの影響について、SOP等で言及する必要性について、考慮すべきと考えられた。

提案のバッテリー試験法を受け入れる条件として、3T3-NRU法単独よりバッテリー試験法が優位な一致性を示す必要があるのか、それとも一致性が同等であっても、他のメリットがあれば、良いのかについて、多施設バリデーション開始前に本試験法の評価委員会による一次評価において検討され、同等ならば、受け入れても良いとの見解が示されている。よって、評価委員会が指摘した点に対応した改訂プロトコルを用いた追加バリデーションにより、3T3-NRU法と同等の感度であること、結果が安定していることが示されるなら、試験法として有用であるものと考えられる。

12. その他（特許の有無など）

本試験法に関する特許は申請されていない。

なお、本評価書のパブリックコメントにおいて、提案者より添付1のような質問を受け、添付2のような回答を評価者が返すとともに、本報告書にも必要なと思われる内容を追記した。

13. 文献

OECD Guidance for Testing of Chemicals: 432, In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD/OCED., 13 April 2004

大野泰雄ら、Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性代替法の評価結果報告 Altern. Animal Test. Experiment., 10(2), 50-157 (2004)

Sugiyama M. et al., A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. Altern. Animal Test. Experiment., 9(1), 29-39 (2002)

Mori M. et al., Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay. Altern. Animal Test. Experiment., 10(1), 1-17 (2004)

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる 光毒性試験代替法の第三者評価報告書に対するコメント

- ①試験法のメリットの一つと考えられている水難溶性物質の評価が十分に行われていない。
難水溶性物質の評価について物質がどれだけあれば十分と言えるか数を示していただきたい(板垣)。
- ②最終的に整備されたプロトコルにおける検討物質数は 9 物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。
本件も受け入れ可能な必要最小限の被験物質数を示して結論付けるべきと考える(板垣)。
- ③3T3-NRU 法との直接比較がなされておらず、同等性あるいは優越性が明確に示されていない。
3T3-NRU 法との比較は投稿論文に記載している。バリデーションでも直接比較を行うべきと考えるのか評価委員会の見解を示していただきたい(板垣)。
- ④異なる光源を使用した際の結果の安定性について評価されていない。
評価委員会はバリデーション結果の評価が目的と考える。SOP で記載していない異なる光源のデータを要求する根拠を示していただきたい(板垣)。
- ⑤温度上昇による結果の差異が言及されているが、この点に関する追加検討が実施されていない。
暗幕の有無による温度上昇に関する追加検討のうえ、SOP を変更したのであるが、さらに必要な追加検討項目を示していただきたい(板垣)。
- ⑥代謝活性化系が設定されていないため、経皮投与以外の全身曝露の際の安全性が評価できない。
本試験法は化粧品や医薬部外品等の外用剤のための光毒性試験として提案している。ご参考までに提出した SOP には、『1. 適用範囲 化粧品、医薬部外品に用いられる基材、薬剤、色素、香料などのうち、紫外部吸収(280nm~400nm)が認められるものに適用する。』と規定している。また OECD ガイドラインに採択された 3T3-NRU についても代謝活性化の系は設定されておらず、評価委員会の主張される全身曝露の際の安全性は評価できないものとするが如何か(板垣)。
- ⑦バッテリーの 2 試験の実施順序を規定する必要性に関する検討がなされていない。

バッテリー法の実施順序に関しては、提案資料 9-2(論文:AATEX, 2, 193-202 (1994).)に記載されている。要旨は適用範囲が広く in vivo との対応性が良い酵母光生育阻害試験を第一次試験とし、その結果が陰性の場合、酵母光生育阻害試験では捉えられない膜破壊を観察する赤血球光溶血試験を実施することとした。これの内容は評価フローとして、技術講習会や評価委員会の説明会でもお話している(板垣)。

⑧酵母光生育阻害試験における陽性判定のカットオフ値について再検討の余地がある。

カットオフ値の再検討について記載されているのは、第一次バリデーションの報告書である。補完試験の報告書には、『SOP 改訂の妥当性が確認できたものと考えられる。陽性物質では施設間差がみられたが、陰性物質と判定された物質には大きな施設間差はみられなかった。SOP 改訂が、陽性判定をより明確に出そうとしたものであったため、阻止帯の差のばらつきを大きくしたのと考えられる。』と記載されており、カットオフ値の再検討について記載されていないが、再検討すべき項目とそれが評価に及ぼす影響を示していただきたい(板垣)。

⑨赤血球光溶血試験の吸光度測定波長の選定に再検討の余地がある。

赤血球光溶血試験は通常、540nm か 525nm で実施されている。再検討すべき項目とそれが評価に及ぼす影響を示していただきたい(板垣)。

平成 22 年 5 月 20 日

株式会社 資生堂
板垣 宏 様

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
薬理部 新規試験法評価室
小島 肇

酵母光成育阻害試験と赤血球光溶血試験の組み合わせによる光毒性試験代替法
評価報告書について

貴殿から頂きました評価報告書への質問を、JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) の光毒性試験評価委員会および評価会議で議論し、以下のような修正、提言が新たに追加されましたので、ご連絡させていただきます。よろしくご理解頂けますようお願い申し上げます。

1. 第三者評価報告書より、オブザーバーとして記載されていた貴殿のお名前を削除します。
2. 第三者評価報告書 p3 要旨および結論 下から 5 行目「⑥代謝活性化系が設定されていないため、・・・」の前に「3T3-NRU 法と同様に、」を追記します。
3. 本試験法のメリットの一つと考えられている水難溶性物質の評価が不十分であることから、4 物質以上の水難溶性物質（光毒性が報告されている物質も含む）を用いた追加バリデーションが必要であると評価会議は判断しました。バリデーション実施には JaCVAM としても協力を惜しみませんので、ご連絡をお待ちしております。
4. 当初、本試験法に関する論文から、本試験法の光毒性の予測性は高いと判断され、バリデーションは施設間再現性を確認するため、9 物質のみで実施されました。その結果、施設間再現性が高いことを確認できましたが、バリデーションの過程でプロトコルの改良がなされ、新たなプロトコルを用いたデータによる予測性が不明であると評価委員会は判断しました。バリデーションを行う必要はありませんが、資生堂が過去の検討試験で用いた 24 物質程度（バリデーションが終了している物質は必要ありません）の追加データを提出頂きますようお願い致します。
5. 3T3-NRU 法との同等性あるいは優位性につきましても、改定プロトコルでのデータを用いて判断したいと評価委員会は考えております。ご了承下さい。
6. 評価会議報告書および第三者評価報告書のその他の部分は修正しません。ご了承下さい。

以上

光毒性試験代替法バリデーション研究 報告書

2008年1月7日

光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会、
及び、酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会
委員長 吉村 功

1. 経緯

日本動物実験代替法学会評価委員会（評価委員会）は、2003年7月、「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー」（酵母-赤血球試験）の施設間差がどの程度であるか検討することを、日本動物実験代替法学会会長（学会会長）を經由して日本動物実験代替法学会バリデーション委員会（バリデーション委員会）に要請した。

バリデーション委員会は、光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会（主実験実行委員会）を組織し、2003年9月に研究を開始した。研究結果は2004年8月に主実験実行委員会からバリデーション委員会に、さらにバリデーション委員会から学会会長を經由して評価委員会に提出された。評価委員会は、この報告書を検討して、酵母光生育阻害試験の標準試験手順（standard operating procedure; SOP）に改善の余地があるという評価を行い、2006年6月、補完実験を通してSOP改訂を行うことを、学会会長を經由してバリデーション委員会に要請した。

バリデーション委員会は、2006年7月、新たに酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会（補完実験実行委員会）を組織して補完実験を開始した。研究結果は2006年12月にバリデーション委員会に報告され、さらに学会会長を經由して評価委員会に提出された。

評価委員会は、2007年1月に報告書を検討し、両報告書をまとめた報告書の作成を両実行委員会の委員長であった吉村に要請した。本報告書は、この要請の下で、両報告書提出後に補足された議論も含めて、バリデーション研究全体をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究が結論を提出すべき主要課題は、酵母-赤血球試験の結果が施設間でどの程度変動するかを、多施設試験を行って把握することであり、副次課題は、多施設試験を行って試験結果の再現性を改善するSOP改訂の提案を行うことである。

3. 研究の遂行

研究は、施設間差に焦点を合わせて実験行ってその結果を総括したもの（主実験）と、SOP改訂の影響を確かめることに焦点を合わせて実験を行ってその結果を総括したもの（補完実験）の、2つに分けて行われた（資料1~4を参照）。

3-1) 実験参加施設

3-1-1) 主実験

実験を行ったのは、公募に応募した次の6施設である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター

(株)資生堂安全性・分析センター

(財)食品薬品安全センター秦野研究所

東洋ビューティ(株)中央研究所

日本メナード化粧品(株)総合研究所

マルホ(株)京都R&Dセンター

3-1-2) 補完実験

実験を行ったのは、上記6施設の内から実験参加が不可能になった1施設を除いた、次の5施設

設である。新たな施設公募を行わなかったのは、後で述べるように、光生育阻害試験については補完実験を行わず、主実験の結果を利用することにしたためである。

- (株)コーセー研究本部品質保証センター
- (株)資生堂安全性・分析センター
- (財)食品薬品安全センター秦野研究所
- 日本メナード化粧品(株)総合研究所
- マルホ(株)京都 R&D センター

3-2) 実験

3-2-1) 主実験

各施設は、提案されている酵母-赤血球試験の SOP に従って、指定された被験物質の光毒性を実験的に評価した。ただし、予備実験において発生した疑義に応じて SOP の補足が行われたので、最終的に用いられた SOP は資料 5 に示すものである。

3-2-2) 補完実験

SOP が問題になった試験は、酵母光生育阻害試験だけで、赤血球光溶血試験は SOP を変えることを求められなかった。実験の負担を考慮して、補完実験は酵母光生育阻害試験のみで実験をすることにした。

しかし、酵母-赤血球試験では、表 1 に示すように、二つの試験の結果を合わせて評価を行うので、赤血球光溶血試験については主実験の結果を使うことにした。その結果、参加施設を、主実験を行った施設に限ることになり、結果として、実験施設は 5 施設となった。補完実験で採用した酵母光生育阻害試験の SOP は資料 6 に示すものである。

表 1 二つの試験からの総合判定の規則

		赤血球光溶血試験		
		陽性	擬陽性	陰性
酵母光生育 阻害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	擬陽性	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性	陽性	擬陽性	陰性

3-3) 被験物質

3-3-1) 主実験

被験物質は、表 2 に示す 16 物質から 9 物質を試料準備担当者が選択し、表 3 に○で示した 6 物質を物質名及び光毒性の有無を隠して、酵母光生育阻害試験の陽性対照 (8-Methoxypsoralen) , 赤血球光溶血試験の陽性対照 (Acridine) と共に、各施設に配布した。

施設名は a, b, ..., f というコードで表しておき、データ解析が終了した後に明示した。

以下では、「陽性」「positive; P」「+」を全く同じものとして、説明文では「陽性」を使い、表での省略形を「P」とする。「擬陽性」「equivocal; E」「+/-」や、「陰性」「negative; N」「-」についても同様である。

表 2 被験物質候補となった 16 物質と *in vivo* での評価

物質名	<i>In vivo</i> 判定			物質名	<i>In vivo</i> 判定		
	本バリ デーショ ン採用の 評価	資 生 堂 評価 (評 価点)	EU/ COLIPA 採用の評 価		本バリ デーショ ン採用の 評価	資 生 堂 評 価 (評価 点)	EU/ COLIPA で採用さ れた評価
<u>Amiodarone</u>	P		P	4- <i>t</i> -Butyl-4-me thoxydibenzoy lmethane(BM DM)	N	N(0)	

Anthracene	P	P(1.8)	P	Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Bithionol	N	N(0)	P	Piroxicam	N	N(0)	N
Chlorhexidine(C HD)	N		N	Rose Bengal	N	N(0)	E
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P	3,3',4',5-Tetra chlorosalicylan ilide(TCSA)	P	P(1.5)	
5-Methoxypsora len(5-MOP)	P	P(2.7)	P	8-Methoxypsor alen(8-MOP)	P	P(4.8)	P
Sodium lauryl sulfate(SLS)				6-Methylcoum arin(6-MC)	N	N(0)	P
2-Ethylhexyl- <i>p</i> - dimethylaminob enzoate(EDA)	E	E(1.0)		Acridine	P	P(2.1)	P

注：資生堂の *in vivo* 判定はモルモットの結果，ECVAM, EU/COLIPA の判定はヒトの結果によつていいる。 *In vivo* 判定において，空白はデータなし，である。

資生堂判定についての文献：

- (1) Sugiyama, M., et al. (1994a) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay. *Alternative to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 183-191.
- (2) Sugiyama, M., Itagaki, H. and Kato, S. (1994b) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system with photohemolysis assay. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 193-202.

EU/COLIPA の *in vivo* 判定についての文献：

- (1) Spielman 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(4)**, 793-796.
- (2) Spielman 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(3)**, pp. 305-327.
- (3) Spielman H., et al. (2000) The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, **28(6)**, 777-814.

表3 選択した9被験物質と各施設への割り付け。○印が該当被験物質を割り当てた施設

被験物質名	コード	<i>in vivo</i> 判定	施設コード					
			a	B	C	d	e	f
Anthracene	A	P	○	○	○	○	×	×
<u>Amiodarone</u>	B	P	○	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	×	○	○	○	○

BMDM	I	N	×	×	○	○	○	○
------	---	---	---	---	---	---	---	---

3-3-2) 補完実験

実験を酵母光阻害試験のみで行うという制約から、被験物質とその割り当ては主実験と同じものにした。その内容は表4の通りで、主実験と違うのは施設bが無いことだけである。試料コードは、予測可能性を小さくするために、主実験と異なるものにした。

表4. 各施設に割り付けた物質 (○印)

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	c	d	e	f
Anthracene	A	P	○	○	○	×	×
Amiodarone	B	P	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	○	○	○	○
BMDM	I	N	×	○	○	○	○

3-4) 光源と強度計

太陽光のシミュレーション光源については、各施設がそれぞれ1台のDr. Hönle社のSOL500を用いた。

3-4-1) 主実験での補正

強度計に機差が認められたので、各施設で標準計にあわせた換算係数をかけて強度の補正をおこなった。換算係数は、各施設で記録されている。

3-4-2) 補完実験での強度計の補正

強度計の校正を2006年7月に行ったところ、標準としている強度計と大きく異なった値を示すものが2台あったので、この2台の施設には、標準としている強度計を送って自施設の実験の際に再度校正を行って換算係数を定め、実験を行うこととした。その換算係数は各施設で記録されている。

3-5) 吸光度の測定波長

主実験における赤血球光溶血試験では、光溶血度についての吸光度を、測定波長540nmと525nmの2種類で実施し、主解析を540nmでの測定値とした。525nmでの測定が測定機器の関係で困難なときは、520nmあるいは530nmで代用することを認めた。

赤血球光溶血試験は主実験のみで行ない、補完実験では主実験のデータを利用した。

3-6) 実験条件の記録

主実験と補完実験の両方とも、GLP準拠で実験し、すべての実験施設が定められた様式で、指定された測定機器や実験条件などを記録した。

4. 実験データの管理と解析

4-1) データクリーニング

4-1-1) 主実験

各施設から送られたデータを吟味し、酵母光生育阻害試験 39 ファイル、赤血球光溶血試験 183 ファイルについて、生じた疑問点を問い合わせ、必要な修正を行った。その内容は以下の通りである。

- (1) 必要なデータが入力されていない (16 件),
- (2) 規定したフォーマット形式にデータが入力されていない (1 件),
- (3) プロトコルや事前に決められたルールに適合していない (48 件),
- (4) 単純な入力ミス (6 件),
- (5) 試験実施施設からの誤りであるとの報告 (3 件),
- (6) 紙媒体で提出されたデータと電子媒体で送られてきた結果が一致しない (54 件),
- (7) その他 (94 件)

SOP では、各試験で 2 回の本実験を行ない、2 回の結果が大きく異なった場合は追加実験を 1 回行なうことになっていた。追加実験が行われた場合は、本実験の中の追加実験と結果が類似している方を採用して 2 回の実験結果とした。追加実験を 2 回行っている場合は、先に行った方を 1 回の追加実験とした。

被験物質コードは、データクリーニングを行ってデータが固定された後に被験物質割付担当者からデータ解析担当者に開示された。実行委員会に施設コードと被験物質コードが開示されたのは、2004 年 5 月の検討会である。

4-1-2) 補完実験

主実験の経験を生かして、データシートを改善した結果、クリーニングが必要なデータファイル数は、わずか 2 件に減少した。いずれも、データシートへの転記ミスである。

4-2) 施設内再現性

本研究の主要課題は施設間再現性の検討であるが、施設内で再現性がなければ施設間再現性の吟味が無意味になる。そこでまず施設内再現性を吟味した。

4-2-1) 主実験

本実験の 2 回の結果を、1 回ずつの 2 試験とした組み合わせについて、2 回の判定結果が同じかどうかを調べた。その結果、表 5 に示した場合には、実験を反復したときに異なる結果が生じる可能性があることが分かった。

施設 b は特に結果が悪かった。その原因を検討したところ、実験者が使用機器に慣れておらず、例えば光照射による温度変動を制御していなかったことが分かった。これによって結果が不安定となり、他の実験施設と異なる結果を導いたものと思われた。次項で施設間差を評価するときは、これを考慮に入れた検討を行うこととした。

施設 c の物質 H については、赤血球光溶血試験で 1 回目と 2 回目が大きく異なった結果が得られていたが、追加実験でこれが補正されているので次項の検討には影響しないと考えられる。施設 c の物質 B については、結果としての陰性と擬陽性の違いはあるが、測定値としては、それほど大きな差ではないので、酵母-赤血球試験にある程度の施設内再現性が認められたものとして施設間再現性を検討した。

表 5 施設内の実験反復で結果が異なる可能性のある施設・被験物質組み合わせ

施設	被験物質	可能性
b	A	E または P
	B	N または E
	C	E または P
	D	N または E または P
	F	N または P

c	B	N または E
	H	N または P

4-2-2) 補完実験

主実験と同様、平均値ではなく、個別の測定値を用いて施設内再現性を評価した。追加実験をした場合には酵母-赤血球試験で使わないことになっている本実験の測定値も、施設内再現性の評価には用いることにした。この特殊な取り扱いによる判定での（陽性、擬陽性、陰性）を平均値での判定によるものと区別するために、前者を（+、+/-、-）と表記し、後者を（P、G、N）と表記することにした。

この表記を用いると、陽性対照については2回の判定がすべての施設で(++)であり、9被験物質については表6の場合に施設内で判定の違いが生じていた。補完実験での施設内再現性は明らかに主実験より良くなっている。SOPの改訂で施設内再現性が改善されたと考えられる。

表6 施設内で異なる結果が出た場合

		被験物質	可能性
施設	c	H	+/- or +
	d	B	+/- or +
	f	F	+/- or +

4-3) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

4-3-1) 主実験

酵母-赤血球試験による判定結果をまとめると表7が得られる。施設bを除いて考えると、陽性と陰性が混在する物質はない。物質A、B、Dで陽性と擬陽性が混在、物質Hで陰性と擬陽性が混在している。この擬陽性をどう考えるかが、施設間再現性の評価を左右する。

実行委員会では、カットオフ値の変更と用量相関性を考慮に入れた判定が必要であるという意見が出たが、これを考慮することによる再現性の改善は認められなかった。

この結果を *in vivo* 判定と比べると、表8-1、8-2が得られる。前者は施設bを除いた場合、後者は施設bを含めた場合である。

表8-1、8-2において採用している指標の定義は次の通りである。

感度 I：陽性物質を陽性と判定した割合

感度 II：陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度：陰性物質を陰性と判定した割合

一致度 I： *In vivo* 判定と実験判定が一致した割合

一致度 II：擬陽性判定を陽性判定とみなしたときに *in vivo* 判定と実験判定が一致した割合

表8-1、8-2においては、感度IIがかなり大きな値であるのに、特異度は小さな値であることが目立っている。その主たる原因は、物質C、Hの *in vivo* 判定が陰性なのに、実験判定のほとんどが陽性または擬陽性であることである。

まず物質Cの *in vivo* 判定の根拠を表2で見ると、ここでは判定が文献によるものであって実験値が明瞭には示されていない。この判定の妥当性の再検討が必要である。

次に物質Hの実験データを見ると、擬陽性を示した3施設の全てにおいて、酵母光生育阻害試験での反応が、カットオフ値ぎりぎり擬陽性になっている。従って、現在設定されているカットオフ値の妥当性の再検討が必要と思われた。

表7 施設間再現性（P：陽性、E：擬陽性、N：陰性）

被験物質	コード	<i>In vivo</i> 判定	施設					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	E	E	P		
Amiodarone	B	P	P	N	P	E		
CHD	C	N	P	P	P	P		

CPZ	D	P	P	E			E	P
Bithionol	E	N	P	P			P	P
SLS	F	N	N	P			N	N
Acridine	G	P			P	P	P	P
6-MC	H	N			N	E	E	E
BMDM	I	N			N	N	N	N

表 8-1 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性（施設 b を除いた場合）

	施設コード					平均
	A	c	D	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/13 (77%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/17 (47%)
一致度 I	4/6 (67%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/30 (60%)
一致度 II	4/6 (67%)	5/6 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	21/30 (70%)

表 8-2 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性（施設 b を含めた場合）

	施設コード						平均
	a	b	C	D	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/16 (63%)
感度 II	3/3 (100%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	15/16 (94%)
特異度	1/3 (33%)	0/3 (00%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/20 (40%)
一致度 I	4/6 (67%)	0/6 (0%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/36 (50%)
一致度 II	4/6 (67%)	2/6 (33%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	23/36 (64%)

4-3-2) 補完実験

表 9 は施設間再現性の検討結果を要約したものであり、表 10 は *in vivo* の結果との類似性を評価したものである。採用している指標は上と同じであるが、感度 I と感度 II の値が同じだったので、一致度については両者を区別しなかった。

SOP 改訂の結果、感度は高くなったが、特異度は低くなり、結果として一致度の改善は実現しなかった。

表 9 施設間再現性（P：陽性，E：擬陽性，N：陰性）

被験物質	コード	<i>In vivo</i> 判定	施設				
			a	c	d	e	f
アントラセン	A	P	P	P	P		
アミオダロン	B	P	P	P	P		
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P		
クロルプロマジン	D	P	P			P	P
ピチオノール	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	E
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルケマリン	H	N		E	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

表 10 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (540nm)

	施設コード					平均
	A	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	103/13 (100%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	8/17 (42%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

5. 考察

5-1) 各被験物質の実験結果の特徴

5-1-1) 主実験

個々の実験での判定について解析者がまとめた特徴は表 11 の通りである。それぞれ注意点があるので、SOP の改訂や今後のバリデーション研究での被験物質選択において参考にすべきであろう。

赤血球光溶血試験では、陽性対照が陽性にならないという現象がいくつかの施設で見られた。その原因は、当初予定していた Veronal buffer と Sigma 社製 acridine をそれぞれ PBS(-)と東京化成社製 acridine に変更したことの影響と考えられた。前者に基づいて作成した SOP では、光溶血性反応が不十分になる例が生じたためと考えられた。SOP を設定するとき、陽性対照をどのように使うかについて、十分な吟味が必要である。

表 11 データに表れた被験物質の特徴

	酵母光生育阻害試験	赤血球光溶血試験 (540nm)	<i>In vivo</i>
物質 A	・施設 a での差がやや大 ・施設 b のばらつき大	・施設 d の陽性という判定はカットオフ値ぎりぎり	・陽性
物質 B	・施設 a,c,d では用量反応があるが、施設 b では傾向がない	・全施設で用量反応がない	・陽性
物質 C	・照射・非照射で用量反応あるが差では用量反応が不明確	・全施設で陽性 ・非照射でも用量反応あり ・施設 b での再現性が無い	・陰性
物質 D	・照射・非照射で用量反応あり ・施設 a で照射・非照射の差がやや大	・施設 a,b,e で非照射の溶血度が大きい ・全施設で非照射での用量反応があり、照射に対する関係が複雑	・陽性
物質 E	・施設 a で差が大 ・差の用量反応は不明確	・全施設で明確に陽性 ・非照射でもやや反応あり	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 F	・全施設で用量反応ない	・施設 b のばらつき大	・陰性
物質 G	・全施設で判定が微妙 ・非照射でもやや反応あり	・全施設で陽性 ・非照射での反応がほとんどない	・陽性
物質 H	・全施設で判定が微妙	・全施設で反応がほとんどない ・施設 c は再実験で陰性	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 I	・全施設で用量反応ない	・全施設で用量反応ない	・陰性

(資)：資生堂，(E/C)：EU/COLIPA

5-1-2) 補完実験

SOP 改訂は、陽性対照を確実に陽性対照と判定することに焦点を合わせて行われた。その結果、すべての施設で陽性対照が陽性判定となった。改訂の妥当性が確認できたと考えられる。しかしこのことは、阻止帯の長さをより長い方に伸ばすことになったため、阻止帯の差のばらつきを大きくする傾向を生み出し、結果として施設間で大きなばらつきを生じさせたと考えられる。

5-2) SOP の改訂について

5-2-1) 主実験

本研究では、本試験に先立って、SOP への修正提案が実験担当者などから出された。提案の内に次に示すものは、担当の森、穂谷の検討の後で、SOP の改訂や追加説明に取り入れられた。

- (1) 両試験とも、当初の SOP では、データの記入方法の詳細が明確でなかった。本研究の際には記録用紙のフォーマットを更新した。
- (2) 酵母光生育阻害試験では阻止帯の境界線が不明確な場合が生じた。このような場合の測定方法について SOP の記載を改めた。

提案の内、次に示すものは、今後の SOP 改訂の際に検討すべきことであり、酵母-赤血球試験の評価を行うときは、これについての検討が必要と思われる。

- (3) 用量設定試験や本試験の設定のやり方を SOP に記載すべきである。
- (4) 溶媒選択の方法と理由について、方針を SOP に説明しておくべきである。
- (5) 今回は被験物質を 4 倍希釈系列で実験したが、この倍率設定の妥当性を検討すべきである。
- (6) 試験の繰り返しの基準を明確にする必要がある。
- (7) 酵母光生育阻害試験では、酵母含有プレートに試薬を含ませたる紙を着装した後の UV 照射までの時間、すなわち寒天培地中への拡散のための時間の設定を SOP に記載することが望ましい。
- (8) 酵母光生育阻害試験では、照射後、試験期間終了まで、ろ紙をそのままにしておくのか、それとも除去するのか明確にすべきである。すなわち、検体の曝露時間を明確にすることが必要である。
- (9) 赤血球光溶血試験では、24 穴マイクロプレートから 96 穴マイクロプレートに移すときの割付方法を SOP に図入りで示しておくことが望ましい。
- (10) 両試験とも SOP が手順の順に書かれていないので、SOP にフローチャートを挿入しておくことが望ましい。
- (11) 両試験とも光照射の有無による結果のみを求めているが、酵母光生育阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を測定値として記録し、用量反応を確認する判定を検討すべきである。

5-2-2) 補完実験

物質 A (アントラセン) や物質 B (アミオダロン) などの陽性物質では施設間差がみられたが、陰性と判定された物質には、大きな施設間差がみられなかった。SOP 改訂が、陽性判定をより明確に出そうとしたものであったため、阻止帯の差のばらつきを大きくしたと考えられる。

中間報告会の討論において、実験担当者から阻止帯の測り方について疑問が出た。プレートの底まで円が貫通しているものと表面だけに円が見られるものがあったためである。報告会の後で試験法の提案者で検討を行ってもらい、表面だけでもよいという結論が提出された。その結果として、SOP の該当部分に測定法の改訂が行われた(資料 7)。

物質 E (ピチオノール)、物質 F (SLS)、物質 H (6-メチルクマリン) は施設によって酵母試験の判定が異なったが、阻止帯の差の値に極端に大きな違いはなかった。改訂 SOP の下でも、酵母試験は、これら 3 物質で得られた程度の施設間差がある試験法と考えられる。

5-3) 判定のカットオフ値

酵母光生育阻害試験では阻止帯の径の差、赤血球光溶血試験では溶血度の差に、陽性・陰性のカットオフ値が定められている。本研究での実験結果によると、後者については SOP での値を変更する必要が感じられなかったが、前者については再検討の必要性が感じられた。

すなわち、酵母光生育阻害試験の判定基準が、以前の論文では 2mm であったものが、今回は光源の変更に伴い一致率を高めるためということで 5mm とされた。そこで今回の実験では、阻止帯の径差が 2mm 以上 5mm 未満の場合を擬陽性としたが、実験結果を見ると、阻止帯のカットオフ値を、例えば 3mm~4mm に変更することで施設間再現性が良くなる。酵母光生育阻害試験については、カットオフ値を再検討すべきであろう。

一般に試験法の結果判定では、陽性対照が明確に陽性を示すことが前提になる。それなのに本研究で、各施設から得られた陽性対照の値は、今回設定のカットオフ値 5mm 付近に密集していた。これは、カットオフ値の再検討が必要であることを示している。

5-4) *In vivo* 判定の妥当性

表 1 の陽性・陰性等の判定において、資生堂の方はモルモットについての測定値によっているが、ECVAM 等の方は文献から結果のみを引用したものであり、その根拠となるデータは入手できなかった。被験物質 C (Chlorhexidine) の酵母—赤血球試験では、全施設で明確な陽性が見られたにもかかわらず、*in vivo* 判定が逆だったことは *in vivo* 判定の根拠の再確認の必要性を示している。

一致度は *in vivo* 判定を基準にしているのので、*in vivo* 判定で擬陽性を考えないで、一致度を評価するときは、実験判定での擬陽性をどちらかに含めるべきであろう。感度と一致度で 2 種類の指標を検討したのはそのためである。

5-5) バッテリーの役割

二つの試験を総合して判定する規則は表 1 に示したように、陽性>擬陽性>陰性 の順で強い判定の方を採用することになっている。この規則では、先に試験をすることになっている酵母光生育阻害試験で陽性であれば、もう 1 つの試験はする必要がないが、本研究では、相互関係を確かめることもあって、全ての場合について両方の試験を行うことにした。

結果として、赤血球光溶血試験が必要でなかったかどうかを調べると、表 12 が得られる。表中で () で囲んであるのが赤血球光溶血試験が不要だった実験で、太字で示したものが酵母光生育阻害試験の結果を総合判定で変更させた実験である。36 実験中 14 実験で、バッテリーでの判定が酵母光生育阻害試験単独と変わっている。両者の組み合わせであることが大きな意味を持っていると言える。

しかし、これは両者のどちらを先にするかは無関係である。施設での作業のしやすさの関係で赤血球光溶血試験を先に行っても差し支えないことを、SOP に明記しておくべきであろう。

表 12 二つの試験の役割 (P: 陽性, G: 擬陽性, N: 陰性)

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A	a	P	(E)	P	B	a	P	(N)	P	C	a	E	P	P
	b	E	E	E		b	N	N	N		b	N	P	P
	c	E	N	E		c	P	(N)	P		c	N	P	P
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	P	P
D	a	P	(P)	P	E	a	P	(P)	P	F	a	N	N	N
	b	N	E	E		b	E	P	P		b	N	P	P
	e	E	N	E		e	E	P	P		e	N	N	N
	f	N	P	P		f	E	P	P		f	N	N	N
E	c	P	(P)	P	H	c	N	N	N	I	c	N	N	N
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	N	N
	e	E	P	P		e	E	N	E		e	N	N	N
	f	E	P	P		f	E	N	E		f	N	N	N

5-6) 吸光度の測定波長

赤血球光溶血試験の SOP では、吸光度の測定波長を 540nm にすることを標準にしていたが、表 13 に示されているように、525nm 前後での判定の方が感度、一致度の両面で良い結果を与えている。どちらの波長を標準にするかについて適切な SOP 改訂が必要である。

表 13 *In vivo* 判定との類似性の吸光度測定波長による違い

左：赤血球光溶血試験での吸光度を 540nm で評価，右：525nm で評価（単位は%）

感度 I：陽性物質を陽性と判定した割合，感度 II：陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合，
特異度：陰性物質を陰性と判定した割合，一致度：判定結果が *in vivo* の結果と一致した割合

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	F	
感度 I	100	0	67	67	50	100	63.9
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	0	67	50	50	67	50.0
一致度 II	67	33	83	67	67	67	64.0

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	100	67	67	67	100	100	83.3
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度 II	67	33	83	67	83	67	77.8

5-7) SOP 逸脱例

赤血球光溶血試験で SOP から次のような逸脱例が生じた。逸脱を生じさせないような技術研修での注意をすべきである。

- (1) 24 穴プレートから 96 穴プレートに分ける際に、実施が 2 系列でなされなかった。
=> 分けるのは測定のためなので、このデータを本研究のデータとして採用した。
- (2) 予備試験と本試験 1 回目の陽性対照に、自施設で購入したものをを用いたので訂正のために実験を 2 回追加した。
=> 2 回目と 3 回目の測定値を採用した。
- (3) 被験物質の濃度設定を誤ったので、新たに 2 実験を行った。
=> 追加した 2 実験のデータを採用した。
- (4) 1 回目と 2 回目が大きく食い違ったので、実験を 2 回追加した。
=> 3 回目までのデータを採用した。

5-8) 将来のバリデーション研究における留意点

実験参加者から、将来のバリデーション研究で留意すべきこととして、以下の指摘が出された。

- (1) 光毒性試験の施設間変動を調べるバリデーション研究の場合、実験装置のみでなく、実験室の広さや採光・遮光の条件を事前に明確しておくべきである。
- (2) 光毒性については、今回の使用したものと異なる光源を用いた場合に結果がどのように変わるか検討すべきである。
- (3) 今回の研究では、SOP で光源とフィルターを指定したが、試験法を一般化するときは光源を特定の機器にするのではなく、機器の性能で指定する方が望ましい。その条件を検討すべきである。
- (4) 結果論であるが、被験物質 C の *in vivo* 判定の妥当性が本研究の大きな焦点となった。今後の研究では、事前に *in vivo* 判定の根拠を調べ、それが十分でない物質は被験物質に含めないことが必要である。

6. 本研究のまとめ

6-1) 酵母-赤血球試験の妥当性

補完実験で用意した SOP による実験結果は、感度が 100%、特異度が 42%、一致度 60%であった。SOP 改訂によって、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性とするのが少ないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

SOP 改訂により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面では SOP 改訂は妥当であったと考えられる。

6-2) 施設間差

実験技術に問題があって施設を除けば、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。補完実験で用意した SOP を用いたときの施設間差は小さいと思われる。

6-3) カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。これを適切に定めることによって感度を高めることができるかもしれない。

6-4) 吸光度の測定波長

実験結果によれば、540nm より 525nm 前後の波長帯を用いる方が良かったので、SOP では波長を 525nm に変更することを検討すべきである。

6-5) データマネジメント

主実験では大幅なデータクリーニングが必要であったが、記入書式等を改善した補完実験では修正すべきところのごくわずかになった。

6-6) SOP 改訂の影響

陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。SOP 改訂の一つの結果と考えられる。

添付資料

- 資料 1 主実験研究計画書
- 資料 2 主実験研究報告書
- 資料 3 補完実験研究計画書
- 資料 4 補完実験研究報告書
- 資料 5 主実験 SOP
- 資料 6 補完実験 SOP
- 資料 7 酵母光生育阻害試験の最終改訂 SOP

光毒性試験代替法バリデーション研究 報告書

2004年8月27日

光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会
委員長 吉村 功

1. はじめに

日本動物実験代替法学会代替法評価委員会（以下「評価委員会」という）は、2003年7月29日、日本動物実験代替法学会バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」という）に、「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（以下「酵母-赤血球試験」）の施設間バリデーションを行うことを要請した。（別添え資料1「合同委員会議事録」を参照のこと。）

バリデーション委員会は、要請に応じるため、別添え資料2「光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書」（以下、計画書の添付資料も含めて「計画書」という）に述べるように、「光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会」（以下「実行委員会」という）を組織し、2003年10月16日に研究を開始した。

実行委員は、

板垣宏、大野泰雄、大森崇、岡本裕子、川端留美、小島肇夫、田中憲穂、土肥孝彰、
藤田百合子、穂谷昌利、森眞輝、吉村功（委員長）、若栗忍

の13人で、その所属等は計画書の添付資料の通りである。

実行委員会は、計画書にそって、2003年11月13,14日に食品薬品安全センター（秦野）で技術研修会を開催した。実験参加施設への機材送付等は、大野が2003年度末までに行った。実験参加施設は2003年中に実技復習を行い、2004年1月から4月中旬までの間に実験を終え、データを解析担当の大森に送付した。大森はデータクリーニング・解析を行った上、2004年5月7日の検討会に結果を報告した。

本報告書は、検討会後に補足されたことを含めて、研究全体の内容をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究が解答を与えるべき主要課題は、酵母-赤血球試験の結果が施設間でどの程度変動するか、多施設試験を行って定量的に把握することである。副次課題は、提案されている酵母-赤血球試験の標準手順（standard operating procedure; SOP）の各指示、とりわけ陽性・陰性の判定法が適切かどうかを吟味することである。

3. 研究の遂行

研究はほぼ計画書にそって遂行された。

3-1) 実験施設

実験を行った施設は、公募に応じた次の6施設で、括弧内は実験担当者である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター	(岡本裕子, 谷川浩子)
(株)資生堂安全性・分析センター	(森眞輝, 穂谷昌利)
(財)食品薬品安全センター秦野研究所	(若栗忍)
東洋ビューティ(株)中央研究所	(藤田百合子)
日本メナード化粧品(株)総合研究所	(長谷川靖司)
マルホ(株)京都R&Dセンター	(土肥孝彰)

3-2) 被験物質

被験物質は表1に示す16物質から、9物質を大野が選択しコード化した。

各施設には、表2中に○で示された6物質が、物質名及び光毒性の有無を隠して、酵母光生育阻害試験の陽性対照(8-Methoxypsoralen)、赤血球光溶血試験の陽性対照(Acridine)と共に配布された。

これらの物質名・施設名は2004年5月7日の検討会で明らかにされたが、本報告書では施設名をa,b,...,fというコードで表し、どのコードがどの施設であるかを示さないことにした。

以下では、「陽性」「positive; P」「+」を全く同じものとして、説明文では「陽性」を使い、表での省略形を「P」とする。「擬陽性」「equivocal; E」「+/-」や、「陰性」「negative; N」「-」についても同様である。

表1 被験物質候補となった16物質と*in vivo*での評価

物質名	<i>In vivo</i> 判定			物質名	<i>In vivo</i> 判定		
	本バリ デーショ ン採用の 評価	資生堂 評価(評 価点)	EU/ COLIPA 採用の評 価		本バリ デーショ ン採用の 評価	資生堂 評価 (評価 点)	EU/ COLIPA で採用さ れた評価
<u>Amiodarone</u>	P		P	4- <i>t</i> -Butyl-4-methoxydibenzoylmethane(BM DM)	N	N(0)	
Anthracene	P	P(1.8)	P	Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Bithionol	N	N(0)	P	Piroxicam	N	N(0)	N
<u>Chlorhexidine(C HD)</u>	N		N	Rose bengal	N	N(0)	E
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	P	P(1.5)	
5-Methoxypsoralen(5-MOP)	P	P(2.7)	P	8-Methoxypsoralen(8-MOP)	P	P(4.8)	P
Sodium lauryl sulfate(SLS)				6-Methylcoumarin(6-MC)	N	N(0)	P
2-Ethylhexyl- <i>p</i> -dimethylaminobenzoate(EDA)	E	E(1.0)		Acridine	P	P(2.1)	P

注：資生堂の*in vivo*判定はモルモットの結果、ECVAM, EU/COLIPAの判定はヒトの結果によっている。*In vivo*判定において、空白はデータなし、である。

資生堂判定についての文献：

- (1) Sugiyama, M., et al. (1994a) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay. *Alternative to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 183-191.
- (2) Sugiyama, M., Itagaki, H. and Kato, S. (1994b) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system with photohemolysis assay. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, **2**, 193-202.

EU/COLIPAの*in vivo*判定についての文献：

- (1) Spielman 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(4)**, 793-796.
- (2) Spielman 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(3)**, pp. 305-327.

(3) Spielman H., et al. (2000) The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, **28(6)**, 777-814.

表2 選択した9被験物質と各施設への割り付け。○印が該当被験物質を割り当てた施設

被験物質名	コード	<i>in vivo</i> 判定	施設コード					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	○	○	○	○	×	×
Amiodarone	B	P	○	○	○	○	×	×
CHD	C	N	○	○	○	○	×	×
CPZ	D	P	○	○	×	×	○	○
Bithionol	E	N	○	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	○	×	×	○	○
Acridine	G	P	×	×	○	○	○	○
6-MC	H	N	×	×	○	○	○	○
BMDM	I	N	×	×	○	○	○	○

3-3) 光源

太陽光のシミュレーション光源については、6施設がそれぞれ1台のDr. Hönle社のSOL500を用いた。

3-4) 吸光度の波長

赤血球光溶血試験で光溶血度を測定する際の吸光度測定は波長540nmと525nmの2種類で実施したが、主解析を540nmフィルターの測定値に基づくことにした。525nmでの測定が測定機器の関係で困難なときは、520nmあるいは530nmで代用することを認めた。これについては後で考察する。

3-5) 実験条件の記録

GLP準拠で実験することにしたので、すべての実験施設が、そこで定められている測定機器や実験条件などの記録のコピーを大野に送付した。

4. 実験データの管理と解析

4-1) データ量

実験で得られたデータは各施設から、大森と吉村に送られた。

そのファイル数は、本実験と予備実験をあわせて、酵母光生育阻害試験が228、赤血球光溶血試験が192であった。データ解析は大森が担当した。前記検討会に提出された資料、及びその後の追加資料は別添え資料3「データ解析報告書」の通りである。以下の説明はこの報告書を要約したものであるから、詳細についてはこの報告書で確かめることができる。

4-2) データクリーニング

大森は、各施設から送られたデータを吟味し、酵母光生育阻害試験の39ファイル、赤血球光溶血試験の183ファイルについて、生じた疑問点を問い合わせ、必要な修正を行った。その内容は

- (1) 必要なデータが入力されていない (16件),
- (2) 規定したフォーマット形式にデータが入力されていない (1件),

- (3) プロトコルや事前に決められたルールに適合していない (48 件),
- (4) 単純な入力ミス (6 件),
- (5) 試験実施施設からの誤りであるとの報告 (3 件),
- (6) 紙媒体で提出されたデータと電子媒体で送られてきた結果が一致しない (54 件),
- (7) その他 (94 件)

であった。

データクリーニングを行ってデータを固定した後、被験物質コードが大野より大森に開示された。施設コードと被験物質コードが実行委員会に開示されたのは、2004 年 5 月 7 日検討会である。

4-3) 結果の判定規則

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のそれぞれの SOP にもとづいて、各試験で 2 回の本実験が行なわれた。2 回の結果が大きく異なった場合は追加実験が 1 回行なわれているので、本実験の中で追加実験結果に近い方を当該試験での評価結果とした。

本研究の結果判定としては、表 3 に示すように、2 試験のどちらかで陽性と判定された被験物質を光毒性「陽性」、擬陽性と陰性の組み合わせになった被験物質を光毒性「擬陽性」、両試験で陰性と判定された被験物質を光毒性「陰性」とした。

表 3 二つの試験からの総合判定の規則

		赤血球光溶血試験		
		陽性	擬陽性	陰性
酵母光生育 阻害試験	陽性	陽性	陽性	陽性
	擬陽性	陽性	擬陽性	擬陽性
	陰性	陽性	擬陽性	陰性

4-4) 施設内再現性

本研究の主要課題は施設間再現性の検討であるが、施設内で再現性がなければ施設間再現性の吟味が無意味になる。そこでまず施設内再現性を吟味した。

すなわち、本実験の 2 回の結果を、1 回ずつ別々の 2 試験とした組み合わせについて、2 回の判定結果が同じかどうかを調べた。その結果、表 4 に示した場合には、実験を反復したときに異なる結果が生じる可能性があることが分かった。

施設 b で特に再現性が悪かった理由について検討したところ、施設 b では、実験器具の関係で、実験者の使い慣れた実験室ではなく、他施設を借用して実験を行っていた。そのため、例えば光照射による温度変動を制御するのが困難という条件が生じていた。これによって結果が不安定となり、他の実験施設と異なる結果を導いたものと思われる。次項で施設間差を評価するときは、これを考慮に入れて検討を行う。

施設 c の物質 H については、赤血球光溶血試験で 1 回目と 2 回目が大きく異なった結果が得られたためであるが、追加実験でこれが補正されているので次項の検討には影響しないと考えられる。施設 c の物質 B については、結果としての陰性と擬陽性の違いはあるが、測定値としては、それほど大きな差ではないので、酵母-赤血球試験にある程度の施設内再現性が認められたものとして施設間再現性を検討する。

表 4 施設内の実験反復で結果が異なる可能性のある施設・被験物質組み合わせ

施設	被験物質	可能性
b	A	E または P
	B	N または E
	C	E または P
	D	N または E または P
	F	N または P
c	B	N または E
	H	N または P

4-5) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

酵母-赤血球試験による判定結果をまとめると表5が得られる。施設bを除いて考えると、陽性と陰性が混在する物質はない。物質A, B, Dで陽性と擬陽性が混在、物質Hで陰性と擬陽性が混在している。この擬陽性をどう考えるかが、施設間再現性の評価を左右する。

これについて実行委員会では、後で考察するように、カットオフ値の変更と用量相関性を考慮に入れた判定が必要であるという意見が出たが、これによって十分な再現性があるという結論には至らなかった。

この結果を *in vivo* 判定と比べると、表6-1, 6-2が得られる。前者は施設bを除いた場合、後者は施設bを含めた場合である。

表6-1,2において採用している指標の定義は次の通りである。

感度 I: 陽性物質を陽性と判定した割合

感度 II: 陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度: 陰性物質を陰性と判定した割合

一致度 I: *In vivo* 判定と実験判定が一致した割合

一致度 II: 擬陽性判定を陽性判定とみなしたときに *in vivo* 判定と実験判定が一致した割合

表6-1,2においては、感度IIがかなり大きな値であるのに、特異度は小さな値であることが目立っている。その主たる原因は、物質C, Hの *in vivo* 判定が陰性なのに、実験判定のほとんどが陽性または擬陽性であることである。

まず物質Cの *in vivo* 判定の根拠を表1で見ると、ここでは判定が文献によるものであって実験値が明瞭には示されていない。この判定の妥当性の再検討が必要である。

次に物質Hの実験データを見ると、擬陽性を示した3施設の全てにおいて、酵母光生育阻害試験での反応が、カットオフ値ぎりぎり擬陽性になっている。従って、現在設定されているカットオフ値の妥当性の再検討が必要である。

表5 施設間再現性 (P: 陽性, E: 擬陽性, N: 陰性)

被験物質	コード	<i>In vivo</i> 判定	施設					
			a	b	c	d	e	f
Anthracene	A	P	P	E	E	P		
Amiodarone	B	P	P	N	P	E		
CHD	C	N	P	P	P	P		
CPZ	D	P	P	E			E	P
Bithionol	E	N	P	P			P	P
SLS	F	N	N	P			N	N
Acridine	G	P			P	P	P	P
6-MC	H	N			N	E	E	E
BMDM	I	N			N	N	N	N

表6-1 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (施設bを除いた場合)

	施設コード					平均
	a	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/13 (77%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/17 (47%)
一致度 I	4/6 (67%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/30 (60%)
一致度 II	4/6 (67%)	5/6 (87%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	21/30 (70%)

表 6-2 *In vivo* 判定に対する実験判定の類似性 (施設 b を含めた場合)

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	0/3 (0%)	2/3 (67%)	2/3 (67%)	1/2 (50%)	2/2 (100%)	10/16 (63%)
感度 II	3/3 (100%)	2/3 (67%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	15/16 (94%)
特異度	1/3 (33%)	0/3 (00%)	2/3 (67%)	1/3 (33%)	2/4 (50%)	2/4 (50%)	8/20 (40%)
一致度 I	4/6 (67%)	0/6 (0%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	4/6 (67%)	18/36 (50%)
一致度 II	4/6 (67%)	2/6 (33%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	4/6 (67%)	23/36 (64%)

5. 考察

5-1) 各被験物質の実験結果の特徴

個々の実験での判定について解析者がまとめた特徴は表 7 の通りである。それぞれ注意点があるので、SOP の改訂や今後のバリデーション研究での被験物質選択において参考にすべきと思われる。

赤血球光溶血試験では、陽性対照が陽性にならないという現象がいくつかの施設で見られた。穂谷がその原因を調べたところでは、当初予定していた Veronal buffer と Sigma 社製 acridine をそれぞれ PBS(-) と東京化成社製 acridine に変更したことが影響し合ったため、前者で用意した SOP のままでは、光溶血性反応が不十分になる例が生じたためのものである。

これについては更に検討を進め、SOP の改訂に反映させるべきであろう。

表 7 データに表れた被験物質の特徴

	酵母光生育阻害試験	赤血球光溶血試験 (540nm)	<i>In vivo</i>
物質 A	・施設 a での差がやや大 ・施設 b のばらつき大	・施設 d の陽性という判定はカットオフ値ぎりぎり	・陽性
物質 B	・施設 a,c,d では用量反応があるが、施設 b では傾向がない	・全施設で用量反応がない	・陽性
物質 C	・照射・非照射で用量反応あるが差では用量反応が不明確	・全施設で陽性 ・非照射でも用量反応あり ・施設 b での再現性が無い	・陰性
物質 D	・照射・非照射で用量反応あり ・施設 a で照射・非照射の差がやや大	・施設 a,b,e で非照射の溶血度が大きい ・全施設で非照射での用量反応があり、照射に対する関係が複雑	・陽性
物質 E	・施設 a で差が大 ・差の用量反応は不明確	・全施設で明確に陽性 ・非照射でもやや反応あり	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 F	・全施設で用量反応ない	・施設 b のばらつき大	・陰性
物質 G	・全施設で判定が微妙 ・非照射でもやや反応あり	・全施設で陽性 ・非照射での反応がほとんどない	・陽性
物質 H	・全施設で判定が微妙	・全施設で反応がほとんどない ・施設 c は再実験で陰性	・(資)陰性、 (E/C)陽性
物質 I	・全施設で用量反応ない	・全施設で用量反応ない	・陰性

(資)：資生堂、(E/C)：EU/COLIPA

5-2) SOP

本研究では、本試験に先立って、SOP への修正提案が実験担当者などから出された。提案の内に示すものは、担当の森、穂谷の検討の後で、SOP の改訂や追加説明に取り入れられた。

- (1) 両試験とも、当初の SOP では、データの記入方法の詳細が明確でなかった。本研究の際には記録用紙のフォーマットを更新した。
- (2) 酵母光生育阻害試験では阻止帯の境界線が不明確な場合が生じた。このような場合の測定方法

について SOP の記載を改めた。

提案の内、次に示すものは、今後の SOP 改訂の際に検討すべきことであり、酵母-赤血球試験の評価を行うときは、これについての検討が必要と思われる。

- (3) 用量設定試験や本試験の設定のやり方を SOP に記載すべきである。(注：1 月に対応済み。)
- (4) 溶媒選択の方法と理由について、方針を SOP に説明しておくべきである。(注：1 月に対応済み。)
- (5) 今回は被験物質を 4 倍希釈系列で実験したが、この倍率設定の妥当性を検討すべきである。
- (6) 試験の繰り返しの基準を明確にする必要がある。
- (7) 酵母光生育阻害試験では、酵母含有プレートに試薬を含ませたる紙を着装した後の UV 照射までの時間、すなわち寒天培地中への拡散のための時間の設定を SOP に記載することが望ましい。
- (8) 酵母光生育阻害試験では、照射後、試験期間終了まで、ろ紙をそのままにしておくのか、それとも除去するのか明確にすべきである。すなわち、検体の曝露時間を明確にすることが必要である。
- (9) 赤血球光溶血試験では、24 穴マイクロプレートから 96 穴マイクロプレートに移すときの割付方法を SOP に図入りで示しておくことが望ましい。
- (10) 両試験とも SOP が手順の順に書かれていないので、SOP にフローチャートを挿入しておくことが望ましい。(注：1 月に対応済み。)
- (11) 両試験とも光照射の有無による結果のみを求めるようになっているが、酵母光生育阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を測定値として記録し、用量反応を確認する判定を検討すべきである。

5-3) 判定のカットオフ値

酵母光生育阻害試験では阻止帯の径の差、赤血球光溶血試験では溶血度の差に、陽性・陰性のカットオフ値が定められている。本研究での実験結果によると、後者については SOP での値を変更する必要が感じられなかったが、前者については再検討の必要性が感じられた。

すなわち、酵母光生育阻害試験の判定基準が、以前の論文では 2mm であったものが、今回は光源の変更に伴い一致率を高めるためということで 5mm とされた。そこで今回の実験では、阻止帯の径差が 2mm 以上 5mm 未満の場合を擬陽性としたが、実験結果を見ると、阻止帯のカットオフ値を、例えば 3mm~4mm に変更することで施設間再現性が良くなる。酵母光生育阻害試験については、カットオフ値を再検討すべきであろう。

一般に試験法の結果判定では、陽性対照が明確に陽性を示すことが前提になる。それなのに本研究で、各施設から得られた陽性対照の値は、今回設定のカットオフ値 5mm 付近に密集していた。これは、カットオフ値の再検討が必要であることを示している。

なお、両試験とも光照射の有無における差に対してカットオフ値を設定し、陽性・陰性を判定しているが、酵母光育成阻害試験では阻止帯の径を、赤血球光溶血試験では溶血度を反応値として用量反応を確認し、これも判定に利用する判定方法も検討すべきであろう。

5-4) *In vivo* 判定の妥当性

表 1 の陽性・陰性等の判定において、資生堂の方はモルモットについての測定値によっているが、ECVAM 等の方は文献から結果のみを引用したものであり、その根拠となるデータは入手できなかった。被験物質 C (Chlorhexidine) の酵母-赤血球試験では、全施設で明確な陽性が見られたにもかかわらず、*in vivo* 判定が逆だったことは *in vivo* 判定の根拠の再確認の必要性を示している。

一致度は *in vivo* 判定を基準にしているので、*in vivo* 判定で擬陽性を考えないで、一致度を評価するときは、実験判定での擬陽性をどちらかに含めるべきであろう。感度と一致度で 2 種類の指標を検討したのはそのためである。

5-5) バッテリーの役割

二つの試験を総合して判定する規則は表3に示したように、陽性>擬陽性>陰性の順で強い判定の方を採用することになっている。この規則では、先に試験をすることになっている酵母光生育阻害試験で陽性であれば、もう1つの試験はする必要がないが、本研究では、相互関係を確かめることもあって、全ての場合について両方の試験を行うことにした。

結果として、赤血球光溶血試験が必要でなかったかどうかを調べると、表8が得られる。表中で()で囲んであるのが不要だった実験で、太字で示したものが酵母光生育阻害試験の結果を総合判定で変更させた実験である。36実験中14実験で、バッテリーでの判定が酵母光生育阻害試験単独と変わっている。両者の組み合わせであることが大きな意味を持っていると言える。

表8 二つの試験の役割 (P: 陽性, G: 擬陽性, N: 陰性)

物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合	物質	施設	酵母	赤血球	総合
A	a	P	(E)	P	B	a	P	(N)	P	C	a	E	P	P
	b	E	E	E		b	N	N	N		b	N	P	P
	c	E	N	E		c	P	(N)	P		c	N	P	P
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	P	P
D	a	P	(P)	P	E	a	P	(P)	P	F	a	N	N	N
	b	N	E	E		b	E	P	P		b	N	P	P
	e	E	N	E		e	E	P	P		e	N	N	N
	f	N	P	P		f	E	P	P		f	N	N	N
E	c	P	(P)	P	H	c	N	N	N	I	c	N	N	N
	d	E	P	P		d	E	N	E		d	N	N	N
	e	E	P	P		e	E	N	E		e	N	N	N
	f	E	P	P		f	E	N	E		f	N	N	N

5-6) 吸光度の測定波長

本研究では、吸光度の測定波長を540nmにすることを標準にしたが、同時に525nm前後の波長でも測定を行った。両者の結果を比較すると、表9が得られる。わずかではあるが、525nm前後で判定の方が感度、一致度の両面で良い結果を与えている。評価の際には、どちらの波長を標準にするかの判断が必要と思われる。

表9 *In vivo* 判定との類似性の吸光度測定波長による違い

左: 赤血球光溶血試験での吸光度を540nmで評価, 右: 525nmで評価 (単位は%)

感度 I: 陽性物質を陽性と判定した割合, 感度 II: 陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合, 特異度: 陰性物質を陰性と判定した割合, 一致度: 判定結果が *in vivo* の結果と一致した割合

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	F	
感度 I	100	0	67	67	50	100	63.9
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	0	67	50	50	67	50.0
一致度 II	67	33	83	67	67	67	64.0

	施設コード						平均
	a	b	c	d	e	f	
感度 I	100	67	67	67	100	100	83.3
感度 II	100	67	100	100	100	100	94.4
特異度	33	0	67	33	50	50	38.9
一致度	67	33	67	50	67	67	58.3
一致度 II	67	33	83	67	83	67	77.8

5-7) SOP 逸脱例

赤血球光溶血試験で SOP から次のような逸脱例が生じたので、その取り扱いを大森、小島、吉村で検討し、以下に示す対処を行った。

(1) 24穴プレートから96穴プレートに分ける際に、実施が2系列でなされなかった。

=> 分けるのは測定のためなので、このデータを本研究のデータとして採用した。

(2) 予備試験と本試験 1 回目の陽性対照に、自施設で購入したものをを用いたので訂正のために実験を 2 回追加した。

=> 2 回目と 3 回目の測定値を採用した。

(3) 被験物質の濃度設定を誤ったので、新たに 2 実験を行った。

=> 追加した 2 実験のデータを採用した。

(4) 1 回目と 2 回目が大きく食い違ったので、実験を 2 回追加した。

=> 3 回目までのデータを採用した。

5-8) 将来のバリデーション研究における留意点

実験参加者から、将来のバリデーション研究で留意すべきこととして、以下の指摘が出された。

(1) 酵母光生育阻害試験では、判定に個人差がどれくらい影響するかを検討すべきである。

(2) 光毒性試験の施設間変動を調べるバリデーション研究の場合、実験装置のみでなく、実験室の広さや採光・遮光の条件を事前に明確にしておくべきである。

(3) 光毒性については、今回の使用したものとは異なる光源を用いた場合に結果がどのように変わるか検討すべきである。

(4) 今回の研究では、SOP で光源とフィルターを指定したが、試験法を一般化するときは光源を特定の機器にするのではなく、機器の性能で指定する方が望ましい。その条件を検討すべきである。

(5) 今回は、施設 b で実験施設上の問題が生じ、研究結果の解釈にあいまいさを残した。また、陽性対照が確かに陽性反応を示さなかったり、GLP 遵守が不十分であったりした例も現れた。今後のバリデーション研究では、技術研修の後で試用試験を行い、実験設備・試薬・技術・SOP の妥当性を再確認し、改善・対処を行うべきである。

(6) 結果論であるが、被験物質 C の *in vivo* 判定の妥当性が本研究の大きな焦点となった。今後の研究では、事前に *in vivo* 判定の根拠を調べ、それが十分でない物質は被験物質に含めないことが必要である。

6. 本研究のまとめ

6-1) 酵母-赤血球試験の妥当性

本研究の結果が表 6-1 にまとめられたとすると、感度 II が 100%、特異度が 47%、というのが一応の実験結果である。擬陽性を陽性とすれば、陽性物質を誤って陰性といわないという意味で、酵母-赤血球試験の有用性が示されたことになる。

6-2) 施設間差

実験条件に問題があった施設 b を除けば、施設間の違いは陽性と擬陽性、擬陽性と陰性の範囲に収まっていた。

6-3) カットオフ値

赤血球光溶血試験のカットオフ値については特に目立った問題は見られなかったが、酵母光生育阻害試験のカットオフ値には再検討の余地が見出された。これを適切に定めることによって感度を高めることができるかもしれない。

6-4) 吸光度の測定波長

実験結果によれば、540nm より 525nm 前後の波長帯を用いる方が良かったので、SOP でも波長を 525nm に変更することを検討すべきである。

6-5) 判定方法の改善

2 回の実験の再現性吟味と、酵母-赤血球試験での総合判定には用量反応関係を利用する方が良いと思われる。特に非照射下での結果に用量反応関係がある場合は慎重な判定を行うべきである。

6-6) GLP 遵守

かなり大幅なデータクリーニングが必要であった。GLP 遵守を徹底すべきである。

別添え資料

1. 合同委員会議事録
2. 「光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書」(添付資料一式)
3. 「データ解析報告書」(一式)

光毒性試験代替法バリデーション研究 補完実験報告書

2006年12月28日

酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会
委員長 吉村 功

1. はじめに

日本動物実験代替法学会（以下「本学会」）バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」）は、本学会会長より、2006年6月16日に「酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験を組み合わせた光毒性試験バッテリー（以下「酵母-赤血球試験」）のための酵母光生育阻害試験（以下「酵母試験」）について、改訂 SOP の妥当性検証のためのバリデーション研究を行うことを依頼された（資料(2)参照）。

これは2004年に報告された酵母光-赤血球試験のバリデーション研究（以下「前研究」）の結果に対して、本学会評価委員会（以下「評価委員会」）が SOP に不備があることを指摘してその改訂を求め、結果として2006年6月にその改訂が行われたためである。

バリデーション委員会は、依頼に応じるため、「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」（以下、「実行委」、資料(7)参照）を組織し、研究（以下「本研究」）を委託した。実行委員は、板垣宏、石川牧恵、石川公平、大森崇、岡本裕子、川端留美、小島肇、田中憲穂、土肥孝彰、長谷川靖、穂谷昌利、吉村功（委員長）の12人である。

実行委は、「光毒性試験代替法補完実験計画書」（以下「計画書」、資料(6)参照）に基づいて2006年7月4日の打合会を出発点として、石川牧恵、今井教安、米澤理一郎、松永康明、若栗忍の6人を実験担当者として、組織的な研究を開始した。

実行委は、計画書にそって、強度計の校正、被験物質の選択、試料・機材の配布を行い、実験担当者は改訂 SOP に従って、予備実験と本実験を9月末までに行った。データ解析担当者は、実験担当者から送られたデータを吟味・確認した上で解析を行い、データ解析報告書 ver1.1 を作成した。実行委は、2006年10月30日に中間報告会を開催して内容を検討し、データ解析報告書と SOP の改訂について意見をまとめた。

本報告書は、中間報告会後に補足されたことを含めて、研究全体の内容をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究の目的は、今回の SOP 改訂が、酵母-赤血球試験における施設内変動、施設間変動を縮小するという側面、in vivo の結果の予測という側面で有用であるかを、実験を通して吟味することである。

3. 研究の遂行

研究は概ね計画書にそって遂行された。

3-1) 実験の方針

酵母-赤血球試験は2つの試験を併せて光毒性を評価する試験であるから、本来なら補完実験も前研究と同様な規模で行うべきであった。しかしながら(1) 今回の改訂は酵母試験に限定されていた、(2) 前回の規模で実験を行うことは実験施設の負担が大きすぎて実行不可能であった、という2つの理由から、実行委は、本研究での実験を酵母試験のみで行うことにした。そのため、実験参加施設、被験物質共に前研究の赤血球光溶血試験（以下「赤血球試験」）のデータが存在するものに限定せざるを得なかった。すなわち、赤血球試験に関しては前研究のデータを用いることとなった。

3-2) 実験施設

実験を行った施設は、前研究に参加した6施設のうち、前実験の施設代表委員が当該施設を退職した1施設を除く、以下の5施設である。(括弧内は実験担当者)

(株)コーセー研究本部品質保証センター (今井教安)
 (株)資生堂安全性・分析センター (石川牧恵)
 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 (若栗忍)
 日本メナード化粧品(株)総合研究所 (松永康明)
 マルホ(株)京都R&Dセンター (米澤理一郎)

3-3) 被験物質とその割り当て

実験の方針上の制約から、被験物質とその割り当ては前研究と同じものであり、その内容は表1の通りである。試料送付におけるコードは、予測可能性を小さくするように前研究と異なるものとした。

表1 各施設で実験を行った物質(○印)

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	c	D	e	f
アントラセン	A	P	○	○	○	×	×
アミオダロン	B	P	○	○	○	×	×
クロルヘキシジン	C	N	○	○	○	×	×
クロルプロマジン	D	P	○	×	×	○	○
ピチオノール	E	N	○	×	×	○	○
SLS	F	N	○	×	×	○	○
アクリジン	G	P	×	○	○	○	○
6-メチルクマリン	H	N	×	○	○	○	○
Parsol 1789	I	N	×	○	○	○	○

3-4) 光源と強度計の校正

太陽光のシミュレーション光源はすべての施設でDr. Hönle社のSOL500にした。光の強度計の校正を2006年7月10日に行ったところ、標準としている強度計と大きく異なった値を示すものが2台あったので、この2台の施設には、標準としている強度計を送って自施設の実験の際に再度校正を行って換算係数を定め、実験を行うこととした。その換算係数はデータとして報告されている。

3-5) 吸光度の測定波長と実験条件の記録

前研究と全く同じとした。(資料(9)参照)

4. 結果の要約

実験で得られたデータは、計画書に従ってデータ解析担当者に送られ、解析された。

その詳細は「データ解析報告書 ver1.2」(資料(5)参照)の通りである。以下の説明はこの報告書を要約したものであるから、細部を確かめたいときはこれを参照していただきたい。

4-1) 施設内再現性

本研究では、施設内データ量が少なので施設内再現性を評価するのが困難である。その難点を緩和するために、酵母-赤血球試験としては平均値を用いるべき繰り返しの測定値を、個別の測

定値として扱って施設内再現性の評価に利用した。また、酵母-赤血球試験では使わないことになっている測定値も施設内再現性の評価に用いた。そのデータは表2の通りである。

この特殊な取り扱いによる判定での（陽性、擬陽性、陰性）を平均値での判定によるものと区別するために、この報告では、前者を（+、+/-、-）と表記し、後者を（P、G、N）と表記することにした。

この表記を用いると、陽性対照については2回の判定がすべての施設で(++)であり、9被験物質については表3の場合に施設内で判定の違いが生じていた。この結果は前研究より施設内再現性の良いものであるから、SOPの改訂によって施設内再現性は改善されたと考えられる。

改訂SOPでの酵母試験の用量反応曲線は、ほとんどの施設で1回目と2回目と同じ傾向であったが、そうでない施設も散見された。SOP改訂によっても施設内ばらつきは多少残っていると考えられる。

表2 施設内再現性評価に利用したデータ

		被験物質コード	試験法	実験回数	施設内再現性	施設間再現性	理由
施設コード	e	D	酵母	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	酵母	2	○	×	
	f	F	酵母	2	○	×	・予備試験および本試験1回目の結果とあわず光毒性陽性となったが、原因は不明。やり直しのため、3回目を実施。よって2回目の結果は施設間再現性の評価からは除外。
	a	D	赤血球	1	○	×	・用量の設定を間違えて、後に追加の2試験が提出されているため施設間再現性の評価から除外。
		D	赤血球	2	○	×	
	c	H	赤血球	4	○	×	・計画書には4回目を実施するようには記載されていない。
	e	D	赤血球	1	○	×	・1回目はその施設で購入した陽性対照物質を用いて実験が実施されており、後に2試験を実施しているため施設間再現性の評価からは除外。(実質的には指標の計算に陽性対照は使われていない)
		E	赤血球	1	○	×	
		F	赤血球	1	○	×	
		G	赤血球	1	○	×	
H		赤血球	1	○	×		
	I	赤血球	1	○	×		

表3 施設内で異なる結果が出た場合

		被験物質	可能性
施設	c	H	+/- or +
	d	B	+/- or +
	f	F	+/- or +

4-2) 施設間再現性および *in vivo* 判定との類似性

表4は施設間再現性の検討結果を要約したものである。採用している指標は次の通りである。

感度I：陽性物質を陽性と判定した割合

感度II：陽性物質を陽性または擬陽性と判定した割合

特異度：陰性物質を陰性と判定した割合

一致度： *In vivo* 判定と判定が一致した割合

注：感度Iと感度IIの値が同じだったので、特異度については両者を区別しなかった。

表4 施設間再現性 (P:陽性, E:擬陽性, N:陰性)

被験物質	コード	In vivo 判定	施設				
			A	c	d	e	F
アントラセン	A	P	P	P	P		
アミオダロン	B	P	P	P	P		
クロルヘキシジン	C	N	P	P	P		
クロルプロマジン	D	P	P			P	P
ピチオノール	E	N	P			P	P
SLS	F	N	N			N	G
アクリジン	G	P		P	P	P	P
6-メチルクマリン	H	N		G	N	P	P
Parsol 1789	I	N		N	N	N	N

表5 In vivo 判定に対する実験判定の類似性 (540nm)

	施設コード					平均
	a	c	d	e	f	
感度 I	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	103/13 (100%)
感度 II	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	13/13 (100%)
特異度	1/3 (33%)	1/3 (33%)	2/3 (67%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)	8/17 (42%)
一致度	4/6 (67%)	4/6 (67%)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	3/6 (50%)	18/30 (60%)

すべての施設 (3 または 4 施設) で判定が陽性となった陰性物質は 1 物質 (物質 C, クロルヘキシジン) のみで, 前研究の 2 物質と比較して減少した。物質 C は, 本研究で実施された酵母光生育阻害試験でも用量反応関係がほぼ見られなかったため, 陽性判定は赤血球光溶血試験のためである。

5. 考察

5-1) SOP 改訂の陽性対照に関する影響

SOP 改訂は, 陽性対照を確実に陽性対照と判定することに焦点を合わせて行われた。その結果, すべての施設で陽性対照が陽性判定となった。改訂の妥当性が確認できたと考えられる。しかしこのことは, 阻止帯の長さをより長い方に伸ばすことになったため, 阻止帯の差のばらつきを大きくする傾向を生み出し, 結果として施設間で大きなばらつきを生じさせたと考えられる。

5-2) 被験物資による SOP 改訂の影響の違い

物質 A (アントラセン) や物質 B (アミオダロン) などの陽性物質では施設間差がみられたが, 陰性と判定された物質には, 大きな施設間差がみられなかった。SOP 改訂が, 陽性判定をより明確に出そうとしたものであったため, 阻止帯の差のばらつきを大きくしたと考えられる。

5-3) 阻止円の測り方

中間報告会の討論において, 実験担当者から阻止円の測り方について疑問が出た。プレートの底まで円が貫通しているものと表面だけに円が見られるものがあったためである。報告会の後で試験法の提案者で検討を行ってもらい, 表面だけでもよいという結論が提出された。その結果として, SOP の該当部分に測定法の改訂が行われた。(資料(8)4.18 参照)

5-4) 酵母試験での施設間差

物質 E (ピチオノール), 物質 F (SLS), 物質 H (6-メチルクマリン) は施設によって酵母試験の判定が異なったが, 阻止帯の差の値に極端に大きな違いはなかった。改訂 SOP の下でも, 酵

母試験は、これら3物質で得られた程度の施設間差がある試験法と考えられる。

6. まとめ

最後に、補完実験の研究で得られた結果をまとめておく。

6-1) SOP改訂により、陽性対照の判定はすべての施設で陽性判定となった。この面ではSOP改訂の妥当性であったと考えられる。

6-2) バッテリーシステムでの判定は、感度Ⅰ、感度Ⅱともに100%であった。SOP改訂によって、前研究では擬陽性領域にあった物質に陽性判定が下されたためである。それにもかかわらず特異度も改善されたから、SOP改訂は有用であったと考えられる。

6-3) 陽性物質の阻止帯の差の施設間差はやや大きくなった。SOP改訂の一つの結果と考えられる。

6-4) すべての施設(3または4施設)で、バッテリーシステムでの判定とIn vivoの結果が一致したのは9物質中4物質で、前研究の2物質より多かった。これもSOP改訂の結果である。

6-5) すべての施設(3または4施設)で判定が陽性となった陰性物質は1物質(物質C, クロルヘキシジン)のみで、前研究の2物質と比較して減少した。これもSOP改訂の結果である。

光毒性試験代替法バリデーション研究試験計画書

2003年10月16日 当初作成者 吉村 功
2003年10月22日 改訂責任者 吉村 功
2003年11月05日 改訂責任者 吉村 功
2003年11月24日 改訂責任者 吉村 功

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（以下「本学会」という）バリデーション委員会が、実行委員会を組織して行うものである。

本研究には、試行錯誤的な側面があるので、研究遂行中に計画の変更を余儀なくされることがある。その際には本計画書を逐次改定し、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を明記する。

1. 研究目的

本研究の目的は、酵母光生育阻害試験（以下、「酵母試験」という）と光溶血性試験（以下、「溶血試験」という）の組み合わせ（以下、「試験バッテリー」という）を用いて被験物質の光毒性評価を行うとき、その結果が複数の施設間でどの程度変動するかを、多施設バリデーションを行い定量的に把握することである。もちろん試験バッテリーで評価したいのは、被験物質の生体内（*in vivo*）光毒性を予測することであるから、そのためにどのようなデータ評価法、判定規準が妥当かについての検討も研究目的の内に入る。

2. 実行組織

丁寧に言うと「酵母光生育阻害試験と光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験の施設間バリデーション研究実行委員会」というべきであるが、あまりにも長いので、正式名称を「光毒性試験代替法バリデーション研究実行委員会」として、略称を「光バリ実行委」とする。

メンバーは次の13人で、その連絡先は添付資料1の通りである。

1) 実験参加施設代表：

板垣宏（資生堂）、岡本裕子（コーセー）、小島肇夫（メナード）、田中憲穂（食薬センター）、土肥孝彰（マルホ）、藤田百合子（東洋ビューティ）

2) バリデーション委員会委員

大森崇（京都大）、川端留美（大鵬）、吉村功（理科大、委員長）

3) 評価委員会代表：

大野泰雄（国立衛研）

4) 技術担当：

穂谷昌利（資生堂）、森眞輝（資生堂）、若栗忍（食薬研）

研究遂行においては、大野泰雄が主任研究者を務める厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班の協力を得る。

技術研修、機器手配、試料手配については、資生堂安全性・分析センター、食品薬品安全センター秦野研究所、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部の協力を得る。

3. 光毒性試験代替法についての状況

EU/COLIPA では、光毒性試験代替法として、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した光毒性試験代替法を取り上げて、施設間バリデーションを行っている。その概要は添付資料 2 の通りである。

これに対して日本では、資生堂安全性・分析センターが試験バッテリーの研究を行い、施設内での結果では十分利点を持っていることが証明されたとしている。その内容は添付資料 3-1,3-2 の通りである。

しかしながら本学会評価委員会では、添付資料 3-3 に示すように、多施設でのバリデーションが行われておらず、試験バッテリーの施設間差が確かめられていないという判断を下し、これを研究することを本学会バリデーション委員会に委託した。

バリデーション委員会は、この委託を受けて、2003 年 7 月 29 日に、添付資料 4 に示す議論を行い、研究参加施設を公募し、光バリ実行委を組織し、研究を行うこととした。これが本研究である。

4. 研究日程

- 2003 年 9 月 30 日までに、参加施設確定、実行委員会確定、基本プロトコール作成
- 11 月 13 日、14 日に技術研修会を開催
- 12 月末までに各施設が予備実験等の自己研修
- 2004 年 1 月に試験開始
- 2004 年 2 月末に中間集計、中間報告
- 4 月末までに、実験者が結果を実行委員会に報告
- 8 月末までに、実行委員会が報告書をまとめる

5. 実験参加施設

実験参加施設は、この研究の公募に参加を表明した次の 6 施設である。

- (株)コーセー研究本部品質保証センター（実験担当者：岡本裕子、谷川浩子）
- 資生堂安全性・分析センター（実験担当者：穂谷昌利、森眞輝）
- (財)食品薬品安全センター秦野研究所（実験担当者：若栗忍）
- 東洋ビューティ（株）研究開発部（実験担当者：藤田百合子）
- 日本メナード化粧品（株）総合研究所（実験担当者：長谷川靖司）

マルホ（株）京都R&Dセンター（実験担当者：土肥孝彰）

6. 試験バッテリーの内容

本研究が対象とする試験バッテリーの試験内容は、添付資料 5-1,5-2,5-3 の通りである。

7. 被験物質

被験物質の候補物質リストは添付資料 6 の通りである。

候補物質リストの中から、実施可能性を考慮して、陽性、中間、陰性、各 3 物質の合計 9 物質を大野が選び被験物質とする。各施設には 6 物質（陽性対照物質を含めると 8 物質）を送付する。すなわち、薬物コードと実験施設との割付表は東京理科大（責任者吉村）が作成し、薬物コードへの被験物質の割付と配布は国立衛研（責任者大野）が行う。

被験物質が具体的に何かはブラインドとし、試料にはコードをつけて配布する。ブラインドであるから、実験者は被験物質の使用、保管、廃棄のすべての段階において、それらを劇物として取り扱い、必要な記録を保管しなければならない。

8. 機器、消耗品と被験物質試料の準備

光源は、Dr. Hönle 社の SOL500 とする。光源の手配は、田中が指示する。

資生堂（神奈川）自社の光源

食薬研（神奈川）自社の光源

マルホ（京都）自社の光源（間に合わないときは研究班の光源 3）

コーセー（東京）研究班の光源 1

東洋ビューティ（大阪）研究班の光源 2

メナード（名古屋）研究班の光源 3

マイクロプレート、ペーパーディスク、酵母の手配は、大野が指示する。共通消耗品の費用は、厚生労働科学研究班が負担する。

吸光度は波長 540nm と 525nm の 2 種類で測定するが、主解析は 540nm フィルターを使った測定値に基づいて行う。525nm での測定が測定機器の関係で困難なときは、520nm あるいは 530nm で代用する。赤血球は、実験施設が購入する。

測定機器、実験条件について、GLP 準拠で考えて必要なものはすべて記録しておくこととする。各実験施設は、その記録のコピーを大野に送った上で、原本を実験終了後 5 年間保管し、実行委員長から記録内容について問い合わせがあったら、記録を確かめて回答を行うものとする。

9. 経費

本学会バリデーション委員会委員以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

配布試料や培養プレート等光バリ実行委が送付するもの以外の実験上の消耗品は、各施設で自弁とする。

10. 技術研修と予備実験

技術研修は、11月13, 14日に、食品薬品安全性センター秦野研究所で、添付資料7の要領で行う。

予備実験は、12月末までに各参加施設が自主的に行う。

11. データの管理と解析

実験を行ったらできるだけ早く、添付資料8にある指定データシートに記入して、電子ファイル及び測定機器のプリントアウト又は測定結果を落とした電子ファイルのプリントアウト、酵母試験の場合はプリントアウトした指定データシートへの手書き測定結果のコピーを大森（京都大学）と吉村（東京理科大学）に送付する。記入要領は技術研修会で大森が説明する。

データ内容についての疑問は、吉村または大森が各実験者に問い合わせる。

報告されたデータは東京理科大学（責任者 吉村）と京都大学（責任者 大森）が点検し、疑問点を施設に確認し、必要な修正を行ったところでデータベースに固定する。

大野は、各施設から送られてきた GLP 準拠の記録のコピーを、バリデーション研究の成果が社会的に承認されたと、光バリ実行委が判断するまで保管する。

陰性、陽性の判定はプロトコールに従って各施設で行うが、それとは別に、大森、吉村が、各被験物質に対する測定値の施設間、施設内変動の解析、各試験での用量反応関係の解析、判定基準の妥当性の解析を行う。

赤血球溶血試験では 540nm フィルターを用いた測定値で主解析を行う。

13. 検討会

一応のデータ解析ができた段階で、実行委員と実験者全員の参加の下で、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うための会合を開く。

14. 結果の公表

2004年2月末に中間解析を行い、得られた結果を厚生労働科学研究班の報告にする。

全体の結果は、厚生科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名については、検討会で確定する。

15. 各種問い合わせ先

実験内容についての疑問は森、穂谷に問い合わせること。

光源についての疑問は、若栗に問い合わせること。

被験物質、試料、共通消耗品についての疑問は、大野に問い合わせること。

データシートについての疑問は、大森に問い合わせること。

報告書、データの送付、研究の遂行についての疑問は、吉村に問い合わせること。

16. 添付資料リスト

1. 光バリ実行委名簿
2. 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した光毒性試験代替法の評価報告
3. 提案法の内容に関する資料
 - (3-1) 杉山論文
 - (3-2) 森論文 (10月22日現在のドラフト)
 - (3-3) 大野報告書
4. バリレーション委員会議事録(2003.7.29)
5. 試験標準手順書
 - (5-1) SOP-1
 - (5-2) SOP-2
 - (5-3) SOP-3
6. 被験物質候補リスト
7. 技術研修計画
8. データシート
 - (8-01), (8-02), (8-03), (8-04), (8-05), (8-06), (8-07), (8-08), (8-09), (8-10), (8-11), (8-12), 以上シート①~⑫
 - (8-13) 酵母光生育阻害試験用シートの説明文書
 - (8-14) 赤血球光溶血試験用シートの説明文書

以上

2003年10月22日の改訂内容

1. 杉山真理子が職場移動をして実行委員から外れたこと、アイビー化粧品が実験参加を見合わせたことにより、西澤愛が実行委員会から外れたこと。
2. 添付資料リストをつけたこと。
3. 解析内容をより具体的なものにしたこと。
4. 上記変更に伴う変更を行ったこと。
5. 細部の字句を修正したこと。

以上5点 文責 吉村 功

2003年11月5日の改訂内容

1. 被験物質を9物質にした理由が「実施可能性である」としたこと。
2. 細部の字句の訂正

以上2点 文責 吉村 功

2003年11月24日の改訂内容

1. 525nmのフィルターが購入できないことが分かったので、それに関することを変更した。
2. GLPに準拠した記録を保管することと、コピーを大野に送ることを明記した。
3. データは大森と吉村の両方に送ることを明記した。
4. 記録シートの説明文書を添付文書とし、シート番号を変えた。
5. 細部の字句の訂正

以上5点 文責 吉村 功

光毒性試験代替法補完実験計画書

2006年7月4日 作成者 吉村 功

2006年7月14日 改訂責任者 吉村 功

0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（本学会）バリデーション委員会が、実行委員会を組織して行うものである。研究遂行中に計画を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を記録する。

1. 研究目的

2003年から2004年にかけて行われた酵母光生育阻害試験（酵母試験）と赤血球光溶血性試験（溶血試験）の組み合わせ（試験バッテリー）の多施設バリデーション研究（前実験）において、酵母試験のSOPの不備が指摘された。試験バッテリーの提案者は、2006年5月にSOPの改訂を行った。その改訂の妥当性を検証するための実験（補完実験）を行い、改訂後の試験バッテリーの適用における施設間差を評価することが本研究の目的である。

2. 実行組織

補完実験を行う組織の正式名称を「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」として、略称を「補完実験実行委」とする。

メンバーは次の11人で、その連絡先は添付資料1の通りである。

1) 実験参加施設代表：

板垣宏（資生堂）、岡本裕子（コーセー）、長谷川靖司（メナード）、田中憲穂（食薬センター）、土肥孝彰（マルホ）

2) バリデーション委員会委員

大森崇（京都大）、吉村功（理科大、本実行委の委員長）

3) 技術担当：

穂谷昌利、石川牧恵（資生堂）、小島肇（国立衛研）、石川公平（理科大）

3. 研究日程

2006年7月4日に、第1回補完実験実行委員会を開催し、参加施設、実行委員、実験担当者、実行委員長を確定し、改定SOPと補完実験計画書を確認した。

7月14日までに、試料と校正した強度計を各施設に配送する。

9月16日までに各施設が実験を行う。実験担当者は実験終了後可及的速やかに、データを大森、石川公平、吉村に送付し、GLP準拠の関連資料のコピーを大森に送付する。

10月中旬に中間報告会を開催する。

12月末までに報告書をまとめる

4. 実験参加施設

実験参加施設は次の5施設である。

(株)コーセー研究本部品質保証センター（実験担当者：今井教安）

(株)資生堂品質保証センター（実験担当者：石川牧恵）

（財）食品薬品安全センター秦野研究所（実験担当者：若栗忍）

日本メナード化粧品（株）総合研究所（実験担当者：松永康明）

マルホ（株）京都R&Dセンター（実験担当者：米澤理一郎）

5. 被験物質

各施設で実験する被験物質は前実験と同じであるが、薬物コードは異なったものとする。配布は小島（国立衛研）が行う。実験担当者は被験物質の使用、保管、廃棄すべての段階において、それらを劇物として取り扱い、必要な記録を保管しなければならない。

6. 機器、消耗品と被験物質試料の準備

光源は、Dr. Hönle社のSOL500とする。強度計は小島が校正する。

資生堂（神奈川）自社の光源

食薬研（神奈川）自社の光源

マルホ（京都）自社の光源

コーセー（東京）研究班の光源1

メナード（名古屋）研究班の光源2

マイクロプレート、ペーパーディスク、酵母の手配は、共通消耗品は小島が配布する。

測定機器、実験条件で必要と思われることは各実験施設で記録を保管し、解析の際に問い合わせがあったら報告する。

7. 経費

本学会バリデーション委員会委員以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

補完実験実行委が送付するもの以外の実験上の消耗品は各施設で自弁とする。

8. データの管理と解析

実験を行ったらできるだけ早く、結果を指定データシートに記入して、電子ファイルをメールで大森、石川公平、吉村に送付する。各種記録用紙（GLP準拠関連資料も含む）のコピーは「〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学大学院医学研究科医療統計 大森崇助教授」に送付する。

報告されたデータは石川公平が点検し、疑問点を施設に確認し、必要な修正を行ったところでデータベースに固定する。

9. 検討会

一応のデータ解析ができた段階で、実行委員と実験担当者全員の参加の下で、固定されたデータの確認と解析結果の検討を行うための会合を開く。

10. 結果の公表

2006年12月末までに結果を厚生労働科学研究班の報告にする。

全体の結果は、厚生科学研究班報告書、学会報告、学術論文として公表する。公表の際の著者名については、検討会で確定する。

11. 各種問い合わせ先

実験内容についての疑問は、石川牧恵に問い合わせること。

被験物質、試料、共通消耗品についての疑問は、小島に問い合わせること。

データシートについての疑問は、石川公平に問い合わせること。

報告書、データの送付、研究の遂行についての疑問は、吉村に問い合わせること。

以上

改訂内容（敬称略）

2006年7月14日の改訂

ワープロミス・文章ミスの修正以外の、本質的な改訂部分と改訂理由は次の通りである。

1. 所属・氏名等：石川牧恵，小島肇等から，誤りの修正要求があったので改訂した。
（添付資料の名簿部分にも改訂が及んでいる。）
2. 本実行委の委員長：2-2)において，「委員長」と書かれていたところを「本実行委の委員長」とした。委員長が誰であるか明記しておいた方がよい，という注意を受けたためである。
3. 書類送付先：「8 データの管理と解析」における，書類送付先を，電子媒体の場合は，大森，石川公平，吉村の3人とし，各種記録（GLP 準拠関連資料も含む）のコピーの場合は大森にした。コピー送付は手間のかかる作業なので，1カ所にした方が良く，その場合の宛先としては，データ解析の担当者の大森が最も適当だからである。

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とを組み合わせた光毒性評価バッテリーシステム

原案作成者及びその日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 23 日

承認者と承認日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 25 日

1 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤、香料などのうち、紫外外部吸収（280～400nm）が認められるものに適用する。

2. 試験の進め方

以下の手順に従い、「酵母光生育阻害試験」および「赤血球光溶血試験」を行う。

1) 酵母光生育阻害試験（SOP 番号 P-2）

- 1-1) 酵母光生育阻害試験の実施は SOP P-2 に従う。
- 1-2) 同一被験物質について同一濃度での本試験を 2 回繰り返し、結果として得られた阻止帯の差を被験物質の濃度毎に平均し、評価基準に従って評価する。
- 1-3) 一濃度でも陽性と評価された場合には、被験物質は光毒性陽性と評価する。
- 1-4) 陽性とは評価されなかったが、一濃度でも擬陽性と評価された場合には擬陽性と評価する。
- 1-5) 全ての濃度で陰性と判定された場合には陰性と判定する。

2) 赤血球光溶血試験（SOP 番号 P-3）

- 2-1) 赤血球光溶血試験の実施は SOP P-3 に従う。
- 2-2) 一被験物質について、同一濃度での試験を 2 回繰り返し、その結果を平均し、評価基準に従って評価する。
- 2-3) 一濃度でも陽性と評価された場合には、被験物質は光毒性陽性と評価する。
- 2-4) 陽性とは評価されなかったが、一濃度でも擬陽性と判定された場合には擬陽性と評価する。
- 2-5) 全ての濃度で陰性と判定された場合は陰性と判定する。

3) 総合評価

酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験での評価を基に、以下の表に従って被験物質の光毒性を評価する。

酵母試験/ 溶血性試験	陽性 (+)	擬陽性 (±)	陰性 (-)
陽性 (+)	陽性	陽性	陽性
擬陽性 (±)	陽性	擬陽性	擬陽性
陰性 (-)	陽性	擬陽性	陰性

注：それぞれの試験の繰り返し試験の結果が大きく異なる場合は、さらに一回の試験を追加し、その結果と近い結果が得られた結果とを平均し、評価する。なお、この場合においても、かけ離れた値を出した結果も記録に残す。

4) 試験法の改定

試験法の改定が必要が生じた場合は、バリデーション委員会で検討し、その結果を提案者に示し、承認を受ける。

酵母光生育阻害試験プロトコール

原案作成者及びその日：森 眞輝 平成 15 年 11 月 21 日

承認者と承認日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 25 日

1. 目的

本試験法は、酵母を用いて被験物質の光生育阻害性を評価することを目的とする。本試験法は、光毒性試験の代替法として使用可能である。

2. 原理

光毒性の発現メカニズムは、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカルの生体への作用や、さらには光励起された化学物質自身の生体への作用と考えられている。この作用の生体側標的組織として細胞膜や核を含めた細胞内小器官が考えられる。本法は、光毒性試験代替法としては、細胞膜破壊および細胞内小器官に対する傷害に基づく光毒性を検出する方法である。

3. 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤および香料などのうち、紫外線吸収（280～400nm）が認められるものに適用する。

4. 材料および実験方法

4.1. 試験項目およびプレート枚数

至適濃度を決定するために行う予備試験を 1 回、至適濃度付近において行う本試験を 2 回実施する。いずれの試験とも duplicate で行う。1 回の試験で 6 穴マルチウェルプレート 4 枚（照射プレート 2 枚、非照射プレート 2 枚）を用いるため、1 被験物質あたり少なくとも 6 穴マルチウェルプレート 12 枚を必要とする。

4.2. 対照物質

4.2.1. 陰性対照物質

被験物質溶液の調製に用いた溶媒を陰性対照物質とする。

4.2.2. 陽性対照物質

キサントトキシン (8-methoxypsoralen, ナカライテスク (株)) を用いる。

4.3. 器具類

4.3.1. 6穴マルチウェルプレート

CORNING 社製 No. 25810, COSTAR 社製 No. 3516, FALCON 社製 No. 3846 のいずれかを用いる。同一試験内では製造メーカーおよびロットは同じものを用いる。

4.3.2. ガラス器具

三角フラスコ, メスフラスコ, メスシリンダー, びん, スピッツ型ねじ口ガラス遠心管等。びんについては試験前に高圧蒸気滅菌しておく。

4.3.3. 滅菌済み使い捨て器具

ピペット, 遠沈管等

4.3.4. 濾紙円板

ペーパーディスク (抗生物質検定用), 厚手, 直径 6 mm (東洋濾紙 (株)) を用いる。同一試験内では同じロットのものを用いる。試験前にガラスのシャーレもしくはびんに入れて高圧蒸気滅菌しておく。

4.3.5. アルミ箔

試験前に必要量を高圧蒸気滅菌しておく。

4.3.6. ノギス

デジタルタイプとアナログタイプのものであるが、mm 単位で小数点以下第一位まで測定できるものであればどちらを使用してもよい。

4.3.7. ピンセット

試験前にアルミ箔に包んで高圧蒸気滅菌しておく。

4.3.8. ビニル袋

調製した4%ポテトデキストロース寒天培地含有6穴マルチウェルプレートを数枚もしくは数十枚ずつ重ねて保管する際に使用するので、ビニル袋のサイズは特に限定しない。

4.4. 操作区域

全ての操作は落下細菌の少ないクリーンな部屋で、他の実験による汚染の無い場所で行う。必要に応じてクリーンベンチを用いてもかまわない。

4.5. 滅菌

ガラスびん、濾紙円板、ピンセット、アルミ箔、4.9.の項で調製した3.9%ポテトデキストロース寒天培地および4.10.の項で調製した1.5%ポテトデキストロース寒天培地を高圧蒸気滅菌(121℃, 20 min)する。

4.6. 機器

4.6.1. 太陽光シミュレーション装置

通常は、光源として紫外線A(UVA)領域、紫外線B(UVB)領域および可視光領域に照射スペクトルを持つMetal halide lamp(Dr. Hönle GmbH社製, Bulb, 型番0175)、パワーサプライ(Dr. Hönle GmbH社製, 型番0298)を装備したSOL500(Dr. Hönle GmbH社製, 型番5468)を用いる。フィルターはH1フィルター(Dr. Hönle GmbH社製, 型番4730)を使用する。新しいMetal halide lampは、エネルギー強度が強く、安定していないため約100時間ランプを点灯させてエネルギーを減衰させるとともに安定させる必要がある。

太陽光シミュレーション装置の上部ラベルが読めるような向きで設置する。

4.6.2. 紫外線強度計

UVA の強度測定として、Dr. Hönle GmbH 社製の紫外線強度計 (UVA-Meter, 型番 37) を用いる。

4.6.3. 孵卵器

25℃に設定できるものを用意する。

4.7. 使用酵母

ドライイースト (オリエンタル酵母工業 (株)) を用いる。

4.8. 酵母菌液の調製 (8 項参照 ; 試験記録①, ②, ⑥, ⑦, ⑨使用)

ドライイーストに滅菌生理食塩液を加えて 2 mg/mL の懸濁液を調製する。

4.9. 3.9%ポテトデキストロース寒天培地含有 6 穴マルチウェルプレートの準備 (8 項参照 ; 試験記録②, ③, ④, ⑥使用)

ポテトデキストロース寒天培地 (極東製薬工業 (株)) 39 g に精製水 1 L を加えて溶解する (この割合で必要量を調製する)。高圧蒸気滅菌後、室温にて約 60℃位になるまで放置し、固化しないうちに 6 穴マルチウェルプレートの各ウェルに 7 mL ずつ分注する。固化したら、転倒してビニル袋に入れて室温保存する。ポテトデキストロース寒天培地の高圧蒸気滅菌は 1 回限りとする。調製・滅菌した寒天培地を再度滅菌して使用してはならない。

4.10. 1.5%ポテトデキストロース寒天培地の調製 (8 項参照 ; 試験記録①, ②, ⑥, ⑧使用)

ポテトデキストロース寒天培地 1.5 g を精製水 100 mL に懸濁させて高圧蒸気滅菌する (この割合で必要量を調製する)。ポテトデキストロース寒天培地の高圧蒸気滅菌は 1 回限りとする。調製・滅菌した寒天培地を再度滅菌して使用してはならない。

4.11. トップアガールの調製および酵母の播種 (8 項参照 ; 試験記録⑩使用)

約 45℃で保温中の 1.5%ポテトデキストロース寒天培地 95 mL に、調製した酵母菌液を 5 mL 加え良く混和する（この割合で必要量を調製する）。ドライイーストを含む寒天培地が固化しないうちに、あらかじめ 3.9%ポテトデキストロース寒天培地が添加されている 6 穴マルチウェルプレートに 2 mL/well ずつ重層する。上層のドライイーストを含む寒天培地が固化するまで静置する。

4.12. 溶媒の選択と予備試験における最高溶解濃度の決定法（8 項参照；試験記録①，②，③，⑥，⑦使用）

4.12.1. 原体が固体の場合

溶媒は、水、エタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド（以下、DMSO）のいずれかとする。溶媒の選択は、以下の手順に従って決定する。

- 1) 各溶媒毎に 1 本のスピッツ型ねじ口ガラス遠心管を用意する（計 4 本）。
- 2) スピッツ型ねじ口ガラス遠心管に被験物質を 50 mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を 50 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 1 g/mL を最高濃度とする。なお、攪拌は、遠心管に栓をした後、遠心管の上部を持ち先端を指で数回たたいて行うか超音波破碎機や試験管ミキサーを用いて行う。
- 4) 3) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 50 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 500 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 5) 4) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 100 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 250 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 6) 5) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 300 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 100 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 7) 6) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 500 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 50 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 8) 7) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 1,000 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 25 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 9) 8) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 3,000 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 10 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 10) 4 種溶媒の中で最も高濃度の被験物質を溶解する溶媒を選択する。
- 11) 溶解の程度が同じである場合は、水、エタノール、アセトン、DMSO の順で試験に用いる溶媒を決定する。

4.12.2. 原体が液体の場合

予備試験における最高濃度は原体とする。希釈系列を調製するための溶媒は、水、エタノール、アセトン、DMSO のいずれかとする。溶媒の選択は、以下の手順にしたがって決定する。

- 1) 各溶媒毎に1本の容量が10mLであるスピッツ型ねじロガラス遠心管を用意する(計4本)。
- 2) スピッツ型ねじロガラス遠心管に被験物質を50mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を100 μ L 添加し攪拌する(500 mg/mL)。なお、攪拌は、遠心管に栓をした後、遠心管の上部を持ち先端を指で数回たたいて行うか、超音波破碎機や試験管ミキサーを用いて行う。
- 4) 3) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を100 μ L 添加し攪拌する(250 mg/mL)。
- 5) 4) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を300 μ L 添加し攪拌する(100 mg/mL)。
- 6) 5) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を500 μ L 添加し攪拌する(50 mg/mL)。
- 7) 6) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を1000 μ L 添加し攪拌する(25 mg/mL)。
- 8) 7) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を3000 μ L 添加し攪拌する(10 mg/mL)。
- 9) 4種溶媒の中で最も高濃度の被験物質を溶解する溶媒を選択する。
- 10) 溶解の程度が同じである場合は、水、エタノール、アセトン、DMSO の順で試験に用いる溶媒を決定する。

4. 13. 被験物質溶液の調製(8項参照; 試験記録①, ②, ③, ⑥, ⑦, ⑩使用)

4. 13. 1. 予備試験

被験物質溶液を4水準作製する。希釈においては以下の表に従う。

希釈列	原体が固体の場合	原体が液体の場合
第1水準	最高溶解濃度	原体
第2水準	最高溶解濃度の10分の1	最高溶解濃度
第3水準	最高溶解濃度の100分の1	最高溶解濃度の10分の1
第4水準	最高溶解濃度の1000分の1	最高溶解濃度の100分の1

陽性対照物質としてキサントトキシン0.1 mg/mL エタノール溶液を調製する。

4. 13. 2. 本試験

1) 原体が固体の場合

最高溶解濃度を含む4倍希釈系列を4水準作製する。なお、予備試験において阻止帯の差が最高溶解濃度より低濃度において最大となった場合には、予備試験において阻止帯の差が最大であった濃度の16倍の濃度を本試験の最高濃度とし、最高濃度を含む4倍希釈系列を4水準作製する。

(但し、最高濃度が最高溶解濃度を超える場合は最高溶解濃度を最高濃度とする)。

陽性対照物質としてキサントトキシシン 0.1 mg/mL エタノール溶液を調製する。

2) 原体が液体の場合

原体を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する。なお、予備試験において阻止帯の差が原体より低濃度において最大となった場合には、予備試験において阻止帯の差が最大であった濃度の 16 倍の濃度を本試験の最高濃度とし、最高濃度を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する (但し、最高濃度が原体を超える場合は原体を最高濃度とする)。

陽性対照物質としてキサントトキシシン 0.1 mg/mL エタノール溶液を調製する。

4. 14. 被験物質の添加 (8 項参照 ; 試験記録⑦使用)

菌を播種した 6 穴マルチウェルプレート (1 被験物質あたり 4 枚) に被験物質添加用ウェル、溶媒対照ウェルおよび陽性対照ウェルを割り付ける。

滅菌したアルミ箔の上にピンセットを用いて濾紙円板を平らな面を下にして必要数並べ、被験物質溶液、被験物質溶媒およびキサントトキシシン各 20 μ L を濾紙円板に滴下する。その後、速やかに、6 穴マルチウェルプレートの各ウェルの中央に濾紙円板を平らな面を下にして 1 枚ずつ培地に密着させる (密着の強さは反転したとき濾紙が落ちない程度とする)。

4. 15. 光照射 (8 項参照 ; 試験記録④, ⑤, ⑥, ⑦使用)

前項で調製した 4 枚の濾紙密着プレートのうちの 2 枚に UVA 8.5 J/cm² 照射する (照射プレート)。他の 2 つのプレートはアルミホイルで遮光して照射プレートの照射が終了するまで室温で放置する (非照射プレート)。照射時間は以下に示す方法により算出する。

なお、光照射に先立ち、光源のスイッチを入れ、約 10 分放置後、紫外線強度計を用いて 6 穴マルチウェルプレートの蓋を通過した UVA 強度を測定しておく。このとき、プレートを置く位置、測定部位によっても強度が異なるため、6 カ所の測定値の平均を求める。測定した UVA の強度の平均値 (A) から照射時間を以下の式に従って求める。1 回の照射で、複数のプレートを照射してもかまわない。

紫外線強度: A (mW/cm²)

照射時間 (S) = [(8.5 × 1,000 mJ/cm²) / (A mW/cm²)] (提案施設での通常値 : 約 5,000 秒)

なお、プレートを置く位置は紫外線照射強度がなるべく様な部位を選択する。また、明らかに照射むらがある場合には照射場所のローテーションも考慮する必要がある。

4. 16. 培養（8 項参照；試験記録⑫使用）

照射終了後，照射および非照射プレートを反転させ，孵卵器中で約 25℃，72 時間培養する。なお，プレートの各ウェルの中央に置いた濾紙円板は，取り除いたり，位置をずらしたりはせずに試験期間終了まで静置しておく。

4. 17. 阻止帯の測定（8 項参照；試験記録⑬使用）

阻止帯の直径の測定は，ノギスを用いて行う。円形状の阻止帯の直径を濾紙円板を含めて水平方向と垂直方向で測定し，記録する。その平均値から阻止帯の大きさを求める。次に以下の式から阻止帯の差を算出する。

$$\text{阻止帯の差 (Z ; mm)} = \text{照射プレートの阻止帯} - \text{非照射プレートの阻止帯}$$

上記の値が照射・非照射プレートの 2 組について得られる。光毒性の有無についての評価はそれらの値を平均して行う。

また，必要に応じて阻止帯の見やすさも参考として記載する。

阻止帯が見にくい場合には，眼を細めてプレートを覗き込むとよい。また，阻止帯の測定が困難な場合など，必要に応じてデジタルカメラを活用し撮影しておくことが望ましい。

5. 評価

以下の基準に従い光阻止帯の差の平均から光毒性の有無を評価する。

阻止帯の差 (Z : mm)	光毒性の評価
$Z < 2$	－
$2 \leq Z < 5$	±
$5 \leq Z$	＋

なお，この評価はバリデーション委員会が一括して行うため，各施設で行う必要はない。

6. 被験物質の保管場所（8 項参照；試験記録①使用）

被験物質は、試薬保管庫、試薬保管用冷蔵庫、試薬保管用冷凍庫、試薬保管用デシケーター、試薬保管用冷蔵庫内デシケーターのいずれかに保管する。

7. 保守・点検

照射装置を使用する際、フィルター部分に汚れがないことを確認する。

8. 記録の保管

以下の試験記録の原本は、記録保管場所に5年間保管する。

- ①試薬・被験物質管理記録
- ②注射用水・生理食塩液管理記録
- ③被験物質溶解性検討記録
- ④太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑤紫外線強度計使用記録
- ⑥使用機器記録
- ⑦酵母光生育阻害試験条件等記録
- ⑧酵母光生育阻害試験プレート培地・上層培地調製記録
- ⑨酵母光生育阻害試験酵母菌液調製記録
- ⑩酵母光生育阻害試験酵母播種記録
- ⑪酵母光生育阻害試験陽性対照溶液調製記録
- ⑫酵母光生育阻害試験孵卵器使用記録
- ⑬酵母光生育阻害試験測定記録

9. 参考文献

- 1) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals: (II) Yeast Growth Inhibition Assay and Battery System with Photohemolysis Assay. AATEX, 2, 193-202.
- 2) Sugiyama M. *et al.* (1994) Photohemolysis Test and Yeast Growth Inhibition Assay to Assess Phototoxic Potential of Chemicals. Alternative Methods In Toxicology Vol. 10 In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Rougier A. *et al.* (ed.) Marry Ann Libert, Inc., New York, 213-221.
- 3) 杉山真理子ら, 日本動物実験代替法学会 第6回大会要旨集(東京)(1995) p110-111.

- 4) Sugiyama M. *et al.* (2002) A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. AATEX, 9, 29-39.
- 5) Mori M. *et al.* (2003) Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay. AATEX, Submitted.

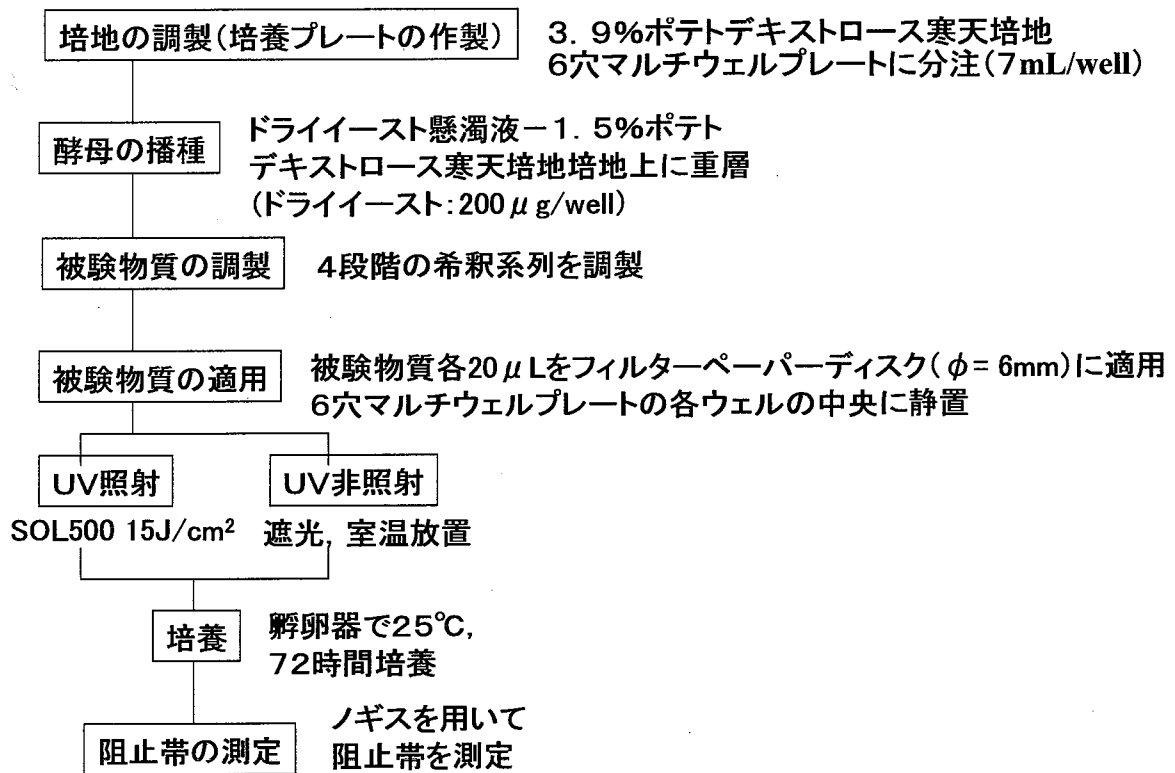
10. 試験法の改定

試験法改定の必要が生じた場合は、バリデーション委員会で検討し、その結果を提案者に示し、承認を受ける。

11. 履歴

- 1) 平成 15 年 11 月 21 日 制定
- 2) 平成 15 年 11 月 23 日 修正

3) 酵母光生育阻害試験フローチャート



以上

酵母光生育阻害試験プロトコール

原案作成者及びその日：森 眞輝 平成 15 年 11 月 21 日
承認者と承認日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 25 日
修正案作成者及びその日：石川牧恵 平成 18 年 6 月 1 日
修正案作成者及びその日：石川牧恵 平成 18 年 12 月 5 日
承認者と承認日：吉村功 平成 18 年 12 月 6 日

1. 目的

本試験法は、酵母を用いて被験物質の光生育阻害性を評価することを目的とする。本試験法は、光毒性試験の代替法として使用可能である。

2. 原理

光毒性の発現メカニズムは、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカルの生体への作用や、さらには光励起された化学物質自身の生体への作用と考えられている。この作用の生体側標的組織として細胞膜や核を含めた細胞内小器官が考えられる。本法は、光毒性試験代替法としては、細胞膜破壊および細胞内小器官に対する傷害に基づく光毒性を検出する方法である。

3. 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤および香料などのうち、紫外線吸収(280~400nm)が認められるものに適用する。

4. 材料および実験方法

4.1. 試験項目およびプレート枚数

至適濃度を決定するために行う予備試験を1回、至適濃度付近において行う本試験を2回実施する。いずれの試験とも duplicate で行う。1回の実験で6穴マルチウェルプレート4枚(照射プレート2枚、非照射プレート2枚)を用いるため、1被験物質あたり少なくとも6穴マルチウェルプレート12枚を必要とする。

4.2. 対照物質

4.2.1. 陰性対照物質

被験物質溶液の調製に用いた溶媒を陰性対照物質とする。

4.2.2. 陽性対照物質

キサントトキシン (8-methoxypsoralen, ナカライテスク (株)) を用いる。

4.3. 器具類

4.3.1. 6穴マルチウェルプレート

CORNING 社製 No. 25810, COSTAR 社製 No. 3516, FALCON 社製 No. 3846 のいずれかを用いる。同一試験内では製造メーカーおよびロットは同じものを用いる。

4.3.2. ガラス器具

三角フラスコ, メスフラスコ, メスシリンダー, びん, スピッツ型ねじ口ガラス遠心管等。びんについては試験前に高圧蒸気滅菌しておく。

4.3.3. 滅菌済み使い捨て器具

ピペット, 遠沈管等

4.3.4. 濾紙円板

ペーパーディスク (抗生物質検定用), 厚手, 直径 6 mm (東洋濾紙 (株)) を用いる。同一試験内では同じロットのものを用いる。試験前にガラスのシャーレもしくはびんに入れて高圧蒸気滅菌しておく。

4.3.5. アルミ箔

試験前に必要量を高圧蒸気滅菌しておく。

4.3.6. ノギス

デジタルタイプとアナログタイプのもがあるが, mm 単位で小数点以下第一位まで測定できるものであればどちらを使用してもよい。

4.3.7. ピンセット

試験前にアルミ箔に包んで高圧蒸気滅菌しておく。

4.3.8. ビニル袋

調製した 3.9%ポテトデキストロース寒天培地含有 6穴マルチウェルプレートを数枚もしくは数十枚ずつ重ねて保管する際に使用するので, ビニル袋のサイズは特に限定しない。

4.4. 操作区域

全ての操作は落下細菌の少ないクリーンな部屋で, 他の実験による汚染の無い場所で行う。必要に応じてクリーンベンチを用いてもかまわない。

4.5. 滅菌

ガラスびん、濾紙円板、ピンセット、アルミ箔、4.9.の項で調製した3.9%ポテトデキストロース寒天培地および4.10.の項で調製した1.5%ポテトデキストロース寒天培地を高圧蒸気滅菌(121℃, 20 min)する。

4.6. 機器

4.6.1. 太陽光シミュレーション装置

通常は、光源として紫外線A(UVA)領域、紫外線B(UVB)領域および可視光領域に照射スペクトルを持つMetal halide lamp(Dr. Hönle GmbH社製, Bulb, 型番0175), パワーサプライ(Dr. Hönle GmbH社製, 型番0298)を装備したSOL500(Dr. Hönle GmbH社製, 型番5468)を用いる。フィルターはH1フィルター(Dr. Hönle GmbH社製, 型番4730)を使用する。新しいMetal halide lampは、エネルギー強度が強く、安定していないため約100時間ランプを点灯させてエネルギーを減衰させるとともに安定させる必要がある。

太陽光シミュレーション装置の上部ラベルが読めるような向きで設置する。

4.6.2. 紫外線強度計

UVAの強度測定として、Dr. Hönle GmbH社製の紫外線強度計(UVA-Meter, 型番37)を用いる。但し(株)トプコン製の紫外線強度計を用いる場合は、4.16.1項に従い紫外線強度を補正し、光源と紫外線強度計の距離を調節する。

25℃に設定できるものを用意する。

4.7. 使用酵母

ドライイースト(オリエンタル酵母工業(株))を用いる。

4.8. 酵母菌液の調製(8項参照; 試験記録①, ②, ⑥, ⑦, ⑨使用)

ドライイーストに滅菌生理食塩液を加えて2 mg/mLの懸濁液を調製する。

4.9. 3.9%ポテトデキストロース寒天培地含有6穴マルチウエルプレートの準備(8項参照; 試験記録②, ③, ④, ⑥使用)

ポテトデキストロース寒天培地(極東製薬工業(株))39 gに精製水1 Lを加えて溶解する(この割合で必要量を調製する)。高圧蒸気滅菌後、室温にて約60℃位になるまで放置し、固化しないうちに6穴マルチウエルプレートの各ウエルに7 mLずつ分注する。固化したら、転倒してビニル袋に入れて室温保存する。ポテトデキストロース寒天培地の高圧蒸気滅菌は1回限りとする。調製・滅菌した寒天培地を再度滅菌して使用してはならない。

4.10. 1.5%ポテトデキストロース寒天培地の調製(8項参照; 試験記録①, ②, ⑥, ⑧使用)

ポテトデキストロース寒天培地 1.5 g を精製水 100 mL に懸濁させて高圧蒸気滅菌する（この割合で必要量を調製する）。ポテトデキストロース寒天培地の高圧蒸気滅菌は1回限りとする。調製・滅菌した寒天培地を再度滅菌して使用してはならない。

4. 11. トップアガールの調製および酵母の播種（8項参照；試験記録⑩使用）

約 45℃ で保温中の 1.5%ポテトデキストロース寒天培地 95 mL に、調製した酵母菌液を 5 mL 加え良く混和する（この割合で必要量を調製する）。ドライイーストを含む寒天培地が固化しないうちに、あらかじめ 3.9%ポテトデキストロース寒天培地が添加されている 6 穴マルチウェルプレートに 2 mL/well ずつ重層する。上層のドライイーストを含む寒天培地が固化するまで静置する。

4. 12. 溶媒の選択と予備試験における最高溶解濃度の決定法（8項参照；試験記録①，②，③，⑥，⑦使用）

4. 12. 1. 原体が固体の場合

溶媒は、水、エタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド（以下、DMSO）のいずれかとする。溶媒の選択は、以下の手順に従って決定する。

- 1) 各溶媒毎に1本のスピッツ型ねじロガラス遠心管を用意する（計4本）。
- 2) スピッツ型ねじロガラス遠心管に被験物質を 50 mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を 50 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 1 g/mL を最高濃度とする。なお、攪拌は、遠心管に栓をした後、遠心管の上部を持ち先端を指で数回たたいて行うか超音波破碎機や試験管ミキサーを用いて行う。
- 4) 3) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 50 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 500 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 5) 4) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 100 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 250 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 6) 5) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 300 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 100 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 7) 6) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 500 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 50 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 8) 7) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 1,000 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 25 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 9) 8) で完全な溶解が認められないときは、更に溶媒を 3,000 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 10 mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 10) 4種溶媒の中で最も高濃度の被験物質を溶解する溶媒を選択する。
- 11) 溶解の程度が同じである場合は、水、エタノール、アセトン、DMSO の順で試験に用いる溶媒を決定する。

4. 12. 2. 原体が液体の場合

予備試験における最高濃度は原体とする。希釈系列を調製するための溶媒は、水、エタノール、アセトン、DMSO のいずれかとする。溶媒の選択は、以下の手順にしたがって決定する。

- 1) 各溶媒毎に1本の容量が 10mL であるスピッツ型ねじロガラス遠心管を用意する（計4

本)。

- 2) スピッツ型ねじロガラス遠心管に被験物質を 50mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を 100 μ L 添加し攪拌する (500 mg/mL)。なお、攪拌は、遠心管に栓をした後、遠心管の上部を持ち先端を指で数回たたいて行うか、超音波破碎機や試験管ミキサーを用いて行う。
- 4) 3) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 100 μ L 添加し攪拌する (250 mg/mL)。
- 5) 4) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 300 μ L 添加し攪拌する (100 mg/mL)。
- 6) 5) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 500 μ L 添加し攪拌する (50 mg/mL)。
- 7) 6) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 1000 μ L 添加し攪拌する (25 mg/mL)。
- 8) 7) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 3000 μ L 添加し攪拌する (10 mg/mL)。
- 9) 4 種溶媒の中で最も高濃度の被験物質を溶解する溶媒を選択する。
- 10) 溶解の程度が同じである場合は、水、エタノール、アセトン、DMSO の順で試験に用いる溶媒を決定する。

4. 13. 被験物質溶液の調製 (8 項参照；試験記録①, ②, ③, ⑥, ⑦, ⑪使用)

4. 13. 1. 予備試験

被験物質溶液を 4 水準作製する。希釈においては以下の表に従う。なお、陽性対照物質としてキサントトキシシン 1 mg/mL エタノール溶液を調製する。

希釈列	原体が固体の場合	原体が液体の場合
第 1 水準	最高溶解濃度	原体
第 2 水準	最高溶解濃度の 10 分の 1	最高溶解濃度
第 3 水準	最高溶解濃度の 100 分の 1	最高溶解濃度の 10 分の 1
第 4 水準	最高溶解濃度の 1000 分の 1	最高溶解濃度の 100 分の 1

4. 13. 2. 本試験

1) 原体が固体の場合

最高溶解濃度を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する。なお、予備試験において阻止帯の差が最高溶解濃度より低濃度において最大となった場合には、予備試験において阻止帯の差が最大であった濃度の 16 倍の濃度を本試験の最高濃度とし、最高濃度を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する (但し、最高濃度が最高溶解濃度を超える場合は最高溶解濃度を最高濃度とする)。

陽性対照物質としてキサントトキシシン 1 mg/mL エタノール溶液を調製する。

2) 原体が液体の場合

原体を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する。なお、予備試験において阻止帯の差が原体より低濃度において最大となった場合には、予備試験において阻止帯の差が最大であった濃度の 16 倍の濃度を本試験の最高濃度とし、最高濃度を含む 4 倍希釈系列を 4 水準作製する (但し、最高濃度が最高溶解濃度を超える場合は最高溶解濃度を最高濃度とする)。
陽性対照物質としてキサントトキシシン 1 mg/mL エタノール溶液を調製する。

4. 14. 被験物質の添加 (8 項参照；試験記録⑦使用)

菌を播種した 6 穴マルチウェルプレート（1 被験物質あたり 4 枚）に被験物質添加用ウェル、溶媒対照ウェルおよび陽性対照ウェルを割り付ける。

滅菌したアルミ箔の上にピンセットを用いて濾紙円板を平らな面を下にして必要数並べ、被験物質溶液、被験物質溶媒およびキサントトキシン各 20 μ L を濾紙円板に滴下する。その後、速やかに、6 穴マルチウェルプレートの各ウェルの中央に濾紙円板を平らな面を下にして 1 枚ずつ培地に密着させる（密着の強さは反転したとき濾紙が落ちない程度とする）。

4. 15. 前培養及び被験物質総暴露時間（8 項参照；試験記録⑦, ⑫使用）

被験物質適用後、25℃に設定した孵卵器内で前培養を行う。

更に前培養時間と 4. 16. 2. 項で求めた照射時間を合わせた時間を被験物質総暴露時間とし、これを 5 時間とする。

よって前培養時間は総暴露時間から照射時間を差し引いた値、すなわち、「前培養時間」＝「総暴露時間（=5 時間）」－「照射時間」とする。

4. 16. 紫外線強度の算出と光照射（8 項参照；試験記録④, ⑤, ⑥, ⑦使用）

4. 16. 1. 補正式による(株)トプコン製紫外線強度計での紫外線強度の算出

UVA 25. 0 J/cm²照射は、Dr. Hönle GmbH社製の紫外線強度計での照射量とする。但し、今回のバリデーション研究において、(株)トプコン製の紫外線強度を用いる場合は、以下の補正式より、Dr. Hönle GmbH社製の紫外線強度を算出する。

Dr. Hönle GmbH社製の紫外線強度での値をY、(株)トプコン製の紫外線強度計で測定した値をXとしたとき

$$\text{酵母光生育阻害試験では、} Y=0.5645X$$

Yの値が 1. 7 以上 2. 5 以下となるように光源と紫外線強度計の距離を調節する。

更に紫外線強度については、各施設において陽性対照であるキサントトキシン 1 mg/mL を用いて UVA25. 0 J/cm² 照射下で予備試験を行い、下記の条件を満たしたものを採用する。

- 1) 1. 7 以上 2. 5 mW/cm² 以下の範囲であること
- 2) 陽性対照であるキサントトキシン 1 mg/mL の阻止帯の差が 10 mm 以上を示すこと
- 3) 酵母に毒性が出ていないこと

4. 16. 2. 光照射

4. 14. 項で調製した 4 枚の濾紙密着プレートのうちの 2 枚に UVA 25. 0 J/cm² 照射する（照射プレート）。他の 2 つのプレートはアルミホイルで遮光して照射プレートの照射が終了するまで室温で放置する（非照射プレート）。照射時間は以下に示す方法により算出する。

光照射に先立ち、光源のスイッチを入れ、約 10 分放置後、紫外線強度計を用いて 6 穴マルチウェルプレートの蓋を通過した UVA 強度を測定する。

このとき、プレートを置く位置、測定部位によっても強度が異なるため、6 カ所の紫外線強度計での値の平均値 (A) を求める。測定した平均値 (A) から照射時間を以下の式に従って求める。1 回の照射で、複数のプレートを照射してもかまわない。

紫外線強度: A (mW/cm²)

照射時間(S) = [(25.0×1,000 mJ/cm²) / (A mW/cm²)]

(提案施設での通常値: 約 10,000 ~ 14,700 秒)

プレートを置く位置は紫外線照射強度がなるべく一様な部位を選択する。また、明らかに照射むらがある場合には照射場所のローテーションも考慮する必要がある。

4.17. 培養 (8 項参照; 試験記録⑫使用)

照射終了後、照射および非照射プレートを反転させ、孵卵器中で約 25℃, 72 時間培養する。なお、プレートの各ウェルの中央に置いた濾紙円板は、取り除いたり、位置をずらしたりはせずに試験期間終了まで静置しておく。

4.18. 阻止帯の測定 (8 項参照; 試験記録⑬使用)

阻止帯の直径の測定は、ノギスを用いて行う。円形状の阻止帯の外径を水平方向と垂直方向で測定し、記録する。その平均値を阻止帯の大きさとして以下の式から阻止帯の差を算出する。

阻止帯の差 (Z ; mm) = 照射プレートの阻止帯の大きさ - 非照射プレートの阻止帯の大きさ

上記の値が、2 組の照射・非照射プレート対ごとに得られるので、その平均値で光毒性の有無を評価する。

阻止帯の測定では以下のことに留意する。

- ① 黒い机など背景の濃く、阻止帯が見やすいところで測定する。
- ② 阻止帯の外径を測るときは、表面に着目することとして、プレート裏面まで突き抜けるような十分に深いものでなくてもよいし、輪郭が不明瞭なものでもよいとする。輪郭が不明瞭な場合は最も外側を測定することとする。
- ③ 必要と考えた場合は、阻止帯の見やすさ・輪郭の不明瞭さなどを記録に残したり、デジタルカメラ等を活用して映像として残したりしておく。
- ④ 阻止帯が見にくい場合は、眼を細めてプレートを覗き込む。

5. 評価

以下の基準に従い光阻止帯の差の平均から光毒性の有無を評価する。

阻止帯の差 (Z : mm)	光毒性の評価
$Z < 2$	-
$2 \leq Z < 5$	±
$5 \leq Z$	+

なお、この評価はバリデーション委員会が一括して行うため、各施設で行う必要はない。

6. 被験物質の保管場所 (8 項参照; 試験記録①使用)

被験物質は、試薬保管庫、試薬保管用冷蔵庫、試薬保管用冷凍庫、試薬保管用デシケーター、試薬保管用冷蔵庫内デシケーターのいずれかに保管する。

7. 保守・点検

照射装置を使用する際、フィルター部分に汚れがないことを確認する。

8. 記録の保管

以下の試験記録の原本は、記録保管場所に5年間保管する。

- ①試薬・被験物質管理記録
- ②注射用水・生理食塩液管理記録
- ③被験物質溶解性検討記録
- ④太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑤紫外線強度計使用記録
- ⑥使用機器記録
- ⑦酵母光生育阻害試験条件等記録
- ⑧酵母光生育阻害試験プレート培地・上層培地調製記録
- ⑨酵母光生育阻害試験酵母菌液調製記録
- ⑩酵母光生育阻害試験酵母播種記録
- ⑪酵母光生育阻害試験陽性対照溶液調製記録
- ⑫酵母光生育阻害試験孵卵器使用記録
- ⑬酵母光生育阻害試験測定記録

9. 参考文献

- 1) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals: (II) Yeast Growth Inhibition Assay and Battery System with Photohemolysis Assay. AATEX, 2, 193-202.
- 2) Sugiyama M. *et al.* (1994) Photohemolysis Test and Yeast Growth Inhibition Assay to Assess Phototoxic Potential of Chemicals. Alternative Methods In Toxicology Vol. 10 In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Rougier A. *et al.* (ed.) Marry Ann Libert, Inc., New York, 213-221.
- 3) 杉山真理子ら, 日本動物実験代替法学会 第6回大会要旨集(東京)(1995) p110-111.
- 4) Sugiyama M. *et al.* (2002) A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. AATEX, 9, 29-39.
- 5) Mori M. *et al.* (2004) Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay. AATEX, 10, 1-17

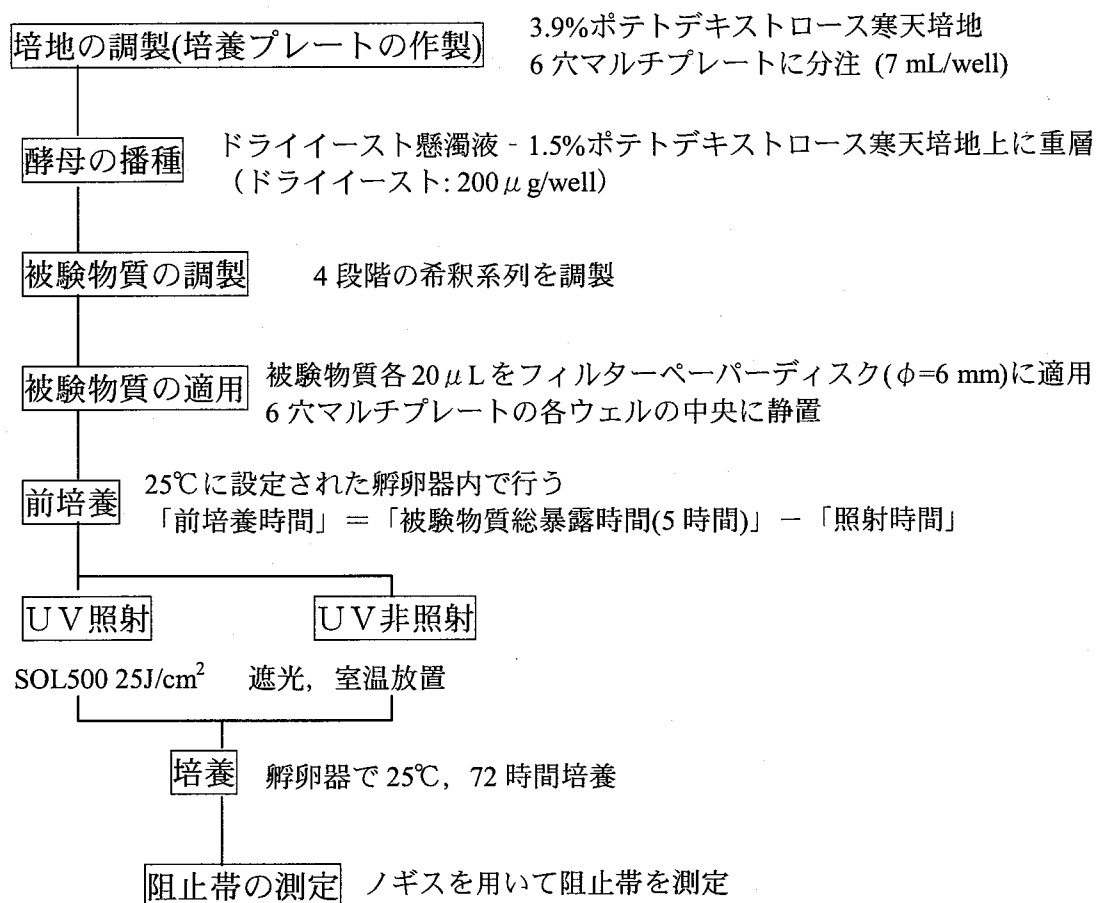
10. 試験法の改定

試験法改定の必要が生じた場合は、バリデーション委員会で検討し、その結果を提案者に示し、承認を受ける。

11. 履歴

- 1) 平成 15 年 11 月 21 日 制定
- 2) 平成 15 年 11 月 23 日 修正
- 3) 平成 18 年 6 月 1 日 修正 修正理由：光毒性評価委員会からの依頼に基づく修正
- 4) 平成 18 年 12 月 5 日 修正 修正内容：4. 18 の測定法. 修正理由：測定者の改訂希望を検討した結果としての修正

5) 酵母光生育阻害試験フローチャート



赤血球光溶血試験プロトコール

原案作成者及びその日：穂谷 昌利 平成 15 年 11 月 21 日

承認者と承認日：大野泰雄 平成 15 年 11 月 25 日

1. 目的

本試験法は、赤血球を用いて被験物質の光溶血性を評価することを目的とする。本試験法は、光毒性試験の代替法として使用可能である。

2. 原理

光毒性の発現メカニズムは、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカルの生体への作用や、さらには光励起された化学物質自身の生体への作用と考えられている。この作用の生体側標的組織として細胞膜や核を含めた細胞内小器官が考えられる。

本法は、光毒性試験代替法としては、細胞膜破壊に基づく光毒性を検出する方法である。

3. 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤、香料などのうち、紫外部吸収（280～400nm）が認められるものに適用する。

4. 材料及び実験方法

4. 1. 試験項目及びプレート枚数

至適濃度を決定するために行う予備試験を 1 回、至適濃度付近において行う本試験を 2 回実施する。いずれの試験とも duplicate で行う。1 回の実験で最大 3 被験物質を適用できるが、24 穴マルチウェルプレート 4 枚（照射プレート 2 枚、非照射プレート 2 枚）用いるため、3 被験物質あたり少なくとも 24 穴マルチウェルプレート 12 枚を必要とする。また、照射・非照射プレート 1 対につき 1 枚の 96 穴マイクロテストプレートを用いるため、

3 被験物質あたり少なくとも 96 穴マイクロテストプレート 6 枚を必要とする。

4. 2. 陰性対照物質

被験物質溶液の調製に用いた溶媒を陰性対照物質とする。

4. 3. 陽性対照物質

アクリジン（東京化成工業株式会社）を用いる。

4. 4. 赤血球

緬羊無菌保存血を(株)日本生物材料センターより購入する。

株式会社 日本生物材料センター（TEL:03-3811-1960）

採血日から 1 週間程度を使用期限とする。また、1 度開封した血液は使用しないほうが良い。

4. 5. 器具類

4. 5. 1. 24 穴マルチウェルプレート

FALCON 社製 No. 3047 を用いる。同一試験内ではロットは同じものを用いる。

4. 5. 2. 96 穴マイクロテストプレート

FALCON 社製 No. 3070 を用いる。

4. 5. 3. 漏斗

4. 5. 4. 脱脂綿

4. 5. 5. 分注器

4. 5. 6. ガラス器具

溶液調製用にピペット、ビーカー、メスシリンダー、スピッツ型ねじ口ガラス遠心管等。
溶血を避けるため、赤血球の取り扱いには使用しない。

4. 5. 7. プラスティック製器具

赤血球懸濁液調製用にピペット、遠沈管、メスシリンダー等。

4. 6. 機器

4. 6. 1. 太陽光シミュレーション装置

通常は、光源として紫外線 A (UVA) 領域、紫外線 B (UVB) 領域及び可視光領域に照射スペクトルを持つ Metal halide lamp (Dr. Hönle GmbH 社製, Bulb, 型番 0175), パワーサプライ (Dr. Hönle GmbH 社製, 型番 0298) を装備した SOL500 (Dr. Hönle GmbH 社製, 型番 5468) を用いる。フィルターは H 1 フィルター (Dr. Hönle GmbH 社製, 型番 4730) を使用する。新しい Metal halide lamp は、エネルギー強度が強いため約 100 時間ランプを点灯させてエネルギーを減衰させる必要がある。

太陽光シミュレーション装置の上部ラベルが読めるような向きで設置する。

4. 6. 2. 紫外線強度計

UVA の強度測定として、Dr. Hönle GmbH 社製の紫外線強度計 (UVA-Meter, 型番 37) を用いる。

4. 6. 3. 小型遠心機

50mL 以上の遠沈管を適用できることが必要である。また、個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行う場合には 1.5mL マイクロチューブを適用できる機器が必要である。赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用できることが望ましい。

4. 6. 4. 高速遠心機

マイクロタイターバケットを適用可能である日立高速遠心機 CR20B2 等を用いる。赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用できることが望ましい。

しかし、個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行う場合には使用しない。

4. 6. 5. マイクロプレートリーダー

540nm 及び 525nm の吸光度を測定できるマイクロプレートリーダーを使用する (525nm 用のフィルターが無い場合はそれに近いものを使用する)。

4. 6. 6. プレートミキサー

MICRO TUBE MIXER EM-36 (タイテック株式会社) を使用する。ただし、適切に混和可能であればその他のプレートミキサーでも使用可能である。

4. 7. 塩溶液の調製

- ・生理食塩水: 0.9% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液。
- ・PBS (-): ダルベッコ PBS (-) (日水製薬株式会社) 9.6g を蒸留水 1L に溶解させる。滅菌操作は必要としない。

4. 8. 溶媒の選択と予備試験における最高溶解濃度の決定 (8 項参照; 試験記録①, ②, ③, ⑥使用)

4. 8. 1. 原体が固体の場合

溶媒は、水、エタノール、アセトン、ジメチルスルホキシド (以下、DMSO) のいずれかとする。最高溶解濃度及び溶媒の選択は、以下の手順にしたがって決定する。

- 1) 各溶媒毎に 1 本の容量が 10mL であるスピッツ型ねじ口ガラス遠心管を用意する (計 4 本)。
- 2) スピッツ型ねじ口ガラス遠心管に被験物質を 50mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を 50 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 1g/mL を最高溶解濃度とする。なお、攪拌は、遠心管に栓をした後、遠心管の上部を持ち先端を指で数回たたいて行うか、超音波破碎機や試験管ミキサーを用いて行う。
- 4) 3) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 50 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 500mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 5) 4) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 100 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 250mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 6) 5) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 300 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 100mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 7) 6) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 500 μ L 添加し攪拌する。完全な

溶解が認められたならば 50mg/mL を最高溶解濃度とする。

- 8) 7) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 1000 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 25mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 9) 8) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 3000 μ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 10mg/mL を最高溶解濃度とする。
- 10) 4 種溶媒の中で最も高濃度の被験物質を溶解する溶媒を選択する。
- 11) 溶解の程度が同じである場合は、水、エタノール、アセトン、DMSO の順で試験に用いる溶媒を決定する。

被験物質を溶解した媒体 10 μ L を赤血球 990 μ L に添加するため、最終濃度は投与した濃度の 1/100 となる。

4. 8. 2. 原体が液体の場合

予備試験における最高濃度は原体とする。希釈系列を調製するための溶媒は、水、エタノール、アセトン、DMSO のいずれかとする。溶媒の選択は、以下の手順にしたがって決定する。

- 1) 各溶媒毎に 1 本の容量が 10mL であるスピッツ型ねじ口ガラス遠心管を用意する(計 4 本)。
- 2) スピッツ型ねじ口ガラス遠心管に被験物質を 50mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を 100 μ L 添加し攪拌する。なお、攪拌は、遠心管に栓をした後、遠心管の上部を持ち先端を指で数回たたいて行うか、超音波破碎機や試験管ミキサーを用いて行う。
- 4) 3) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 100 μ L 添加し攪拌する(250mg/mL)。
- 5) 4) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 300 μ L 添加し攪拌する(100mg/mL)。
- 6) 5) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 500 μ L 添加し攪拌する(50mg/mL)。
- 7) 6) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 1000 μ L 添加し攪拌する(25mg/mL)。
- 8) 7) で完全な溶解が認められないときは、さらに溶媒を 3000 μ L 添加し攪拌する(10mg/mL)。
- 9) 4 種溶媒の中で最も高濃度の被験物質を溶解する溶媒を選択する。
- 10) 溶解の程度が同じである場合は、水、エタノール、アセトン、DMSO の順で試験に用いる溶媒を決定する。

被験物質を溶解した媒体 10 μ L を赤血球 990 μ L に添加するため、最終濃度は投与した濃度の 1/100 となる。

4. 9. 被験物質溶液の調製 (8 項参照 ; 試験記録①, ②, ③, ⑥, ⑭使用)

4. 9. 1. 予備試験

被験物質溶液を4水準作製する。希釈においては以下の表に従う。

希釈列	原体が固体の場合	原体が液体の場合
第1水準	最高溶解濃度	原体
第2水準	最高溶解濃度の10分の1	最高溶解濃度
第3水準	最高溶解濃度の100分の1	最高溶解濃度の10分の1
第4水準	最高溶解濃度の1000分の1	最高溶解濃度の100分の1

陽性対照としてアクリジン 10% (w/v) アセトン溶液を最高濃度とし、5倍水準希釈系列を4水準調製する。

4. 9. 2. 本試験

1) 原体が固体の場合

最高溶解濃度を含む4倍希釈系列を4水準作製する。なお、予備試験において溶血度の差が最高溶解濃度より低濃度において最大となった場合には、予試験において、溶血度が最大であった濃度の16倍の濃度を本試験の最高濃度とし、その最高濃度を含む4倍希釈系列を4水準作製する（但し、最高濃度が最高溶解濃度を超える場合は最高溶解濃度を最高濃度とする）。

陽性対照としてアクリジン 10% (w/v) アセトン溶液を最高濃度とし、5倍水準希釈系列を4水準調製する。

2) 原体が液体の場合

原体を含む4倍希釈系列を4水準作製する。なお、予備試験において溶血度の差が原体より低濃度において最大となった場合には、予試験において、溶血度が最大であった濃度の16倍の濃度を本試験の最高濃度とし、その最高濃度を含む4倍希釈系列を4水準作製する（但し、最高濃度が原体を超える場合は原体を最高濃度とする）。

陽性対照としてアクリジン 10% (w/v) アセトン溶液を最高濃度とし、5倍水準希釈系列を4水準調製する。

4. 10. 赤血球懸濁液の調製（8項参照；試験記録①，②，⑥，⑭，⑯使用）

綿羊無菌保存血を脱脂綿で濾過し、3倍量の生理食塩水で洗い流した後、遠心分離を行う(3000rpm, 10min)。血漿をアスピレーターを用いて除去し、もとの綿羊無菌保存血の4倍量のPBS(-)を加えてピペティングを行い、遠心分離を行う(3000rpm, 5min)。このPBS(-)による洗浄操作をさらに2回行い、溶血が生じていない(上清の緩衝液がほぼ無色透明)ことを確認後、上清の緩衝液をアスピレーターを用いて除去する。残りの沈殿した赤血球を原液として、PBS(-)にて40倍に希釈して2.5%(v/v)の赤血球懸濁液を調製する。これらの遠心操作は赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用することが望ましい。

4. 1.1. 完全溶血(100% control)の調製

2.5%(v/v)赤血球懸濁液1mLを1.5mLチューブに分注し、液体窒素中にて1分間凍結させた後、水浴させて溶解させる。4枚のプレートを使用する場合、1mLの完全溶血を9本程度作製しておく。

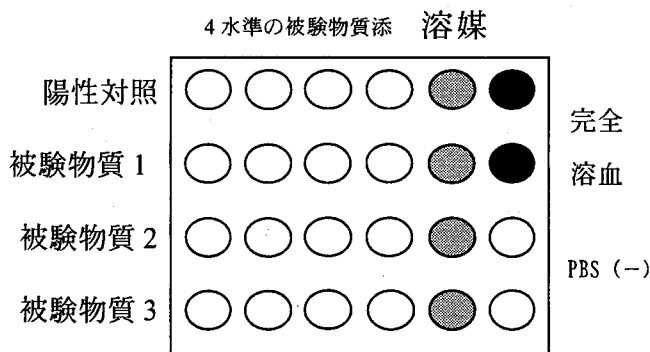
4. 1.2. 被験物質の添加

24穴マルチウェルプレートに被験物質添加用ウェルと完全溶血添加用ウェルを割り付ける。被験物質添加用ウェルに、2.5%赤血球懸濁液990 μ Lを分注器を用いて分注し、被験物質溶液、溶媒またはPBS(-)10 μ Lを各ウェルに加える。

完全溶血用ウェルには完全溶血を各990 μ Lずつ分注した後、PBS(-)10 μ Lを加える。

実験は通常 duplicate で行い、さらに照射用、非照射用プレートを設定するため、陽性対照と3被験物質で4枚のプレートを必要とする。

被験物質溶液を添加後、プレートミキサーを用いて良く混和し(30sec)、次項に従い、照射用プレートの光照射を行う。非照射用プレートはアルミホイルで遮光して照射終了まで室温で放置する。



4. 1 3. 光照射（8項参照；試験記録④，⑤，⑥，⑭使用）

光源のスイッチを入れ，約10分放置後，紫外線強度計（UVA-Meter, Dr. Hönle GmbH 社製）を用いて24穴マルチウェルプレートの蓋を透過した紫外線（UVA）強度を測定する。このとき，プレートを置く位置，測定部位によっても強度が異なるため，6ヶ所の測定値の平均を求める。照射時間は次の式にしたがって求め，照射用のプレートのみ $6.2\text{J}/\text{cm}^2$ を照射する。一回の照射で複数のプレートを照射してもかまわない。

紫外線強度: A (mW/cm^2)

照射時間 (s) = $(6.2 \times 1,000 \text{ mJ}/\text{cm}^2) / (A \text{ mW}/\text{cm}^2)$

（提案施設での通常値：約 6,200 秒）

なお，プレートを置く位置は紫外線強度がなるべく一様な部位を選択する。

また，明らかに照射むらがある場合には照射場所のローテーションも考慮する必要がある。

4. 1 4. 溶血度の測定（8項参照；試験記録⑥使用）

照射終了後，照射用，非照射用プレートを再びプレートミキサーを用いてよく混和し（30sec），プレートのまま遠心分離（マイクロタイターバケットを用いて2000rpm, 15min）し，未溶血の赤血球を沈殿させる。このとき，赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用することが望ましい。24穴マルチウェルプレートの各ウェルから静かに上清を採取し，96穴マイクロテストプレートの2ウェルに $100\mu\text{L}$ ずつ移す（duplicate）。被験物質ごとに，照射用，非照射用の上清を割り付ける。

プレートのまま遠心分離できる機種がない場合は，個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行うことも可能であるが，あらかじめ条件設定が必要である。

4. 15. マイクロプレートリーダーによる測定（8項参照；試験記録⑥，⑭，⑮使用）

マイクロプレートリーダーを用いて、540nm 及び 525nm の波長で 96 穴マイクロテストプレートの各ウェルの吸光度を測定する。

4. 16. 光溶血度の算出

光溶血度は 540nm における吸光度 (OD) を用い、以下の式にしたがい算出する。

溶血度の差 (L;%)

$$= \text{照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血}} - \text{OD}_{\text{PBS (-) 対照}})]$$

$$- \text{非照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血}} - \text{OD}_{\text{PBS (-) 対照}})]$$

なお、525nm における吸光度はタンパク変性の指標とする。また、OD 値は 96 穴マイクロテストプレートにおける duplicate で測定した結果の平均値を用いる。

5. 評価

以下の基準に従い溶血度の差の平均から光毒性の有無を評価する。

溶血度の差 (L;%)	光毒性の評価
$L < 5$	-
$5 \leq L < 10$	±
$10 \leq L$	+

なお、この評価はバリデーション委員会が一括して行うため、各施設で行う必要はない。

6. 被験物質の保管場所（8項参照；試験記録①使用）

被験物質は、試薬保管庫、試薬保管用冷蔵庫、試薬保管用冷凍庫、試薬保管用デシケーター、試薬保管用冷蔵庫内デシケーターのいずれかに保管する。

7. 保守・点検

照射装置を使用する際、フィルター部分に汚れがないことを確認する。

8. 記録の保管

以下の試験記録の原本は、記録保管場所に5年間保管する。

- ①試薬・被験物質管理記録
- ②注射用水・生理食塩液管理記録
- ③被験物質溶解性検討記録
- ④太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑤紫外線強度計使用記録
- ⑥使用機器記録
- ⑭赤血球光溶血試験条件等記録
- ⑮赤血球光溶血試験測定記録
- ⑯血球管理記録

9. 参考文献

- 1) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals: (I) Red Blood Cell Hemolysis Assay. AATEX, 2, 183-191.
- 2) Sugiyama M. *et al.* (1994) Photohemolysis Test and Yeast Growth Inhibition Assay to Assess Phototoxic Potential of Chemicals. Alternative Methods In Toxicology Vol. 10 In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Rougier A *et al.* (ed.) Marry Ann Libert, Inc., New York, 213-221.
- 3) 杉山真理子ら, 日本動物実験代替法学会 第5回大会要旨集(秦野) p110-111 (1991).
- 4) Sugiyama M. *et al.* (2002) A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. AATEX, 9, 29-39.
- 5) Mori M. *et al.* (2003). Effects of light sources on the prediction of phototoxicity by the yeast growth inhibition phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay, submitted.

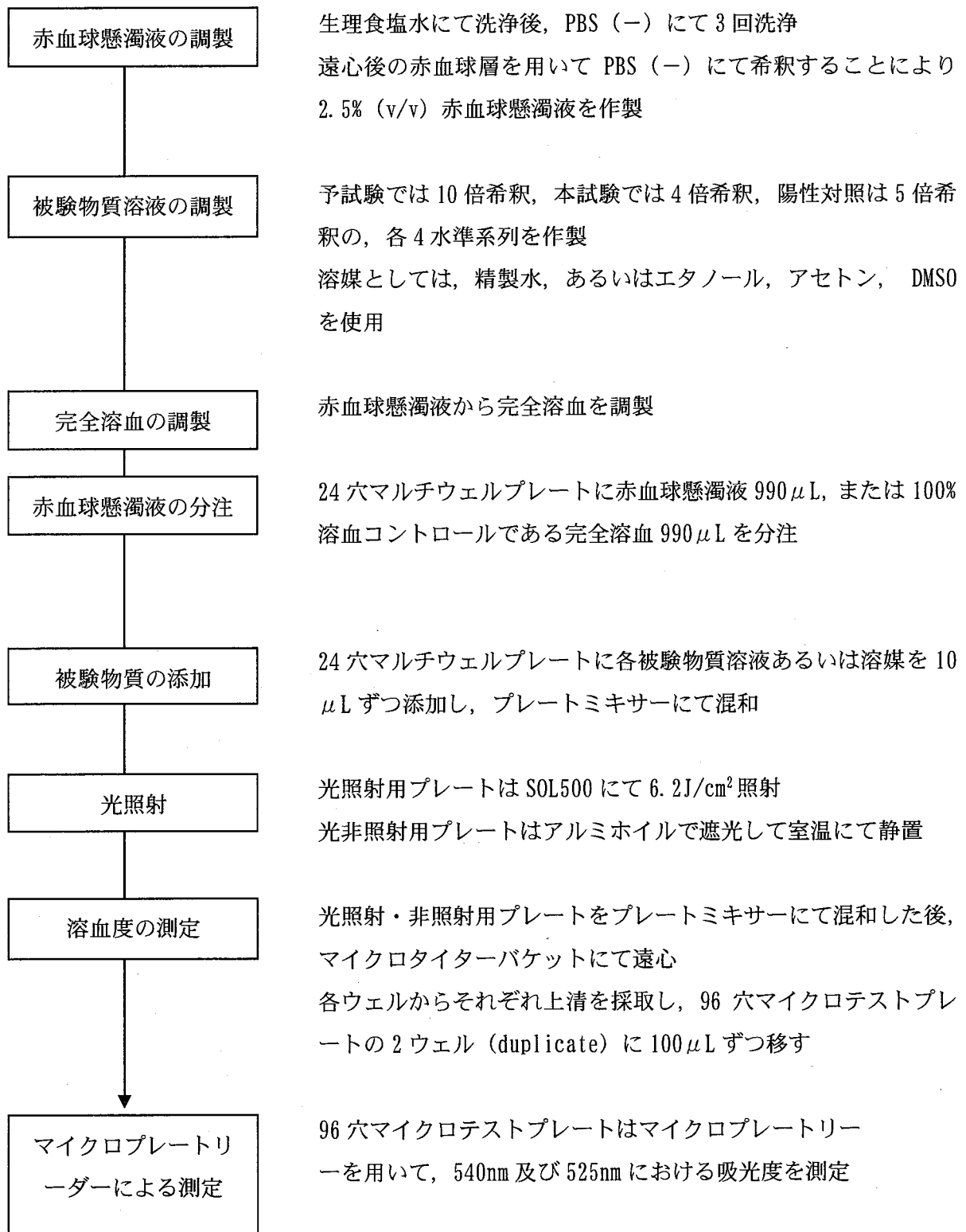
10. 試験法の改定

試験法の改定の必要が生じた場合は、バリデーション委員会で検討し、その結果を提案者に示し、承認を受ける。

11. 履歴

- 1) 平成 15 年 11 月 21 日 制定
- 2) 平成 15 年 11 月 23 日 修正

赤血球光溶血試験フローチャート



以上

酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の組合せによる光毒性評価方法の提案

平成 15 年 2 月 13 日

株式会社 資生堂

安全性・分析センター

安全性研究所

杉山 真理子、森 眞輝、穂谷 昌利、板垣 宏

これまで、化粧品原料の光毒性は、「化粧品・医薬部外品製造ガイドブック」¹⁾や2001年に出版された「化粧品の安全性評価に関する指針2001」²⁾に記述されている白色モルモットや白色ウサギを用いる方法が汎用されてきた。

しかし、近年、動物愛護の観点から代替法の開発が進行し、EUでは、Balb/c 3T3細胞を用いる「*In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test」がECVAMにより承認され、さらにはOECDガイドラインへの採択も間近である。このように*in vitro*光毒性試験の開発が進展した理由としては、光毒性の発現機構が古くから検討されてきたことによるものと思われる。

光毒性の発現機構としては、化学物質が紫外線照射により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生ずる活性酸素やフリーラジカルの作用や、さらには光励起された化学物質自身の生体への作用と考えられている。この作用の生体側標的組織として細胞膜や核(DNA)を含めた細胞内小器官を想定して、これまでに幾つかの*in vitro*光毒性試験が検討されてきた。

弊社においては、化粧品原料に対する*in vitro*光毒性試験の開発に向けて積極的な研究を実施してきた。その結果、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験の結果を組み合わせる Battery 評価系を開発した。^{3)~11)}

酵母光生育阻害試験は、被験物質の適用により生ずる生育阻止帯の大きさを光照射の有無で比較する評価法である。酵母光生育阻害試験は、核等の細胞小器官への傷害を指標とする方法であり、化粧品原料に多い難水溶性の物質も評価可能であるという特長を有する。一方、赤血球光溶血試験は、細胞膜破壊を指標とする方法とする方法であり、被験物質の媒体として使用する有機溶媒を、培養細胞を用いる試験よりは多量に適用可能という特長を有している。さらに、この2種の試験法の結果を組み合わせる Battery 評価系では、化粧品原料等の安全性評価で問題となる False negative は認められないことを見出した。^{4,6)} また限られた被験物質数ではあるが、弊社の結果では、この Battery 評価系は、「*In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test」と比較して動物試験結果と同等以上の対応性を有することを確認した。^{10,11)}

そのため、弊社においては、この Battery 評価系を化粧品原料の日常試験として活用している。¹⁰⁾ さらに、これまで光源として使用してきたUVAからOECDガイドラインで検討されているソーラーシミュレーターへの切り替えに伴う諸条件についても検討し、ソーラーシミュレーターを用いても光毒性が評価可能であることを確認してきた。^{9,11)}

よって、今回、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験の結果を組み合わせる Battery 評価系を、光毒性を評価する*in vitro*試験として提案する。

引用文献

- 1) 日本公定書協会編、医薬部外品・化粧品製造申請ガイドブック第2版、薬事日報社、p143-144 (1994).
- 2) 日本化粧品工業連合会編、化粧品の安全性評価に関する指針 2001、薬事日報社、p9-11 (2001).
- 3) 赤血球を用いる光毒性試験法の検討、杉山真理子、板垣宏、加藤忍
日本動物実験代替法学会第5回大会、1991年11月(秦野)。
- 4) 赤血球および酵母を用いる光毒性試験の検討、杉山真理子、板垣宏、加藤忍
日本動物実験代替法学会第6回大会、1992年12月(東京)。
- 5) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cells hemolysis assay, M.Sugiyama, H.Itagaki, T.Hariya, N.Murakami and S.Kato, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 2, 183-191 (1994).
- 6) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system, M.Sugiyama, H.Itagaki and S.Kato, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 2, 193-202 (1994).
- 7) Photohemolysis test and yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of chemicals, M.Sugiyama, H.Itagaki and S.Kato, "*In vitro* skin toxicology: Irritation, phototoxicity and sensitization", Mary Ann Liebert Inc. Publishers, New York, 1994, p.213-221.
- 8) 光毒性試験代替法 試験の実例；その有用性と問題点、杉山真理子
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 5, 268-277 (1998).
- 9) 酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験における光源の影響
穂谷昌利、森真輝、杉山真理子、板垣宏
日本動物実験代替法学会第16回大会 2002年12月(東京)
- 10) A strategic approach for predicting phototoxicity of cosmetic ingredients, M.Sugiyama, M.Mori, M.Hoya, M.Hirota and H.Itagaki, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, *in press*.
- 11) Effects of light source on the prediction of phototoxicity by the yeast growth inhibition phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay, M.Mori, M.Hoya, M.Sugiyama, and H.Itagaki, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 投稿準備中。

以上

提出資料のリスト

- 資料 1-1：モルモットを用いる光毒性試験プロトコール
- 資料 1-2：モルモットを用いる光毒性試験の再現性及び予測性など
- 資料 2：光毒性のメカニズム、Battery system による光毒性評価フロー、
酵母光生育阻害試験の原理、赤血球光溶血試験の原理
- 資料 3-1：Battery system プロトコール
- 資料 3-2：被験物質の *in vivo* 試験結果プロトコール
- 資料 3-3：赤血球光溶血試験プロトコール
- 資料 4：被験物質のリスト（規格、特性等）
- 資料 5：被験物質の *in vivo* 試験結果
- 資料 6-1：被験物質の *in vitro* 試験結果のまとめ
- 資料 6-2：被験物質の酵母光生育阻害試験結果のまとめ
- 資料 6-3：被験物質の赤血球光溶血試験結果のまとめ
- 資料 7-1：Battery system における感度、特異性、予測性、一致率及びその他特徴
- 資料 7-2：酵母光生育阻害試験における感度、特異性、予測性、一致率及びその他特徴
- 資料 7-3：赤血球光溶血試験における感度、特異性、予測性、一致率及びその他特徴
- 資料 8：酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の再現性について
- 資料 9-1：論文（引用文献 5）
In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cells hemolysis assay,
M.Sugiyama, H.Itagaki, T.Hariya, N.Murakami and S.Kato,
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 2, 183-191 (1994).
- 資料 9-2：論文（引用文献 6）
In vitro assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and
battery system, M.Sugiyama, H.Itagaki and S.Kato,
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 2, 193-202 (1994).
- 資料 9-3：論文（引用文献 7）
Photohemolysis test and yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of
chemicals, M.Sugiyama, H.Itagaki and S.Kato,
"In vitro skin toxicology: Irritation, phototoxicity and sensitization",
Mary Ann Liebert Inc. Publishers, New York, 1994, p.213-221.
- 資料 9-4：論文（引用文献 8）
光毒性試験代替法 試験の実例；その有用性と問題点、杉山真理子
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 5, 268-277 (1998).

資料 9-5 : 学会ポスター発表資料 (引用文献 9)

酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験における光源の影響

穂谷昌利、森眞輝、杉山真理子、板垣宏

日本動物実験代替法学会第 16 回大会 2002 年 12 月 (東京)

資料 9-6 : 論文 (引用文献 10)

A strategic approach for predicting phototoxicity of cosmetic ingredients,

M.Sugiyama, M.Mori, M.Hoya, M.Hirota and H.Itagaki,

Alternatives to Animal Testing and Experimentation, *in press*.

資料 9-7 : 論文 (引用文献 11)

Effects of light source on the prediction of phototoxicity by the yeast growth inhibition

phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay,

M.Mori, M.Hoya, M.Sugiyama, and H.Itagaki,

Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 投稿準備中。

資料 10-1 : 提案者の研究歴等 (板垣宏)

資料 10-2 : 提案者の研究歴等 (杉山真理子)

資料 10-3 : 提案者の研究歴等 (森眞輝)

資料 10-4 : 提案者の研究歴等 (穂谷昌利)

資料 11-1 : 酵母光生育阻害試験に関する生データ等

資料 11-2 : 赤血球光溶血試験に関する生データ等

以上

モルモットを用いる光毒性試験プロトコール

1 目的

本試験法は、被験物質の光毒性をモルモットを用いて評価することを目的とする。

2 適用範囲

化学物質の光毒性試験に適用する。

なお、これらに紫外部吸収（280～400 nm）が認められた場合に本法で実施する。

3 被験物質及び対照物質

3.1 被験物質の必要量

約 5 g（mL）の被験物質を必要とする。

3.2 媒体の選択

被験物質の化学的性状により適切な媒体を用い、必要な場合には pH の調整などを行う。

3.3 対照物質

陰性対照物質として媒体を用いる。

3.4 陽性対照物質

キサントトキシン（8-メトキシソラレン、ナカライテスク株式会社）を陽性対照物質とする。媒体としてエチルアルコールを用いる。

4 使用動物

4.1 種、系統、性

モルモット・Std:Hartley 系・雌を用いる。

4.2 週齢

4～5 週齢で購入し、約 1 週間の検疫・馴化飼育後、試験に供する。

4.3 環境条件

飼育室の環境条件は、温度 21～25℃、湿度 40～70%、換気回数 10～15 回/時間（オールフレッシュエアー）、照明時間 12 時間（7～19 時）とする。

4.4 飼育密度

1 匹/ケージとする。

4.5 飼育器材

ケージは金属製網底ケージ（260 × 380 × 180 mm, 日本クレア株式会社製）を用いる。識別はケージ識別カードを用いて行う。

4.6 飼料

固型飼料（ウサギ・モルモット用固型飼料 RC-4, オリエンタル酵母工業株式会社製）を用いる。

4.7 飲料水

紫外線及びマイクロフィルター処理した水道水を用いる。

4.8 個体識別

入荷時に装着する耳標により行う。

4.9 検疫・馴化飼育

原則として 11 日間とする。

4.10 使用動物数

使用数は原則として 5 匹とする。

5 投与経路, 投与量及び投与方法

5.1 試験濃度の設定

基本的に、濃度及び媒体は被験物質ごとに設定する。

5.2 投与方法

投与前日にモルモットの背部を電気バリカンで剪毛した後、ヘアリムーバー（株式会社資生堂）にて除毛処理し、約 24 時間後にモルモット専用固定器を用いて腹位に固定する。

布製絆創膏（ニチバン No. 25, ニチバン株式会社）を用いて、モルモットの背部正中線を中心とした左右両側の皮膚に、約 1.5 × 1.5 cm の区画を 4 ヶ所ずつ左右対称に設け、左右一対ずつ被験物質 0.02 ml もしくは 0.02 g を均一に開放塗布する。5 水準の被験物質を投与する必要がある場合は、区画を約 1.0 × 1.0 cm の範囲とし、投与量を 0.01 ml もしくは 0.01 g とする。また、皮膚反応の部位差を小さくするために投与の際、動物ごとに塗布部位を 1 つずつ下方にずらしてローテーションを行う。

なお、被験物質が液状の場合マイクロピペット（エクセルトリペット：稲垣薬品）を用い、マイクロピペットにて分取不可能である場合にはスパチュラを用いる。なお、粘度の高い被験物質や製剤（クリーム、乳液など）の分取では専用のマイクロピペット（マイクロマン M

— 25 : GILSON) を用いる。

投与後 30 分に、片側をアルミホイルで被覆して対照部とした後、光源から動物までの距離を 10 cm に定めて 14.0 J/cm² のエネルギー量の光照射を行う。

5.3 光照射

光源として Black Light (東芝 FL40S・BLB, $\lambda = 300 \sim 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$) ランプ 6 灯を並列に設置し、ガラスフィルター (厚さ 3 mm) にて 320 nm 以下の波長をカットして照射する。

なお、照射開始 10 分前に光源のスイッチを入れ、光源が安定するまで約 10 分放置後、紫外線強度計 (UVR-305/365・(II), 関トプコン製) を用いて光源から 10 cm の距離で紫外線強度を測定する。照射時間は以下の式に従って求め、タイマーを設定する。

照射終了後、アルミホイル、布製絆創膏及び保定を取り除き、1 匹ずつケージに收容する。

紫外線強度 : A (mW/cm²)

$$\text{照射時間 (m)} = \frac{14.0 \times 1000 \text{ mW/cm}^2}{A \text{ mW/cm}^2} \times \frac{1}{60}$$

6 皮膚反応の判定

照射後 24, 48 及び 72 時間目に、皮膚反応の判定を飼育室照明下で肉眼観察し、紅斑及び浮腫について以下の判定基準に従い、判定記録 (光毒性試験) に記載する。判定に際し、必要に応じて皮膚上に残存している被験物質を脱脂綿に水道水あるいはエチルアルコールを含ませて拭き取る。

判定基準

	判定基準	評点
紅斑	紅斑が全く認められないもの	0
	わずかな紅斑が認められるもの	1
	明らかな紅斑が認められるもの	2
	強い紅斑または壊死が認められるもの	3
浮腫	浮腫が全く認められないもの	0
	わずかな浮腫が認められるもの	1
	明らかもしくは強い浮腫が認められるもの	2

7 光毒性の評価

照射後 24, 48 及び 72 時間目に、照射部位と非照射部位のそれぞれの評点の和を動物数で割って、各時間毎の平均評点を算出し、照射部位と非照射部位の差を求める。この差の最大値を光毒性最終評価点とし、以下の評価基準に従って評価する。

計算はフルスケールで行い、評点等は小数点以下第 2 位を四捨五入し、小数点以下第 1 位まで求める。

評価基準

光毒性最終評価点	評 価	評価略号
0.0 ~ 0.5	ほとんど光毒性なし	—
0.6 ~ 1.2	軽度の光毒性あり	±
1.3 ~ 2.5	中程度の光毒性あり	+
2.6 ~ 5.0	強い光毒性あり	++

8 その他の検査

8.1 一般状態観察

投与日は投与前後の2回、投与日以降、判定終了後まで1日1回観察する。

8.2 体重測定

投与日及び投与後3日に測定する。

9 統計学的解析

統計学的解析は用いない。

10 参考文献

- 1) Morikawa, F., Nakayama, Y., Fukuda, M., Yokoyama, Y., Nagura, T., Ishihara, M. and Toda, K., Evaluation of Phototoxicity and Photoallergy in Laboratory Animals : *Sunlight and Man*. Fitzpatrick, T. B. et. Al. Ed. University of Tokyo Press, pp. 529-557 (1974) .
- 2) 森川 藤鳳, 新しい毒性試験と安全性の評価, 白須 泰彦・松岡 理 編, ソフトサイエンス社, pp. 433-465 (1975) .
- 3) 小林 敏明 他, 毒性試験講座7 機能毒性学, 福原 武彦・小野 宏 編, 地人書館, pp. 287-288 (1990) .

以 上

モルモットを用いる光毒性試験の再現性及び予測性など

今回使用したモルモットを用いる光毒性試験は、ガイドラインとして正式に認められたものではないが、化粧品企業などにおいて古くから種々検討されており、その結果、現在では光毒性を評価する安全性試験として、かなりの実績があるものと考えられる。

このモルモットを用いる光毒性試験の詳細については、1975年に出版された「新しい毒性試験と安全性の評価」に森川(1975)が記述したものがあ¹⁾る。また、このモルモットを用いる光毒性試験は、昭和63年～平成元年度の「新化粧品等安全性評価指針」の検討班(黒川雄二班長)により作成された「化粧品毒性試験法ガイドライン案」になかにも採り上げられ²⁾、さらには「化粧品・医薬部外品製造ガイドブック」³⁾、や2001年に出版された「化粧品の安全性評価に関する指針2001」⁴⁾にも記載されている。

このモルモットを用いる光毒性試験の施設内の再現性については、開発時からの時間経過を考えるとかなり高いものと予想される。以下の表は、弊社における陽性対照物質(0.02%の8-methoxypsolaren)のエタノール溶液の光照射部位における皮膚反応について、過去の試験結果をまとめたものである。各観察時間における評価点の変動係数は0.16～0.26であり、通常の生物試験結果の変動係数が0.2前後であることを考慮すると、本試験の再現性の高さを示すものと考えられる。

試験実施時期	24時間		48時間		72時間	
	陽性率	評価点	陽性率	評価点	陽性率	評価点
1985/7/8-1985/7/12	10/10	2.4	10/10	2.8	10/10	2.4
1985/7/22-1985/7/26	5/5	4.6	5/5	3.6	5/5	3.4
1986/5/26-1986/5/30	5/5	4.0	5/5	3.4	5/5	2.0
1986/10/20-1986/10/24	5/5	4.6	5/5	3.2	5/5	3.0
1988/5/30-1988/6/3	10/10	5.0	10/10	4.5	10/10	4.3
1989/5/22-1989/5/26	5/5	4.2	5/5	3.8	5/5	3.4
平均評価点		4.1		3.6		3.1
標準偏差		0.9		0.6		0.8
変動係数		0.22		0.16		0.26

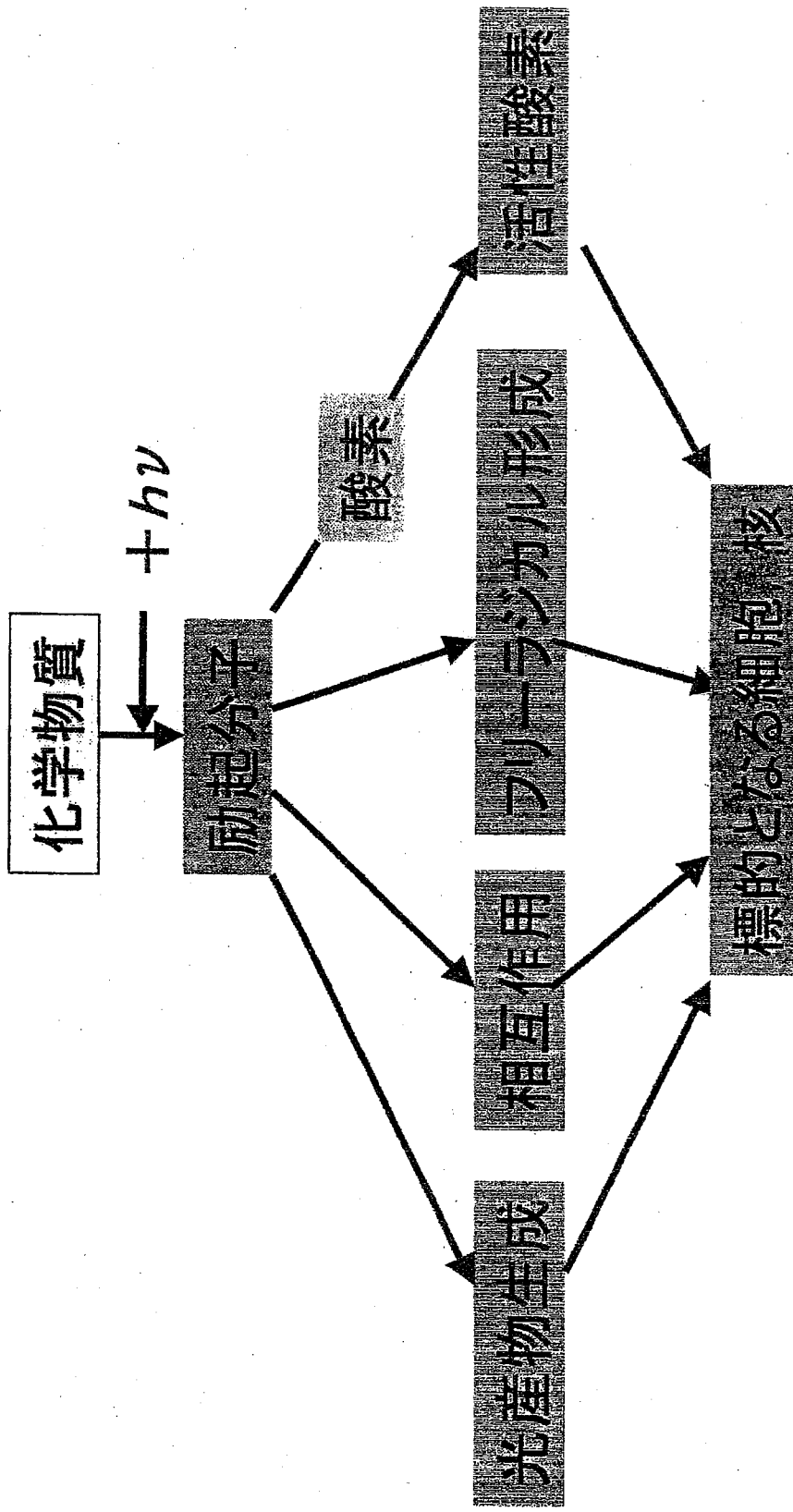
施設間の再現性については、試験法の施設間 validation は実施されていないため厳密な意味では議論することはできない。しかし、この試験法が開発されてきてからの時間経過並びに本試験法の種々のガイドライン案への採用を考えると施設間再現性は低くないものと考えられる。

次にヒトにおける光毒性との対応性であるが、試験法の施設間 validation が実施されていないことおよびヒトのデータが光毒性と光感作性(光アレルギー性)を正確に区別できないことから、厳密な意味での対応性を議論することは不可能である。しかし、このモルモットを用いる光毒性試験が既知の光毒性物質を捉えていること、並びに企業がこの試験を導入したことにより、過去に問題となった光毒性に基づく市場での皮膚トラブルが、現在、ほとんど報告されていないことから、このモルモットを用いる光毒性試験は、ヒトにおける光毒性を的確に捉えているものと考えられる。

引用文献

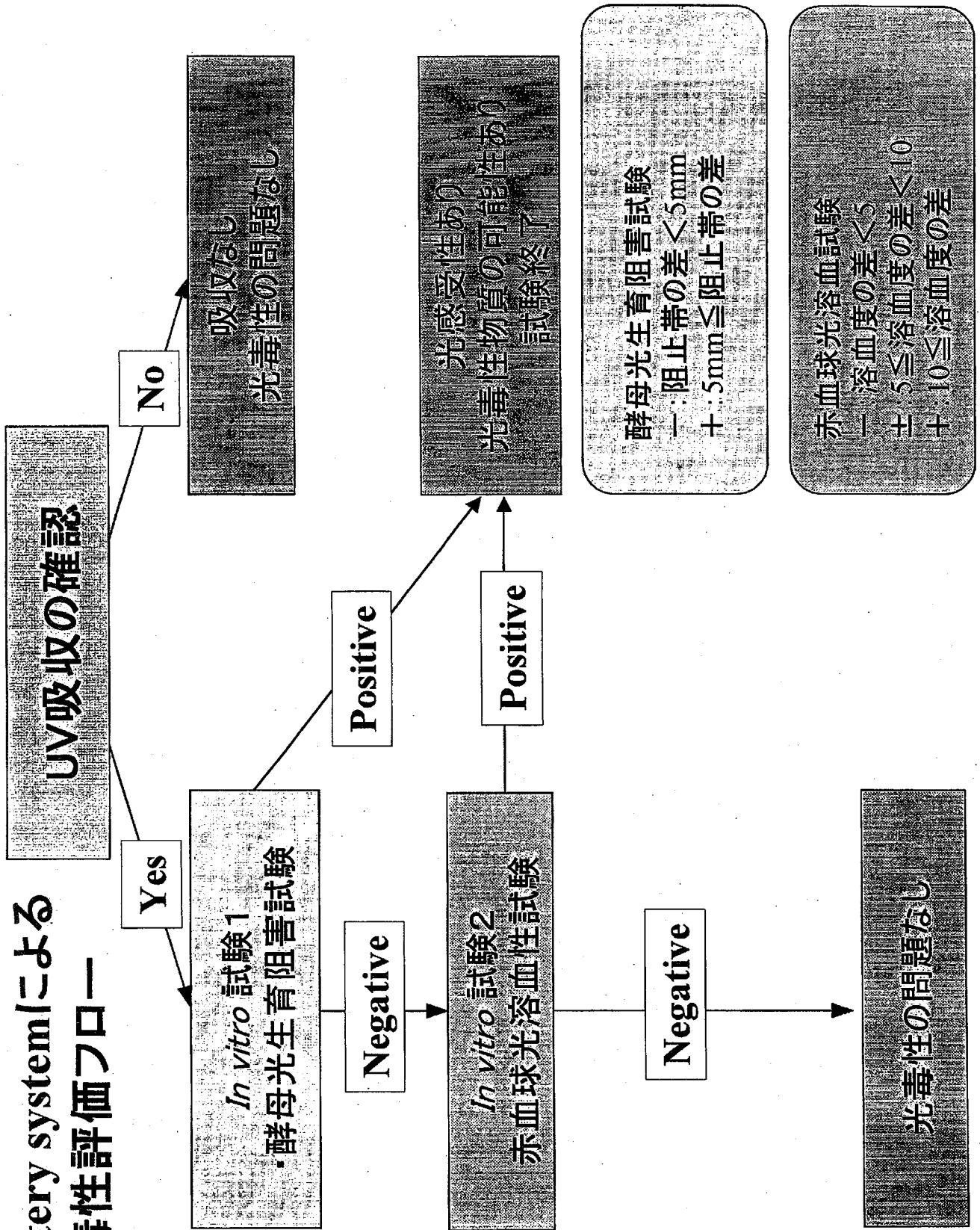
1. 森川藤鳳、新しい毒性試験と安全性の評価、白須泰彦・松岡理編、ソフトサイエンス社、p433-465 (1975).
2. 黒川雄二他、新化粧品等安全性評価指針班報告書、1990年.
3. 日本公定書協会編、医薬部外品・化粧品製造申請ガイドブック第2版、薬事日報社、p143-144 (1994).
4. 日本化粧品工業連合会編、化粧品の安全性評価に関する指針2001、薬事日報社、p9-11 (2001).

光毒性のメカニズム

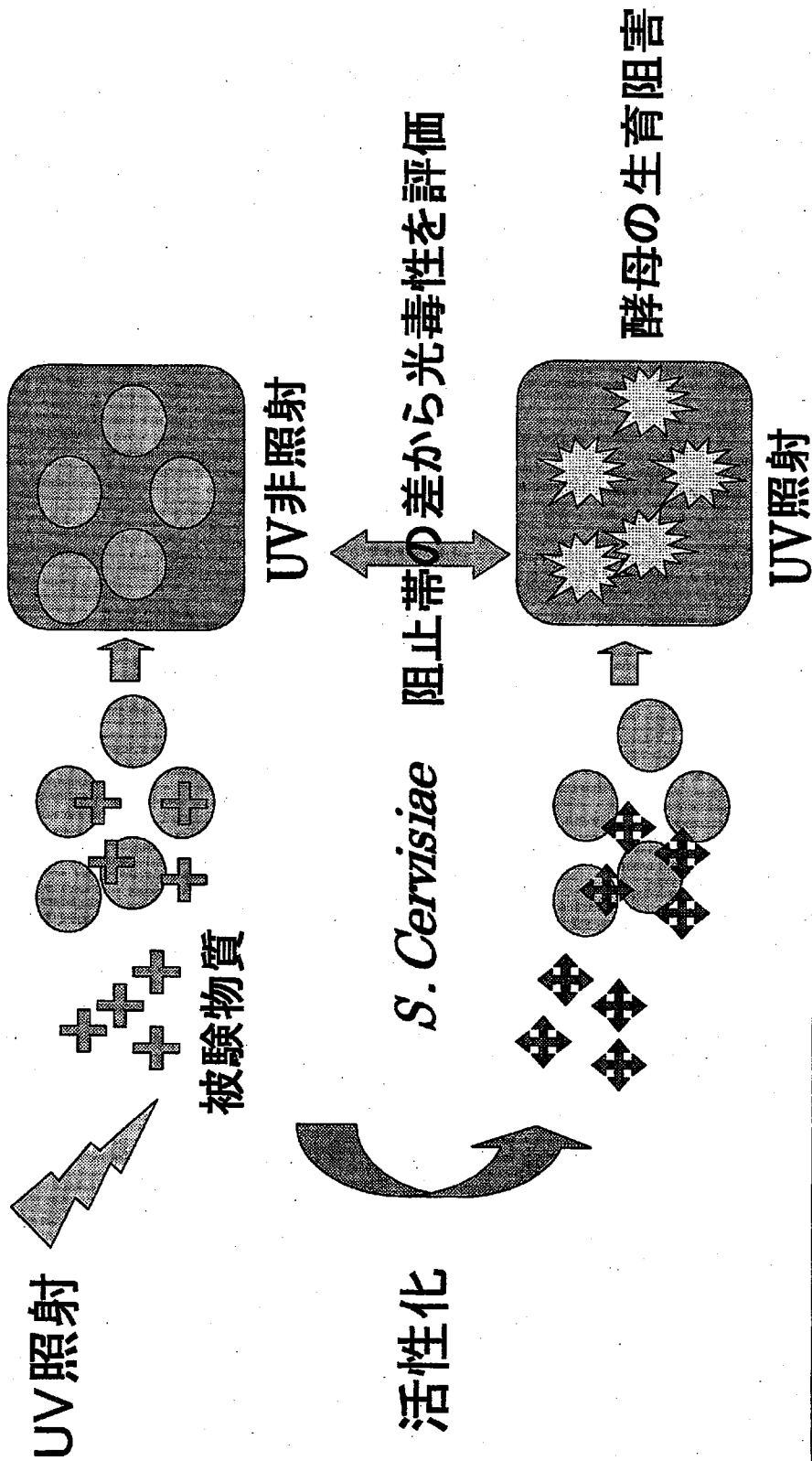


- ・酵母光生育阻害試験：生育阻害(膜破壊, 細胞小器官)
- ・赤血球光溶血試験：光溶血(膜破壊)
- ・光細胞毒性試験：細胞毒性(サイトカインおよびケミカル
メデイエーターの放出)

Battery systemによる 光毒性評価フロー

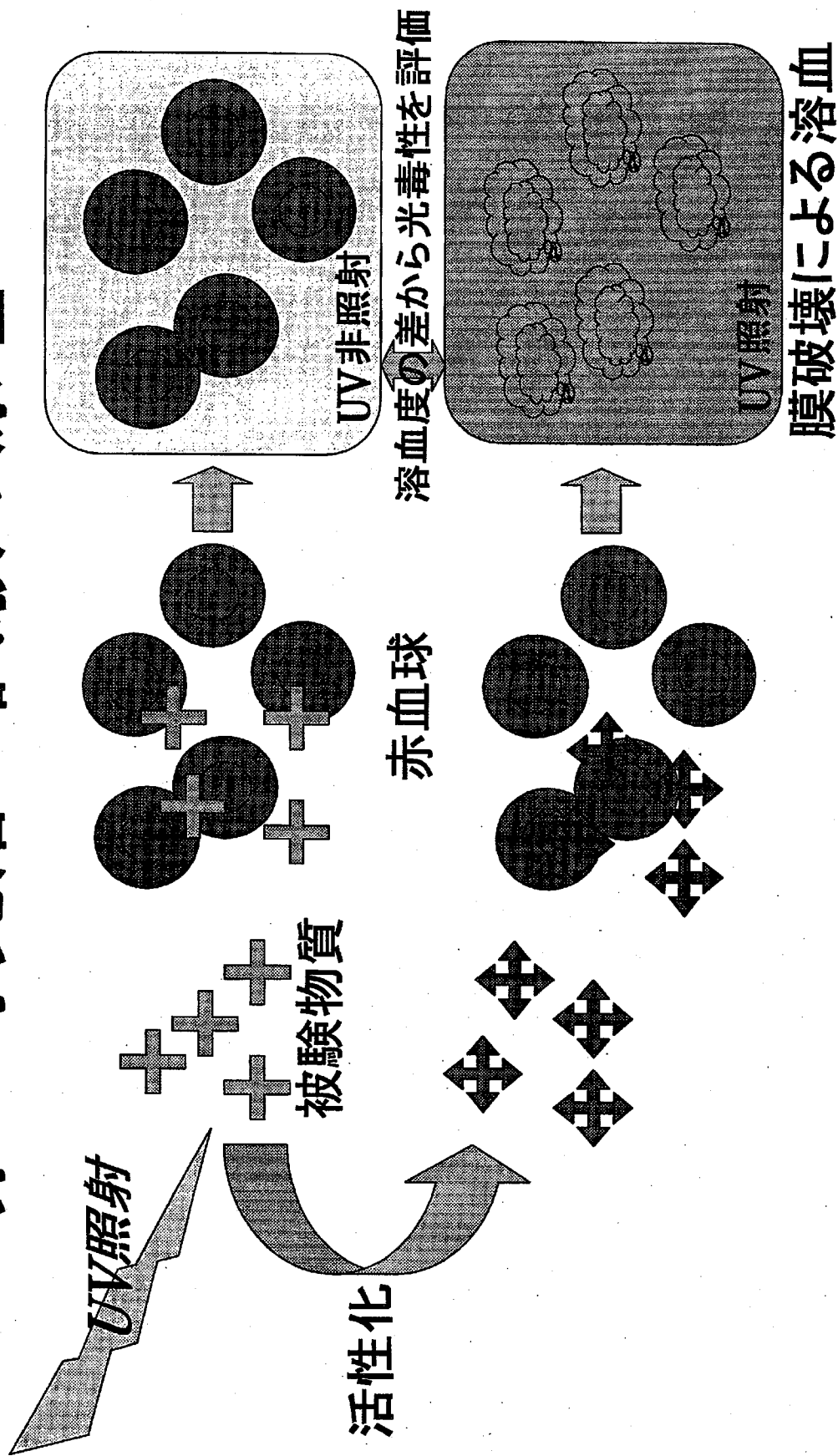


酵母光生育阻害試験の原理



化学物質の細胞膜および細胞内小器官に対する障害に基づく試験法であり、UV照射によって生じる酵母の生育阻害から化学物質の光毒性を評価する。

赤血球光溶血試験の原理



化学物質の細胞膜破壊機構に基づく試験法であり、UV照射時の溶血性から化学物質の光毒性を評価する。

Battery system プロトコール

1 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基材、薬剤、色剤及び香料のうち、化学構造から可視部・紫外部(280~780nm)に吸収を持つと予想される被験物質、植物抽出物(液)及び外観上着色のある被験物質に関して適用する。

2 光毒性試験の進め方

被験物質は、最初に「酵母光生育阻害試験」にて評価を行い、陰性の場合には更に「赤血球光溶血試験」を行う。

どちらの試験においても陰性の場合には光毒性に関する問題はないと判断する。

いずれかの試験法で陰性と判断されなかった場合は光毒性があるものと判断する。

3 試験法の改訂

試験法に改訂の必要が生じたときは、定められた手順に従い改訂する。

4 参考文献

- 1) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals:(I) Red Blood Cell Hemolysis Assay. AATEX 2, 183-191.
- 2) Sugiyama M. *et al.* (1994) Photohemolysis Test and Yeast Growth Inhibition Assay to Assess Phototoxic Potential of Chemicals. Alternative Methods In Toxicology Vol.10 In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Rougier A *et al.* (ed.) Marry Ann Libert, Inc., New York, 213-221.
- 3) 杉山真理子ら, 日本動物実験代替法学会 第5回大会要旨集(秦野) p110-111(1991).
- 4) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals:(II) Yeast Growth Inhibition Assay and Battery System with Photohemolysis Assay. AATEX 2, 193-202.
- 5) 杉山真理子ら, 日本動物実験代替法学会 第6回大会要旨集(東京) p104-105(1992).

以上

酵母光生育阻害試験プロトコール

1. 目的

本試験法は、酵母を用いて被験物質の光生育阻害を評価することを目的とする。本試験法は、光毒性試験の代替法として使用可能である。

2. 原理

光毒性の発現メカニズムは、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカルの生体への作用や、さらには光励起された化学物質自身の生体への作用と考えられている。この作用の生体側標的組織として細胞膜や核を含めた細胞内小器官が考えられる。本法は、光毒性試験代替法としては、細胞膜破壊および細胞内小器官に対する傷害に基づく光毒性を検出する方法である。

3. 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤および香料などのうち、紫外外部吸収(280~400nm)が認められるものに適用する。

4. 材料および実験方法

4.1. 対照物質

1) 陰性対照物質

被験物質溶液の調製に用いた溶媒を陰性対照物質とする。

2) 陽性対照物質

キサントトキシシン(8-methoxypsoralen, ナカライテスク(株))を用いる。

4.2. 器具類

1) 6 ウェルマイクロプレート

CORNING 社製 No.25810, COSTAR 社製 No.3516, FALCON 社製 No.3846 のいずれかを用いる。同一試験内では製造メーカーおよびロットは同じものを用いる。

2) ガラス器具

三角フラスコ, メスフラスコ, メスシリンダー, びん等。

3) 滅菌済み使い捨て器具

ピペット, 遠沈管等

4) 濾紙円板

ペーパーディスク抗生物質検定用, 厚手, 6 mm (東洋濾紙(株))を用いる。同一試験内では同じロットのものを用いる。

5) ピンセット

6) ノギス

デジタル・キャリパー DC-150P ((株) ミットヨ)を用いる。

7) アルミ箔

8) ビニル袋

4.3. 滅菌

ガラスびん、濾紙円板、ピンセット、アルミ箔および 4.8.の項で調製した 1.5%ポテトデキストロース寒天培地を高圧蒸気滅菌する。

4.4. 機器

1) 太陽光シミュレーション装置

通常は、光源として紫外線 A (UVA) 領域、紫外線 B (UVB) 領域および可視光領域に照射スペクトルを持つ Metal halide lamp (Dr. Honle GmbH 社製, Bulb, 型番 0175), パワーサプライ (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 0298) を装備した SOL500 (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 5468) を用いる。フィルターは H1 フィルター (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 4730) を使用する。新しい Metal halide lamp は、エネルギー強度が強いため約 100 時間ランプを点灯させてエネルギーを減衰させる必要がある。

2) 紫外線強度計

UVA の強度測定として、(株) トプコン製の紫外線強度計 (UV-RADIOMETER UVR-3036/S, 表示部型番: UVR-1S, 受光部 (UVA 領域) 型番: UVR-36) を用いる。

3) 孵卵器

25℃に設定できるものを用意する。

4.5. 使用酵母

ドライイースト (オリエンタル酵母工業 (株)) を用いる。

4.6. 酵母懸濁液の調製

ドライイースト (オリエンタル酵母工業 (株)) に生理食塩液を加えて 2mg/mL の懸濁液を調製する。

4.7. 4%ポテトデキストロース寒天培地含有 6 ウエルマイクロプレートの準備

ポテトデキストロース寒天培地 (極東製薬工業 (株)) 40 g に精製水 1L を加えて溶解する。高圧蒸気滅菌 (121 °C, 20.min) 後、室温にて約 60 °C 位になるまで放置し、固化しないうちに 6 ウエルマイクロプレートの各ウエルに 7mL ずつ分注する。固化したら、転倒して室温下で水蒸気を飛ばし、ビニル袋に入れて室温保存する。

4.8. 1.5%ポテトデキストロース寒天培地の調製

ポテトデキストロース寒天培地 1.5 g を精製水 100 mL に懸濁させて高圧蒸気滅菌する。

4.9. トップアガーの調製および酵母の播種

保温中の 1.5%ポテトデキストロース寒天培地 1.9 mL に、調製した酵母菌液を 0.1 mL の割合で加え、良く混和する。ドライイーストを含む寒天培地が固化しないうちに、あらかじめ 4%ポテトデキストロース寒天培地が添加されている 6 ウエルマイクロプレートに 2mL/well ずつ重層する (落下菌を防ぐためガスバーナーの炎から半径約 30 cm 以内で行う)。この時、プレートをゆすって均一に重層する。上層のドライイーストを含む寒天培地が固化するまで静置する。

4.10. 被験物質溶液の調製

被験物質は最高溶解濃度もしくは投与可能な最高濃度を含む 5 倍希釈系列を 4 水準作製する。被験物質の溶媒には、精製水を用いる。被験物質が精製水に溶解しない場合には、エタノール、アセトン、メタノール、DMSO の中から最も高い溶解度を与える溶媒を選択する。

陽性対照物質としてキサントトキシシン (8-methoxypsoralen, ナカライテスク (株)) 0.01% エタノール溶液を調製する。

4.11. 被験物質の添加

6 ウェルマイクロプレートに被験物質添加用ウェル、溶媒対照ウェルおよび陽性対照ウェルを割り付ける。

滅菌したアルミ箔の上に濾紙円板を必要数並べ、被験物質溶液、被験物質媒体およびキサントトキシシン各 0.02 mL を濾紙円板に滴下する。ピンセットを用いて菌を播種したマイクロプレートの各ウェルの中央に濾紙円板を 1 枚ずつ密着させる (被験物質の濾紙円板への滴下およびウェルへの移動は、落下菌を防ぐためガスバーナーの炎の近くで行う)。

実験は通常 duplicate で行い、さらに照射用、非照射用プレートを設定するため、1 被験物質あたり 4 枚のマイクロプレートを必要とする。

4.12. 紫外線照射

測定 10 分前に光源のスイッチを入れ、約 10 分放置後、紫外線強度計を用いて 6 ウェルマイクロプレートの蓋を通過した UVA 強度を測定する。このとき、プレートを置く位置、測定部位によっても強度が異なるため、6 カ所の測定値の平均を求める。測定した UVA の強度の平均値 (A) から照射時間を以下の式に従って求める。照射用のマイクロプレートのみ UVA 15.0 J/cm² を照射し、非照射用プレートはアルミホイルで遮光して照射用マイクロプレートの照射が終了するまで室温で放置する。

紫外線強度: A(mW/cm²)

照射時間(S) = [(15.0 × 1000 mJ/cm²)/(A mW/cm²)]

また、明らかに照射むらがある場合には照射場所のローテーションも考慮する必要がある。

4.13. 培養

照射終了後、照射用および非照射用マイクロプレートを反転させ、孵卵器中で約 72 時間培養する。なお、マイクロプレートの各ウェルの中央に置いた濾紙円板は、取り除いたり、位置をずらしたりはせずに試験期間終了まで静置しておく。

4.14. 阻止帯の測定

阻止帯の直径の測定は、ノギスを用いて行う。円形状の阻止帯の直径を濾紙円板を含めて水平方向と垂直方向で測定し、その平均値から濾紙円板の直径 6 mm を差し引いて阻止帯の大きさを求める。次に以下の式から阻止帯の差を算出する。

阻止帯の差 (Z; mm) = 照射プレートの阻止帯 - 非照射プレートの阻止帯

また、必要に応じて阻止帯の見やすさも参考として記載する。

阻止帯が見にくい場合には、眼を細めてプレートを覗き込むとよい。何となく境界が見えてくることがある。また、阻止帯の測定が困難な場合など、必要に応じてデジタルカメラを活用し撮影しておくことが望ましい。

5. 評価

以下の基準に従い、評価を行う。

阻止帯の差 (Z: mm)	光毒性の評価
$Z < 2$	—
$2 \leq Z < 5$	±
$5 \leq Z$	+

6. 被験物質の保管場所

被験物質は、試薬保管庫、試薬保管用冷蔵庫、試薬保管用冷凍庫、試薬保管用デシケーター、試薬保管用冷蔵庫内デシケーター、試薬保管用冷凍庫内デシケーターのいずれかに保管する。

7. 保守・点検

- 1) 紫外線強度計は、1年に1度校正を行う。校正は、(株)トプコン (TEL: 03-5684-2311) に依頼する。
- 2) 照射装置を使用する際、フィルター部分に汚れがないことを確認する。

8. 記録の保管

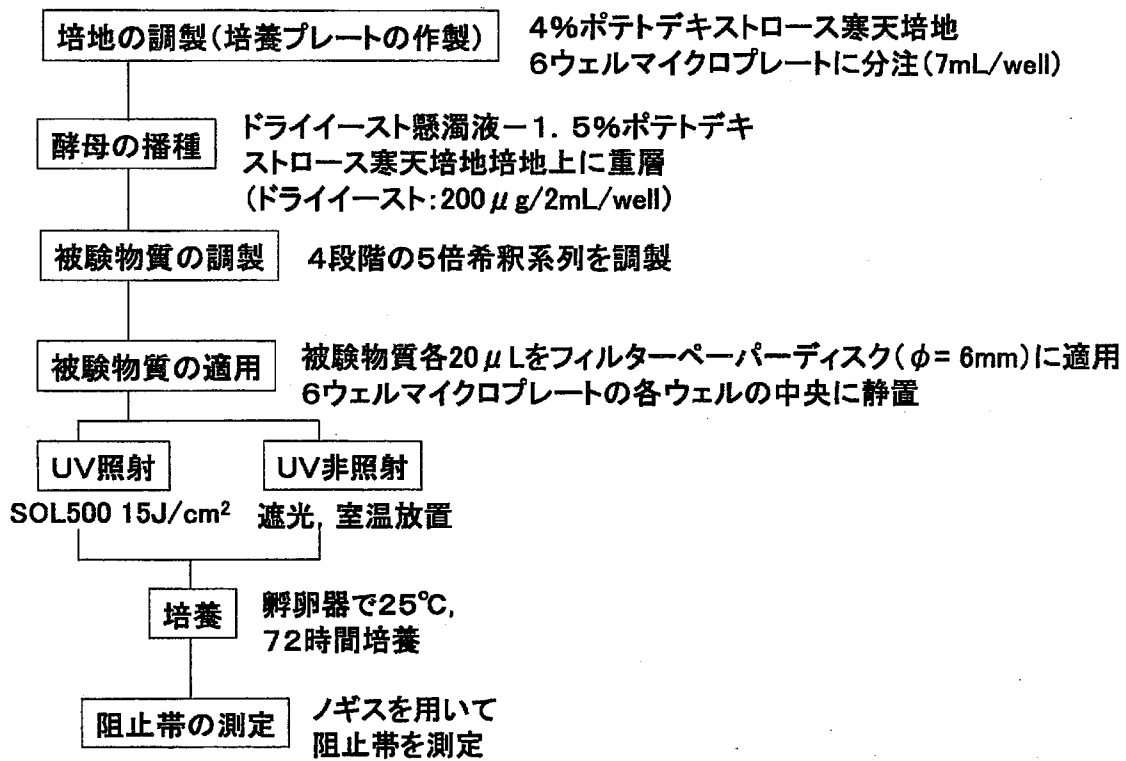
以下の試験記録は、記録保管場所に保管する。

- ①酵母光生育阻害試験条件等記録
- ②試薬・被験物質管理記録
- ③注射用水・生理食塩液管理記録
- ④酵母光生育阻害試験プレート培地・上層培地調製記録
- ⑤酵母光生育阻害試験酵母播種記録
- ⑥酵母光生育阻害試験酵母菌液調製記録
- ⑦酵母光生育阻害試験陽性対照溶液調製記録
- ⑧太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑨紫外線強度計使用記録
- ⑩酵母光生育阻害試験孵卵器使用記録

9. 参考文献

- 1) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals: (II) Yeast Growth Inhibition Assay and Battery System with Photohemolysis Assay. AATEX 2, 193-202.
- 2) Sugiyama M. *et al.* (1994) Photohemolysis Test and Yeast Growth Inhibition Assay to Assess Phototoxic Potential of Chemicals. Alternative Methods In Toxicology Vol.10 In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Rougier A. *et al.*(ed.) Marry Ann Libert, Inc., New York, 213-221.
- 3) 杉山真理子ら, 日本動物実験代替法学会 第6回大会要旨集 (東京) (1995) p110-111.
- 4) Sugiyama M. *et al.* (2002) A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. AATEX 9, 29-39.
- 5) Mori M. *et al.* (2003) Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay. AATEX, Submitted.

酵母光生育阻害試験フローチャート



以上

赤血球光溶血試験プロトコール

1 目的

本試験法は、赤血球を用いて被験物質の光溶血性を評価することを目的とする。
本試験法は、光毒性試験の代替法として使用可能である。

2 原理

光毒性の発現メカニズムは、化学物質が太陽光により励起され、基底状態に戻る時に放出されるエネルギーにより生じる活性酸素やフリーラジカルの生体への作用や、さらには光励起された化学物質自身の生体への作用と考えられている。この作用の生体側標的組織として細胞膜や核を含めた細胞内小器官が考えられる。

本法は、光毒性試験代替法としては、細胞膜破壊に基づく光毒性を検出する方法で、香料の光毒性は感度良く検出される。

3 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基剤、薬剤、色剤、香料などのうち、紫外部吸収(280~400nm)が認められ、緩衝液を含む赤血球懸濁液に溶解もしくは均一に分散するものに適用する。

4 材料および実験方法

4. 1 陰性対照物質

被験物質溶液の調製に用いた溶媒を陰性対照物質とする。

4. 2 陽性対照物質

アクリジン(SIGMA CHEMICAL CO.)を用いる。

4. 3 赤血球

緬羊無菌保存血を(株)日本生物材料センターより購入

(株)日本生物材料センター(TEL:03-3811-1960)

採血から1週間程度を使用期限とする。また、1度開封した血液は使用しないほうが良い。

4. 4 器具類

4. 4. 1 24 ウェルマイクロプレート

FALCON 社製 No. 3047 を用いる。同一試験内ではロットは同じものを用いる。

4. 4. 2 96 ウェルマイクロプレート

FALCON 社製 No. 3070 を用いる。

4. 4. 3 漏斗

4. 4. 4 脱脂綿

4. 4. 5 ガラス器具

溶液調製用にピペット、三角フラスコ、メスフラスコ、メスシリンダー等。

4. 4. 6 ガラス遠沈管

ジエチルエーテルを使用して完全溶血の調製する場合に必要である。しかし、その他の方法により調製する場合は使用しない。

4. 4. 7 分注器

4. 4. 8 使い捨て器具

ピペット、遠沈管等。

4. 5 機器

4. 5. 1 太陽光シミュレーション装置

通常は、光源として紫外線 A (UVA) 領域、紫外線 B (UVB) 領域および可視光領域に照射スペクトルを持つ Metal halide lamp (Dr. Honle GmbH 社製, Bulb, 型番 0175), パワーサプライ (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 0298) を装備した SOL500 (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 5468) を用いる。フィルターは H1 フィルター (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 4730) を使用する。新しい Metal halide lamp は、エネルギー強度が強いため約 100 時間ランプを点灯させてエネルギーを減衰させる必要がある。

4. 5. 2 紫外線強度計

UVA の強度測定として、(株)トプコン製の紫外線強度計 (UV-RADIOMETER UVR-3036/S, 表示部型番: UVR-1S, 受光部 (UVA 領域) 型番: UVR-36) を用いる。

4. 5. 3 冷却高速遠心機

日立高速遠心機 CR20B2 において、マイクロタイターバケットを用いて行う。しかし、個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行う場合には使用しない。

4. 5. 4 冷却小型遠心機

50mL 遠沈管を適用できることが必要である。さらに個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行う場合には 1.5mL マイクロチューブを適用できる機器も必要である。

4. 5. 5 遠心エバポレーター

ジエチルエーテルを使用して完全溶血の調製する場合に必要である。しかし、その他の方法により調製する場合は使用しない。

4. 5. 6 マイクロプレートリーダー

BioRad Model 3550 において 540nm のフィルターを使用する。ただし、540nm のフィルターを使用できるものであれば、その他のマイクロプレートリーダーでも使用可能である。

5. 4 塩溶液の調製

- ・生理食塩液: 0.9%(w/v)塩化ナトリウム水溶液
- ・Veronal Buffer: 5,5-ジエチルバルビタール酸 2.88g を約 900mL の精製水に溶解させ、塩化ナトリウム 42.5g と 5,5-ジエチルバルビタール酸ナトリウム 1.88g を加え、さらに精製水を加えて 1L とする。これを保存液として pH7.4 に調製されていることを確認した上で、使用時に 5 倍に精製水にて希釈して用いる。

5. 5 被験物質用液の調製

被験物質は投与可能な最高濃度、もしくは最高溶解濃度を含む 5 倍希釈系列を 4 水準作製する。被験物質の溶媒には、精製水を用いる。被験物質が精製水に溶解しない場合には、エタノール、アセトン、メタノール、DMSO の中から最も高い溶解度を与える溶媒を選択する。

陽性対照としてアクリジン 10%(w/v)アセトン溶液を最高濃度とし、5 倍水準希釈系列を 4 水準調製する。

5. 6 赤血球懸濁液の調製

緬羊無菌保存血を脱脂綿で濾過し、生理食塩水で洗い流した後遠心分離を行う (3000rpm, 10min)。血漿をアスピレーターを用いて除去し、Veronal Buffer を加えてピペッティングを行い、遠心分離を行う (3000rpm, 5min)。この Veronal Buffer による洗浄操作をさらに 2 回行い、溶血が生じていない (上清の緩衝液がほぼ無色透明) ことを確認後、上清の緩衝液をアスピレーターを用いて除去する。残りの沈殿した赤血球を原液として、Veronal Buffer にて 40 倍に希釈して 2.5%(v/v)の赤血球懸濁液を調製する。

5. 7 完全溶血(100%control)の調製

2.5%(v/v)赤血球懸濁液に等量のジエチルエーテルを加えて混合し、ミキサーにて攪拌後、約 5 分間超音波処理を行う。ほぼ完全に溶血したことを確認し、遠心後 (3000rpm, 5min)、上層のジエチルエーテルをアスピレーターを用いて吸引除去する。完全溶血層は、試験管に分注して遠心エバポレーターを用いて残存したジエチルエーテルを蒸発させる。

あるいは SLS や Triton X-100 などの活性剤添加、凍結融解、過剰精製水添加による溶血などにより調製することもできる。ただし、あらかじめ条件設定が必要である。

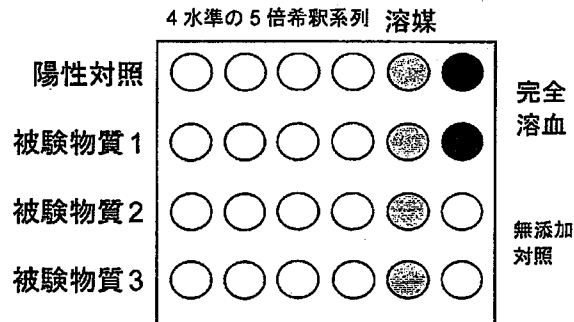
5. 8 被験物質の添加

24 ウェルマイクロプレートに被験物質添加用ウェルと完全溶血添加用ウェルを割り付ける。被験物質添加用ウェルに、2.5%赤血球懸濁液 990 μ L を分注器を用いて分注し、被験物質溶液、溶媒または Veronal Buffer 0.01mL を各ウェルに加える。

完全溶血用ウェルには完全溶血各 1mL を分注する。

実験は通常 duplicate で行い、さらに照射用、非照射用プレートを設定するため、陽性対照と 3 被験物質で 4 枚のプレートを必要とする。

被験物質溶液を添加後、プレートミキサーを用いて良く混和し(30sec)、照射用プレートの光照射を行う。非照射用プレートはアルミホイルで遮光して照射終了まで室温で放置する。



5. 9 光照射

照射 10 分前に光源のスイッチを入れ、約 10 分放置後、紫外線強度計 (UV-RADIOMETER UVR-3036/S, 楢トプコン製) を用いて 24 ウェルマイクロプレートの蓋を透過した紫外線 (UVA) 強度を測定する。このとき、プレートを置く位置、測定部位によっても強度が異なるため、6ヶ所の測定値の平均を求める。照射時間は次の式にしたがって求め、照射用のプレートのみ UVA10.0J/cm² を照射する。

紫外線強度: A (mW/cm²)

照射時間 (s) = (10.0 × 1000 mJ/cm²) / (A mW/cm²)

また、明らかに照射むらがある場合には照射場所のローテーションも考慮する必要がある。

5. 10 溶血度の測定

照射終了後、照射用、非照射用マイクロプレートを再びプレートミキサーを用いてよく混和し(30sec)、プレートのまま遠心分離(マイクロタイターバケットを用いて 2000rpm, 15min)し、未溶血の赤血球を取り除く。24 ウェルマイクロプレートの各ウェルから静かに上清を採取し、96 ウェルマイクロプレートの 2 ウェルに 0.1mL ずつ移す(duplicate)。被験物質ごとに、照射用、非照射用の上清を割り付ける。

プレートのまま遠心分離できる機種がない場合は、個々のウェルからチューブに採取して遠心分離して行うことも可能であるが、あらかじめ条件設定が必要である。

5. 1 1 マイクロプレートリーダーによる測定

マイクロプレートリーダーを用いて、540nm 付近の波長で 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルの吸光度を測定する。光溶血度の算出は、非照射 2 プレートにおける各ウェルの平均を求めたうえで、照射 2 プレートそれぞれについて行いその平均で評価する。

5. 1 2 光溶血度の算出

溶血度の差(L;%)

$$= \text{照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血平均}} - \text{OD}_{\text{無添加対照平均}})] \\ - \text{非照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血平均}} - \text{OD}_{\text{無添加対照平均}})]$$

6 評価

以下の評価基準に従い、評価を行う。

溶血度の差(L;%)	光毒性の評価	
L < 5	-	光毒性なしと評価
5 ≤ L < 10	±	更なる評価が必要
10 ≤ L	+	光毒性ありと評価

ただし、540nm に吸収を持つ検体の場合の評価には補正を行った上での評価が必要と考えられる。

7 被験物質の保管場所

被験物質は、試薬保管庫、試薬保管用冷蔵庫、試薬保管用冷凍庫、試薬保管用デシケーター、試薬保管用冷蔵庫内デシケーターのいずれかに保管する。

8 保守・点検

紫外線強度計は、1年に1度校正を行う。校正は、㈱トプコン(TEL:03-5684-2311)に依頼する。

照射装置を使用する際、フィルター部分に汚れがないことを確認する。

9 記録の保管

以下の試験記録は、記録保管場所に保管する。

①赤血球光溶血試験条件等記録

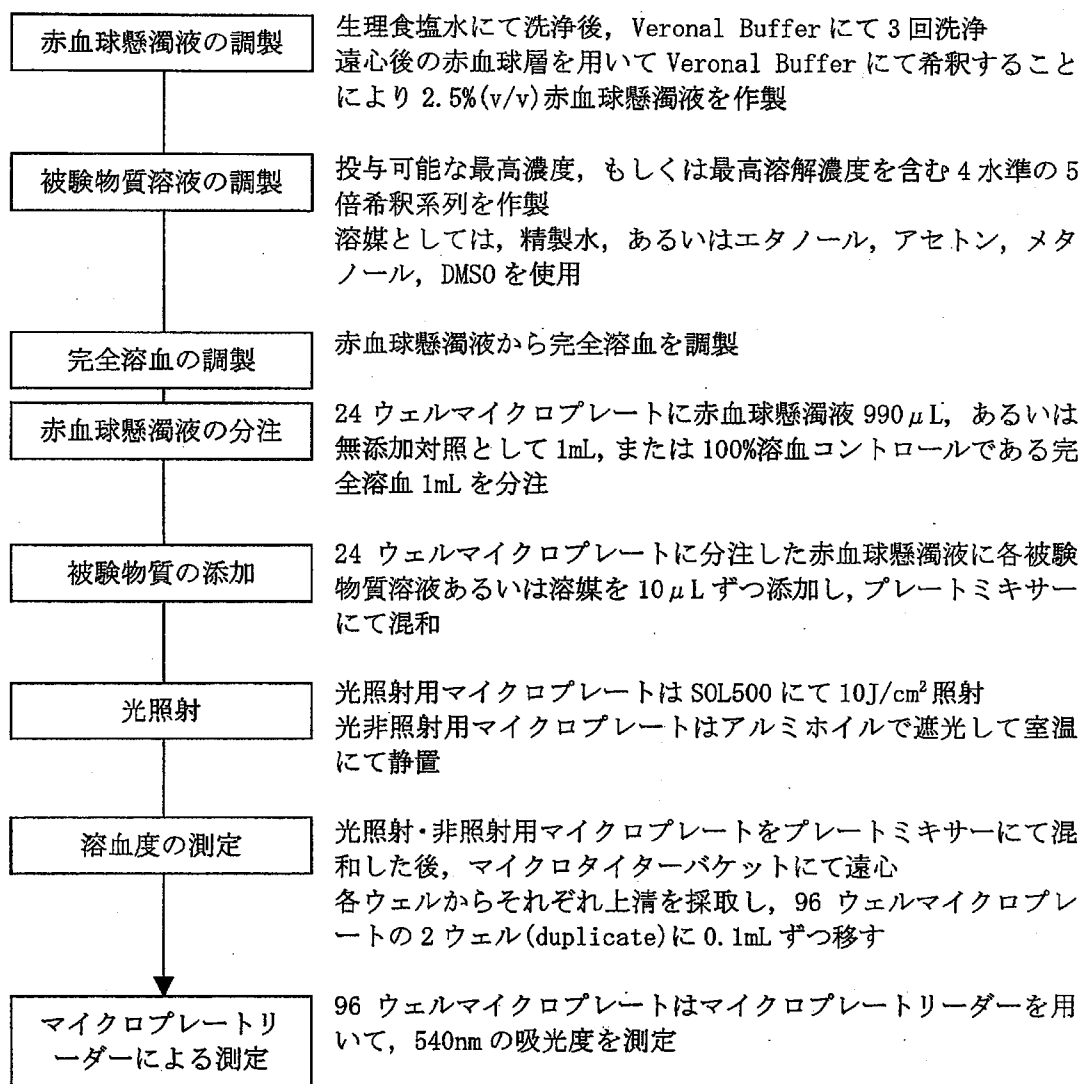
- ②試薬・被験物質管理記録
- ③注射用水・生理食塩液管理記録
- ④赤血球光溶血試験判定記録
- ⑤Veronal Buffer 作製・使用記録
- ⑥血液管理記録
- ⑦太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑧紫外線強度計使用記録

10 参考文献

- 1) Sugiyama M. *et al.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals: (I) Red Blood Cell Hemolysis Assay. AATEX 2, 183-191.
- 2) Sugiyama M. *et al.* (1994) Photohemolysis Test and Yeast Growth Inhibition Assay to Assess Phototoxic Potential of Chemicals. Alternative Methods In Toxicology Vol.10 In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Rougier A *et al.* (ed.) Marry Ann Libert, Inc., New York, 213-221.
- 3) 杉山真理子ら, 日本動物実験代替法学会 第5回大会要旨集(秦野) p110-111(1991).
- 4) Sugiyama M. *et al.* (2002) A Strategic Approach for Predicting Phototoxicity of Cosmetic Ingredients. AATEX 9, 29-39.
- 5) Mori M. *et al.* (2003). Effects of light sources on the prediction of phototoxicity by the yeast growth inhibition phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay, submitted.

以上

赤血球光溶血試験フローチャート



被験物質リスト

1:規格等

名称	供給者*1	Lot. No	純度・規格*2
香料(8)			
Musk Ambrette	8	LG85	-
Musk Ketone	8	JAN0102	99%≦
Musk Xylene	8	JAN0102	-
Phantolid	9	9162	95%≦
Galaxolide(50% in diethyl phthalate)	10	MMF3139	50%
8-Methoxy Psoralen(8-MOP)	1	MOB1369	99%(GC)
5-Methoxy Psoralen(5-MOP)	3	16212DU	99%
6-Methyl Coumarin(6-MC)	4	TCR3659	97%≦(GC)
紫外線吸収剤(5)			
4-5-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane(Parsol 1789)	11	9000430543	99%≦
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate(Parsol MCX)	11	900043609	98%≦
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone(ASL-24)	12	1981	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid(ASL-24S)	12	1955	-
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate(Escalol 507)	13	802192	98%≦
薬剤(4)			
Sulfanilamide	1	M1R9306	99.7%(T)
Indomethacin	2	61K1368	99%≦(TLC)
Piroxicam	2	126H0820	-
Chlorpromazine HCl(CPZ)	1	M9M3389	特級
抗生物質(4)			
3,4,4'-Trichlorocarbanilide(TCC)	3	04114LZ	99%
Bithionol	2	119H1503	99%≦
3,5,4'-Tribromosalicylanilide(TBS)	5	AP01	98%<(T)
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	6	A009656801	98.5%<(UV-VIS)
染料(3)			
Rose Bengal	7	SEPT2001	-
Acridine	2	124H2511	-
Anthracene	1	M1E6969	99%(GC)

*1

- 1: ナカライテスク株式会社
- 2: Sigma Chemical Co.
- 3: Aldrich Chemical Company, Inc.
- 4: 和光純薬工業株式会社
- 5: 東京化成工業株式会社
- 6: Acros Organics N.V.
- 7: Chroma-Gesellschaft mbH & Co.
- 8: GIVAUDAN S. A.
- 9: PFW Aromachemicals B.V.
- 10: International Flavors&Fragrances
- 11: ロシュ・ビタミン・ジャパン株式会社
- 12: 湘南化学工業株式会社
- 13: 太陽化学株式会社

*2

- TLC: 薄層クロマトグラフィー
T: 容量分析
GC: ガスクロマトグラフィー

被験物質リスト
2: 特性等

名称	CAS number	分子量	組成式	融点	性状	溶解性
香料 (8)						
Musk Ambrette	83-66-9	268.3	C13H16N2O5	84-86	黄色粉末状結晶	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
Musk Ketone	81-14-1	294.3	C14H18N2O5	134.5-136.5	白色微細結晶	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
Musk Xylene	81-15-2	297.3	C12H15N3O6	114	白色微細結晶	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
Phantolid	15323-35-0	244.4	C17H24O	35-40	白色微細結晶	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
Galaxolide (50% in diethyl phthalate)	1222-05-5	258.4	C18H26O	148	無色透明液体	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
8-Methoxy Psoralen (8-MOP)	298-81-7	216.2	C12H8O4	191-193	微黄白色微細針状結晶	エタノールに可溶
5-Methoxy Psoralen (5-MOP)	484-20-8	216.2	C12H8O4	74-77	白色針状結晶	エタノールに可溶
6-Methyl Coumarin (6-MC)	92-48-8	160.2	C10H8O2		白色微細結晶	水に難溶, エタノールに可溶
紫外線吸収剤 (5)						
4-5-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (Parsol 1789)	70356-09-1	310.4	C20H22O3	81-84	薄褐色粉末	水に難溶, 油に可溶
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	5466-77-3	290.4	C18H26O3	<-25	無色透明液体	エタノールに可溶
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (ASL-24)	131-57-5	228.2	C14H12O3	60-66	薄黄色微細結晶	有機溶媒に可溶
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (ASL-24S)	4065-45-6	308.4	C14H12O6S	108	薄黄色粉末	水・エタノールに可溶
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (Escalol 507 (D))	21245-02-3	277.4	C17H27N02		薄黄色液体	水に難溶, 有機溶媒に可溶
薬剤 (4)						
Sulfanilamide	63-74-1	172.2	C6H8N2O2S	165-166	白色粉末	エタノールに可溶
Indomethacin	53-86-1	357.8	C19H16ClN04	155	白色微細結晶	エタノールに可溶
Piroxicam	36322-90-4	331.3	C15H13N3O4S	201	白色微細粉末	エタノールに可溶
Chlorpromazine HCl (CPZ)	69-09-0	355.3	C17H19ClN2S·HCl	194-198	白色粉末	水・エタノールに可溶
抗生物質 (4)						
3, 4, 4'-Trichlorocarbanilide (TCC)	101-20-2	315.6	C13H9Cl3N2O	254-256	白色粉末	水に難溶, 有機溶媒に可溶
Bithionol	97-18-7	356.1	C12H6Cl4O2S	185.5-186.5	白色粉末	水に難溶, 有機溶媒に可溶
3, 5, 4'-Tribromosalicylanilide (TBS)	87-10-5	449.9	C13H8Br3NO2	227-228	薄褐色粉末	水に難溶, 有機溶媒に可溶
3, 3', 4', 5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	1154-59-2	351.0	C13H7Cl4NO2	162	白色粉末	水に難溶, 有機溶媒に可溶
染料 (3)						
Rose Bengal	632-69-9	1017.6	C20H2Cl4I4Na2O5	300<	赤色粉末	水・エタノールに可溶
Acridine	260-94-6	179.2	C13H9N	107-110	薄黄色微細結晶	水に難溶, 有機溶媒に可溶
Anthracene	120-12-7	178.2	C14H10	216-218	白色薄片	水に難溶, 有機溶媒に可溶

被験物質の *in vivo* 試験結果

被験物質	溶媒	<i>in vivo</i> 誘発濃度 (%)	評価点	判定*
Musk Ambrette	Diethyl phthalate	20	0.0	-
Musk Ketone	Diethyl phthalate	20	0.0	-
Musk Xylene	Diethyl phthalate	20	0.0	-
Phantolid	Diethyl phthalate	20	2.0	+
Galaxolide (50% in diethyl phthalate)	Ethanol	70	1.4	+
8-Methoxy psoralen (8-MOP)	Ethanol	0.02	4.8	+
5-Methoxy psoralen (5-MOP)	Ethanol	0.025	2.7	+
6-Methyl coumarin (6-MC)	Ethanol	1	0.0	-
4-t-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (Parsol 1789)	castor oil	10	0.0	-
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	Ethanol	20	0.0	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (ASL-24)	Acetone	10	0.0	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (ASL-24S)	Water	10	0.0	-
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (Escalol 507 (D))	Ethanol	20	1.0	±
Sulfanilamide	Methanol	20	0.0	-
Indomethacin	Ethanol	1	0.0	-
Piroxicam	Ethanol	5	0.0	-
Chlorpromazine HCl (CPZ)	Water	50	1.6	+
3,4,4'-Trichlorocarbaniilide (TCC)	DPG	5	0.0	-
Bithionol	Acetone	1	0.0	-
3,4',5-Tribromosalicylanilide (TBS)	Acetone	1	0.0	-
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	Acetone	1	1.5	+
Rose Bengal	Water	1	0.0	-
Acridine	Acetone	1	2.1	+
Anthracene	Acetone	0.5	1.8	+

*: 判定; 評価点 0.0~0.5:-, 0.6~1.2:±, 1.3≤:+

被験物質の *in vitro* 試験結果

被験物質	<i>in vitro</i>		Battery system	<i>in vivo</i> モルモット
	酵母光生育阻害試験	赤血球光溶解試験		
Musk Ambrette	-	-	-	-
Musk Ketone	-	-	-	-
Musk Xylene	-	-	-	-
Phantolid	+	+	+	+
Galaxolide(50% in diethyl phthalate)	-	+	+	+
8-Methoxypsoralen(8-MOP)	+	-	+	+
5-Methoxypsoralen(5-MOP)	+	-	+	+
6-Methylcoumarin(6-MC)	+	+	+	+
4-t-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (Parsol 1789)	-	-	-	-
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	-	-	-	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (ASL-24)	-	-	-	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid. (ASL-24S)	-	-	-	-
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate(Escalol 507(D))	+	-	+	+
Sulfanilamide	-	-	-	-
Indomethacin	-	-	-	-
Piroxicam	-	-	-	-
Chlorpromazine HCl (CPZ)	-	+	+	+
3, 4, 4'-Trichlorocarbaniilide (TCC)	-	-	-	-
Bithionol	-	+	+	-
3, 4', 5-Tribromosalicylanilide (TBS)	-	+	+	-
3, 3', 4', 5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	+	+	+	+
Rose Bengal	+	+	+	-
Acridine	+	+	+	+
Anthracene	+	±	+	+
<i>in vivo</i> 試験との一致率 (%)				81
<i>in vitro</i>				71
81				81

酵母光生育阻害試験結果のまとめ

被験物質名	濃度 (mg/mL)	1回目		2回目		3回目		4回目		平均	今回 総合評価
		阻止帯の 差(mm)	評価	阻止帯の 差(mm)	評価	阻止帯の 差(mm)	評価	阻止帯の 差(mm)	評価	阻止帯の 差(mm)	
Musk Ambrette	500	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.6	+	9.0	+	6.4	+	6.3	+	7.6	
Musk Ketone	300	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	60	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	12	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	2.4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.8	+	8.5	+	6.4	+	6.6	+	7.6	
Musk Xylene	300	2.4	-	2.9	-	1.9	-	2.0	-	2.3	-
	60	2.9	-	3.1	-	2.5	-	2.4	-	2.7	
	12	3.7	-	3.2	-	3.1	-	2.8	-	3.2	
	2.4	4.5	-	3.1	-	3.1	-	3.4	-	3.5	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	7.9	+	7.4	+	5.3	+	5.3	+	6.5	
Phantolid	500	4.5	-	4.0	-	4.6	-	5.2	+	4.6	+
	100	6.0	+	6.4	+	6.3	+	6.5	+	6.3	
	20	6.6	+	7.4	+	7.1	+	6.3	+	6.9	
	4	6.9	+	6.8	+	0	-	7.1	+	5.2	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	9.8	+	7.8	+	8.4	+	8.0	+	8.5	
Galaxolide	原体	5.1	+	4.7	-	2.9	-	4.9	-	4.4	-
	200	4.7	-	4.5	-	2.9	-	2.9	-	3.8	
	40	4.1	-	4.0	-	2.5	-	2.1	-	3.2	
	8	3.8	-	3.0	-	2.6	-	3.1	-	3.1	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	9.5	+	8.9	+	8.2	+	7.3	+	8.5	
8-MOP	10	14.1	+	14.3	+	12.8	+	13.5	+	13.7	+
	2	13.2	+	13.4	+	15.6	+	15.6	+	14.5	
	0.4	11.2	+	10.9	+	10.2	+	9.9	+	10.6	
	0.08	8.4	+	8.6	+	7.6	+	8.3	+	8.2	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.9	+	9.2	+	7.4	+	7.3	+	8.2	
5-MOP	10	12.4	+	11.8	+	9.3	+	11.1	+	11.2	+
	2	12.2	+	11.8	+	10.1	+	10.3	+	11.1	
	0.4	12.0	+	11.8	+	9.3	+	9.8	+	10.7	
	0.08	9.1	+	9.2	+	7.9	+	8.8	+	8.8	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.5	+	8.4	+	7.7	+	6.6	+	7.8	
6-MC	100	5.7	+	5.0	+	4.7	-	6.6	+	5.5	+
	20	5.1	+	4.9	-	5.6	+	5.1	+	5.2	
	4	4.5	-	4.5	-	5.4	+	3.1	-	4.4	
	0.8	1.1	-	0.9	-	0	-	0	-	0.5	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.1	+	8.4	+	8.2	+	6.8	+	7.9	
Parsol 1789	100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	0.8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	9.4	+	9.4	+	7.9	+	8.2	+	8.7	
Parsol MCX	原体	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	200	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	10.9	+	10.9	+	7.1	+	6.8	+	8.9	
ASL-24	50	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	0.4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	9.7	+	9.3	+	7.6	+	6.9	+	8.4	
ASL-24S	50	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	0.4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	注射用水	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	6.7	+	6.9	+	7.0	+	7.0	+	6.9	

Escalol 507	原体	5.6	+	5.0	+	5.7	+	6.6	+	5.7	+	+
	200	4.3	-	4.2	-	2.9	-	4.3	-	3.9	-	
	40	3.7	-	3.8	-	2.5	-	3.0	-	3.3	-	
	8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	6.3	+	6.4	+	6.1	+	6.2	+	6.3	+	
Sulfanilamide	50	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
	10	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Methanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.1	+	7.2	+	7.0	+	6.4	+	7.2	+	
Indomethacin	10	4.8	-	5.3	+	4.6	-	4.9	-	4.9	-	-
	2	4.7	-	4.6	-	4.5	-	4.3	-	4.5	-	
	0.4	4.4	-	3.7	-	3.7	-	2.2	-	3.5	-	
	0.08	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	9.6	+	10.0	+	7.6	+	6.4	+	8.4	+	
Piroxicam	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.16	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.8	+	9.1	+	6.6	+	5.7	+	7.6	+	
CPZ	50	0.5	-	0.4	-	0.3	-	0.9	-	0.5	-	-
	10	3.2	-	2.9	-	2.5	-	2.8	-	2.9	-	
	2	5.3	+	5.3	+	4.2	-	3.6	-	4.6	-	
	0.4	3.1	-	3.5	-	1.7	-	2.6	-	2.7	-	
	注射用水	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	9.1	+	8.1	+	6.4	+	6.0	+	7.4	+	
TOC	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.16	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	5.1	+	6.0	+	5.6	+	5.2	+	5.5	+	
Bithionol	200	3.6	-	3.5	-	2.5	-	2.2	-	3.0	-	-
	40	3.9	-	3.6	-	2.5	-	3.0	-	3.3	-	
	8	4.3	-	3.3	-	2.6	-	2.1	-	3.1	-	
	1.6	4.7	-	3.9	-	2.3	-	3.6	-	3.6	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.0	+	8.1	+	9.0	+	7.5	+	8.2	+	
TBS	50	5.1	+	4.9	-	3.2	-	3.9	-	4.3	-	-
	10	4.6	-	3.9	-	3.6	-	3.7	-	4.0	-	
	2	4.3	-	3.2	-	4.0	-	3.4	-	3.7	-	
	0.4	3.7	-	3.4	-	2.7	-	3.5	-	3.3	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.5	+	7.2	+	7.2	+	7.1	+	7.5	+	
TCSA	50	6.7	+	7.0	+	4.9	-	5.7	+	6.1	+	+
	10	6.2	+	6.3	+	5.7	+	5.2	+	5.9	+	
	2	5.8	+	5.4	+	5.9	+	4.4	-	5.4	+	
	0.4	5.1	+	5.3	+	3.8	-	4.6	-	4.7	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.2	+	8.1	+	8.8	+	6.3	+	7.9	+	
Rose Bengale	10	11.3	+	11.2	+	12.2	+	12.5	+	11.8	+	+
	2	8.6	+	9.0	+	9.9	+	10.5	+	9.5	+	
	0.4	5.2	+	5.9	+	6.7	+	4.9	-	5.7	+	
	0.08	4.7	-	4.8	-	3.4	-	5.1	+	4.5	-	
	DMSO	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	6.8	+	7.8	+	6.2	+	6.3	+	6.8	+	
Acridine	100	5.7	+	5.4	+	4.0	-	5.9	+	5.3	+	+
	20	4.4	-	6.5	+	5.4	+	5.2	+	5.4	+	
	4	6.1	+	7.3	+	6.9	+	6.2	+	6.6	+	
	0.8	6.3	+	6.0	+	5.1	+	5.7	+	5.8	+	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	6.0	+	6.3	+	7.0	+	6.8	+	6.5	+	
Anthracene	10	5.5	+	4.8	-	3.2	-	6.2	+	4.9	-	+
	2	5.4	+	5.5	+	4.6	-	4.5	-	5.0	+	
	0.4	4.7	-	4.5	-	5.3	+	4.3	-	4.7	-	
	0.08	4.9	-	5.2	+	4.4	-	5.0	+	4.9	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	5.5	+	5.5	+	6.1	+	5.9	+	5.8	+	

陽性対照には、0.1mg/mL 8-MOPを用いた。阻止帯5 mm以上で陽性(+)とした。

赤血球光溶血試験結果のまとめ

各被験物質における生データ

香料(8)	最終濃度	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
Musk Ambrette	5000 μ g/mL	-1.5	-0.2	-0.2	-0.6	0.8
	1000 μ g/mL	-0.3	1.0	1.9	0.9	1.1
	200 μ g/mL	0.5	1.1	2.7	1.4	1.2
	40 μ g/mL	0.7	1.9	3.1	1.9	1.2
Musk Ketone	5000 μ g/mL	-0.4	-0.9	-0.5	-0.6	0.3
	1000 μ g/mL	-0.4	-2.6	-1.1	-1.4	1.2
	200 μ g/mL	-0.2	-0.3	-0.1	-0.2	0.1
	40 μ g/mL	0.2	-0.2	0.1	0.0	0.2
Musk Xylene	3000 μ g/mL	-0.3	-2.8	-4.4	-2.5	2.0
	600 μ g/mL	-0.1	0.0	0.2	0.1	0.1
	120 μ g/mL	0.4	-0.2	0.3	0.2	0.3
	24 μ g/mL	0.4	0.3	-0.1	0.2	0.3
Phantolid	5000 μ g/mL	6.2	2.6	2.2	3.7	2.2
	1000 μ g/mL	93.9	75.8	95.2	88.3	10.8
	200 μ g/mL	96.4	85.4	99.3	93.7	7.4
	40 μ g/mL	96.6	29.3	96.6	74.2	38.9
Galaxolide(50% in diethyl phthalate)	1%	-0.8	1.0	1.9	0.7	1.4
	20000 μ g/mL	13.5	5.7	3.7	7.6	5.2
	4000 μ g/mL	95.4	25.3	45.5	55.4	36.1
	800 μ g/mL	96.2	11.3	43.5	50.3	42.8
8-Methoxypsoralen(8-MOP)	100 μ g/mL	0.0	-0.5	-0.5	-0.3	0.3
	20 μ g/mL	-0.4	-0.1	-0.1	-0.2	0.2
	4 μ g/mL	0.0	-0.3	-0.2	-0.2	0.1
	0.8 μ g/mL	0.1	-0.3	-0.9	-0.4	0.5
5-Methoxypsoralen(5-MOP)	100 μ g/mL	0.1	-0.1	-0.5	-0.2	0.3
	20 μ g/mL	-0.3	-0.3	-0.1	-0.2	0.1
	4 μ g/mL	0.0	-0.2	-0.2	-0.1	0.1
	0.8 μ g/mL	0.1	-0.6	-0.1	-0.2	0.4
6-Methylcoumarin(6-MC)	1000 μ g/mL	18.1	24.5	17.1	19.9	4.0
	200 μ g/mL	-1.0	-0.9	-0.5	-0.8	0.3
	40 μ g/mL	-0.4	-0.6	-0.3	-0.4	0.1
	8 μ g/mL	-0.1	-0.2	0.0	-0.1	0.1
紫外線吸収剤(5)		1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
4-5-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (Parsol 1789)	200 μ g/mL	-0.1	0.2	-0.8	-0.2	0.5
	40 μ g/mL	0.0	0.2	-0.8	-0.2	0.5
	8 μ g/mL	0.0	0.3	-1.0	-0.3	0.7
	1.6 μ g/mL	0.3	0.2	-1.1	-0.2	0.8
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	1%	0.0	0.2	-0.1	0.0	0.2
	20000 μ g/mL	-0.2	0.3	0.1	0.0	0.2
	4000 μ g/mL	1.3	0.7	-0.2	0.6	0.8
	800 μ g/mL	-1.1	0.6	0.6	0.0	1.0
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (ASL-24)	500 μ g/mL	3.9	3.0	2.7	3.2	0.6
	100 μ g/mL	2.8	3.5	3.7	3.3	0.5
	20 μ g/mL	-0.1	-0.7	0.2	-0.2	0.5
	4 μ g/mL	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.0
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid(ASL-24S)	500 μ g/mL	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1
	100 μ g/mL	0.0	0.1	-0.2	0.0	0.1
	20 μ g/mL	0.2	-0.4	0.0	-0.1	0.3
	4 μ g/mL	0.1	0.1	-0.4	-0.1	0.2
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (Escalol 507 (D))	1%	0.1	-0.1	-0.3	-0.1	0.2
	20000 μ g/mL	-0.3	-0.3	-0.2	-0.3	0.1
	4000 μ g/mL	3.0	3.5	1.7	2.7	0.9
	800 μ g/mL	2.4	3.7	1.2	2.4	1.3
薬剤(4)		1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
Sulfanilamide	500 μ g/mL	-0.2	-0.6	-0.3	-0.4	0.2
	100 μ g/mL	-0.1	-0.3	-0.3	-0.2	0.1
	20 μ g/mL	0.0	-0.3	-0.2	-0.2	0.1
	4 μ g/mL	0.1	-0.3	-0.2	-0.1	0.2
Indomethacin	100 μ g/mL	-0.3	1.2	0.0	0.3	0.8
	20 μ g/mL	-0.1	1.1	-0.1	0.3	0.7
	4 μ g/mL	0.2	1.3	-0.1	0.5	0.8
	0.8 μ g/mL	0.0	1.1	-0.1	0.3	0.6
Piroxicam	200 μ g/mL	-0.6	-0.9	-0.9	-0.8	0.2
	40 μ g/mL	-0.3	-0.4	-0.7	-0.4	0.2
	8 μ g/mL	-0.3	-0.1	-0.5	-0.3	0.2
	1.6 μ g/mL	-0.1	0.0	-0.4	-0.2	0.2
Chlorpromazine HCl (CPZ)	500 μ g/mL	-37.3	-30.0	-22.6	-30.0	7.4
	100 μ g/mL	11.6	20.6	13.2	15.1	4.8
	20 μ g/mL	-0.2	-0.3	0.9	0.2	0.7
	4 μ g/mL	-0.4	-0.6	-0.5	-0.5	0.1

各被験物質における生データ(続き)						
抗生物質(4)	最終濃度	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
3,4,4'-Trichlorocarbanilide(TCC)	200 μ g/mL	0.4	2.3	1.8	1.5	1.0
	40 μ g/mL	0.3	0.4	0.6	0.4	0.1
	8 μ g/mL	-0.8	1.1	1.5	0.6	1.2
	1.6 μ g/mL	0.2	0.5	0.4	0.4	0.2
Bithionol	2000 μ g/mL	-3.1	4.7	48.8	16.8	28.0
	400 μ g/mL	-14.0	-19.5	6.7	-8.9	13.8
	80 μ g/mL	-6.9	3.7	41.9	12.9	25.6
	16 μ g/mL	-14.5	34.1	18.6	22.4	10.4
3,5,4'-Tribromosalicylanilide(TBS)	500 μ g/mL	16.7	56.2	17.3	30.1	22.6
	100 μ g/mL	-1.5	-0.1	0.0	-0.6	0.8
	20 μ g/mL	-0.6	-0.6	-0.2	-0.5	0.2
	4 μ g/mL	-0.2	-0.2	-0.1	-0.2	0.0
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	500 μ g/mL	29.1	53.2	18.7	33.7	17.7
	100 μ g/mL	4.5	3.9	3.2	3.9	0.7
	20 μ g/mL	1.7	3.3	1.0	2.0	1.2
	4 μ g/mL	0.2	0.0	-0.5	-0.1	0.3
染料(3)		1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
Rose Bengal	100 μ g/mL	27.1	37.5	33.1	32.6	5.2
	20 μ g/mL	46.0	60.6	48.6	51.7	7.8
	4 μ g/mL	51.6	76.0	53.0	60.2	13.7
	0.8 μ g/mL	41.5	48.8	32.4	40.9	8.2
Acridine	1000 μ g/mL	73.4	77.7	53.7	68.3	12.8
	200 μ g/mL	80.0	81.4	65.4	75.6	8.9
	40 μ g/mL	15.3	12.3	11.9	13.1	1.9
	8 μ g/mL	6.6	4.6	5.2	5.5	1.0
Anthracene	100 μ g/mL	4.0	2.9	2.9	3.2	0.6
	20 μ g/mL	3.2	2.2	2.3	2.6	0.6
	4 μ g/mL	3.2	0.2	1.7	1.7	1.5
	0.8 μ g/mL	6.4	5.4	5.3	5.7	0.6

1) Battery systemにおける感度, 特異性, 予測性, 一致率

Parameter*	
感度	100%
特異性	73%
予測性(+)	69%
予測性(-)	100%
一致率	81%
偽陰性	なし

*: Balls *et al.*, (1990)

Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. ATLA, 18, 313-337

1) Battery systemの特徴 (適用範囲, 偽陽性, 偽陰性)

<i>in vivo</i> Battery system	+	±	-
+	TCSA Acridine CPZ 5-MOP	Escalol 507 (D)	Bithionol TBS 6-MC Rose Bengal
	8 化学物質	1 化学物質	4 化学物質
±	なし	なし	なし
-	なし	なし	TCC ASL-24 Sulfanilamide ASL-24S Indomethacin Musk Ambrette Piroxicam Musk Ketone Parsol 1789 Musk Xylene Parsol MCX
	なし	なし	1 1 化学物質

2) 酵母光生育阻害試験における感度, 特異性, 予測性, 一致率

Parameter*	
感度	78%
特異性	87%
予測性(+)	78%
予測性(-)	87%
一致率	81%
偽陰性	Galaxolide CPZ

*: Balls *et al.*, (1990)

Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. ATLA, 18, 313-337

2) 酵母光生育阻害試験法の特徴 (適用範囲, 偽陽性, 偽陰性)

<i>in vivo</i> 酵母光生育阻害試験	+	±	-
+	Phantolid 5-MOP Acridine	Escalol 507 (D)	6-MC Rose Bengal
	6 化学物質	1 化学物質	2 化学物質
-	Galaxolide CPZ	なし	Musk Ambrette Musk Xylene Parsol MCX ASL-24S Indomethacin TCC TBS Musk Ketone Parsol 1789 ASL-24 Sulfanilamide Piroxicam Bithionol
	2 化学物質	なし	1 3 化学物質

3) 赤血球光溶血試験における感度, 特異性, 予測性, 一致率

Parameter*	
感度	67%
特異性	73%
予測性(+)	60%
予測性(-)	79%
一致率	71%
偽陰性	8-MOP
	5-MOP

*: Balls *et al.*, (1990)

Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. ATLA, 18, 313-337

3) 赤血球光溶解試験法の特徴 (適用範囲, 偽陽性, 偽陰性)

<i>in vivo</i> 赤血球光溶解試験	+	±	-
+	TCSA Acridine CPZ Phantolid Galaxolide 5 化学物質	±	Bithionol TBS 6-MC Rose Bengal 4 化学物質
±	Anthracene 1 化学物質	なし	なし
-	8-MOP 5-MOP 2 化学物質	Escalol 507(D) 1 化学物質	TCC ASL-24 ASL-24S Sulfanilamide Musk Ambrette Indomethacin Musk Ketone Piroxicam Musk Xylene Parsol 1789 Parsol MCX 1 1 化学物質

酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の再現性について

今回、提案する酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の組合せによる光毒性評価方法は、弊社が独自に開発した方法のため施設間バリデーションは実施していない。しかし、弊社では、本評価法については、施設内の評価を終え、化粧品原料の日常保証に活用している。ただし、本評価法の施設内再現性を示すデータについて、過去からの実績をしめすことは検討した開発原料の関係もあり非常に困難である。

よって、今回の酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験における個々の陽性対照物質の値から、施設内再現性を説明する。

1) 酵母光生育阻害試験における陽性対照物質の再現性

陽性対照物質：0.01%8-MOP エタノール溶液

酵母光生育阻害試験においては、被験物質毎に陽性対照物質を置く試験系であり、1被験物質につき4回の試験を行っているため、24被験物質では計96の結果が得られている。各被験物質の阻止帯の平均径(mm)の平均は7.5(5.5~8.9)、標準偏差の平均は1.32(0.13~2.28)、変動係数の平均は0.176(0.021~0.220)であった。この値は、眼刺激性試験代替法の開発を目的とした厚生科学研究班のバリデーションにおける血清培地を用いる4種細胞毒性試験の変動係数の平均が0.292(0.239~0.324)であることを考慮すると、¹⁾本試験法の再現性は高いものと考えられる。(詳細は別紙参照)

2) 赤血球光溶血試験における陽性対照物質の再現性

陽性対照物質：Acridine(8, 40, 200, 1000 $\mu\text{g/mL}$)

赤血球光溶血試験においては、試験実施日毎に陽性対照物質(4濃度)を置く試験系であり、27回の試験実施のため濃度毎に27の結果が得られている。各濃度における変動係数は、0.304(8 $\mu\text{g/mL}$)、0.203(40 $\mu\text{g/mL}$)、0.285(200 $\mu\text{g/mL}$)、0.247(1000 $\mu\text{g/mL}$)、さらにその平均は0.260であった。本試験法も上記厚生科学研究班の4種細胞毒性試験の変動係数の値と同等以上であり、本試験法の再現性は高いものと考えられる。(詳細は別紙参照)

参考文献

1. Y. Ohno, et al., Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize score for the evaluation of the test, *Toxicology in Vitro*, 13, 73-98 (1999).

1) 酵母光生育阻害試験における陽性対照物質 (8-MOP, 0.01%エタノール溶液) による評価結果の再現性

被験物質	1回目	2回目	3回目	4回目	阻止帯 (mm) の平均	標準偏差	変動係数
Musk Ambrette	8.6	9.0	6.4	6.3	7.6	1.42	0.188
Musk Ketone	8.8	8.5	6.4	6.6	7.6	1.25	0.165
Musk Xylene	7.9	7.4	5.3	5.3	6.5	1.37	0.212
Phantolid	9.8	7.8	8.4	8.0	8.5	0.90	0.106
Galaxolide	9.5	8.9	8.2	7.3	8.5	0.95	0.112
8-MOP	8.9	9.2	7.4	7.3	8.2	0.99	0.121
5-MOP	8.5	8.4	7.7	6.6	7.8	0.88	0.112
6-MC	8.1	8.4	8.2	6.8	7.9	0.73	0.092
Parsol 1789	9.4	9.4	7.9	8.2	8.7	0.79	0.090
Parsol MCX	10.9	10.9	7.1	6.8	8.9	2.28	0.256
ASL-24	9.7	9.3	7.6	6.9	8.4	1.34	0.160
ASL-24S	6.7	6.9	7.0	7.0	6.9	0.14	0.020
Escalol 507 (D)	6.3	6.4	6.1	6.2	6.3	0.13	0.021
Sulfanilamide	8.1	7.2	7.0	6.4	7.2	0.70	0.098
Indomethacin	9.6	10.0	7.6	6.4	8.4	1.70	0.202
Piroxicam	8.8	9.1	6.6	5.7	7.6	1.66	0.220
CPZ	9.1	8.1	6.4	6.0	7.4	1.45	0.196
TCC	5.1	6.0	5.6	5.2	5.5	0.41	0.075
Bithionol	8.0	8.1	9.0	7.5	8.2	0.62	0.077
TBS	8.5	7.2	7.2	7.1	7.5	0.67	0.089
TCSA	8.2	8.1	8.8	6.3	7.9	1.08	0.137
Rose Bengal	6.8	7.8	6.2	6.3	6.8	0.73	0.108
Acridine	6.0	6.3	7.0	6.8	6.5	0.46	0.070
Anthracene	5.5	5.5	6.1	5.9	5.8	0.30	0.052
阻止帯 (mm) の平均	8.2	8.1	7.1	6.6	7.5		
標準偏差	1.46	1.31	0.98	0.74		1.32	
変動係数	0.178	0.162	0.138	0.112			0.176

2) 赤血球光溶血試験における陽性対照物質 (Acridine) による評価結果の再現性

試験実施日	1000 μ g/mL	200 μ g/mL	40 μ g/mL	8 μ g/mL
2002年9月19日	65.4	64.2	14.6	5.8
2002年9月19日	60.9	65.8	14.7	5.9
2002年9月19日	68.5	73.2	17.1	7.2
2002年9月19日	66.2	68.0	16.8	7.4
2002年9月20日	59.3	69.9	14.5	7.1
2002年9月20日	62.2	71.6	15.3	6.2
2002年9月20日	64.7	68.3	18.4	8.9
2002年9月20日	65.0	70.1	18.3	8.1
2002年9月28日	72.7	78.2	10.4	3.3
2002年9月28日	73.4	79.1	11.5	4.8
2002年9月28日	51.9	64.1	10.0	3.7
2002年9月28日	52.1	58.4	10.1	3.9
2002年9月29日	67.0	76.5	11.6	3.5
2002年9月29日	66.1	74.2	11.7	5.6
2002年9月29日	27.9	25.3	8.6	2.2
2002年9月29日	39.4	29.7	9.4	2.9
2002年9月30日	45.5	50.0	10.8	4.2
2002年9月30日	60.2	61.2	11.5	4.6
2002年9月30日	53.7	65.4	11.9	5.2
2002年9月30日	59.9	60.7	13.4	6.7
2002年10月1日	16.9	17.8	12.1	4.5
2002年10月1日	32.6	23.7	11.9	5.2
2002年10月1日	49.9	56.5	12.5	5.1
2002年10月1日	51.5	46.4	13.3	6.2
2002年10月2日	67.2	71.6	14.3	6.4
2002年10月2日	66.4	66.6	14.2	6.5
2002年10月9日	66.8	66.0	11.5	4.2
溶血度の差の平均	56.8	60.1	13.0	5.4
標準偏差	14.00	17.15	2.63	1.64
変動係数	0.247	0.285	0.203	0.304

