

Fig.1 Working Curves for Sodium Benzoate and Salicylic Acid

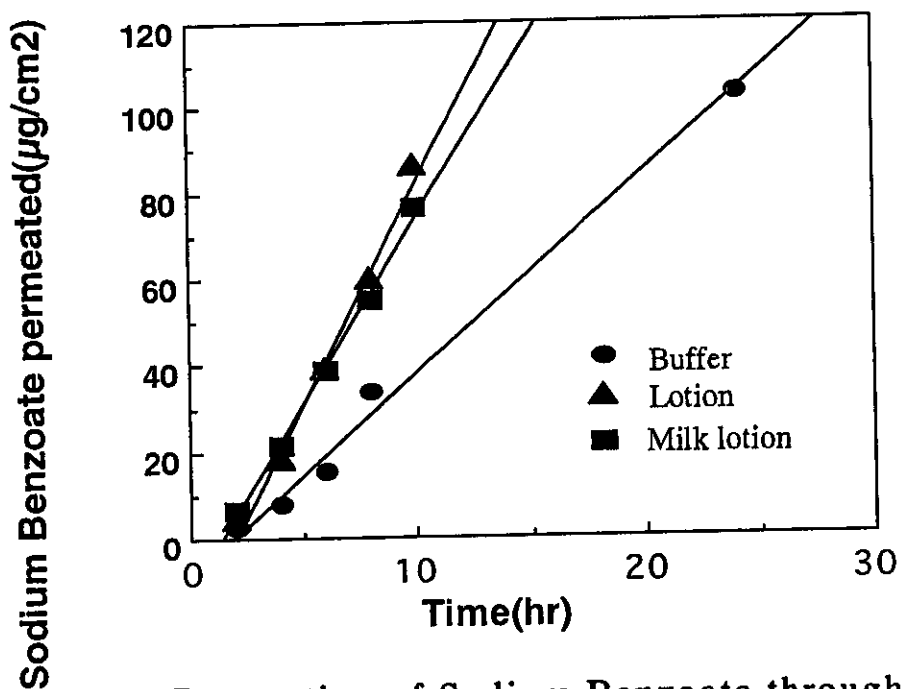


Fig.2 Permeation of Sodium Benzoate through the skin for 2 to 24 hours

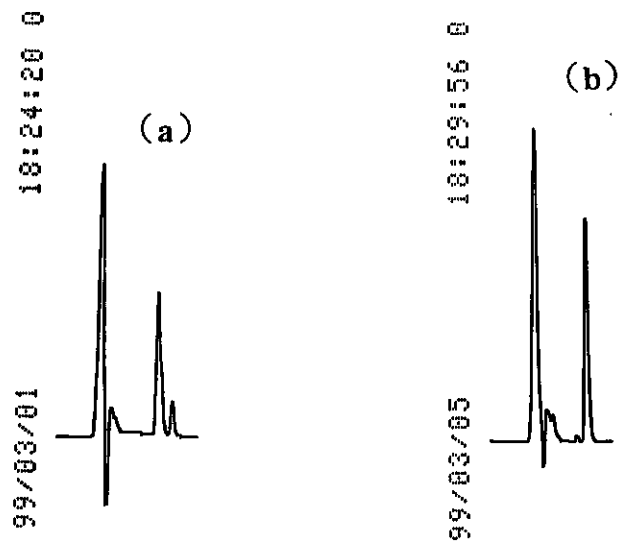


Fig.3 HPLC Chromatograms of Sodium Benzoate permeated for Lotion and Salicylic Acid permeated for Milk Lotion
 (a) Sodium Benzoate, (b) Salicylic Acid

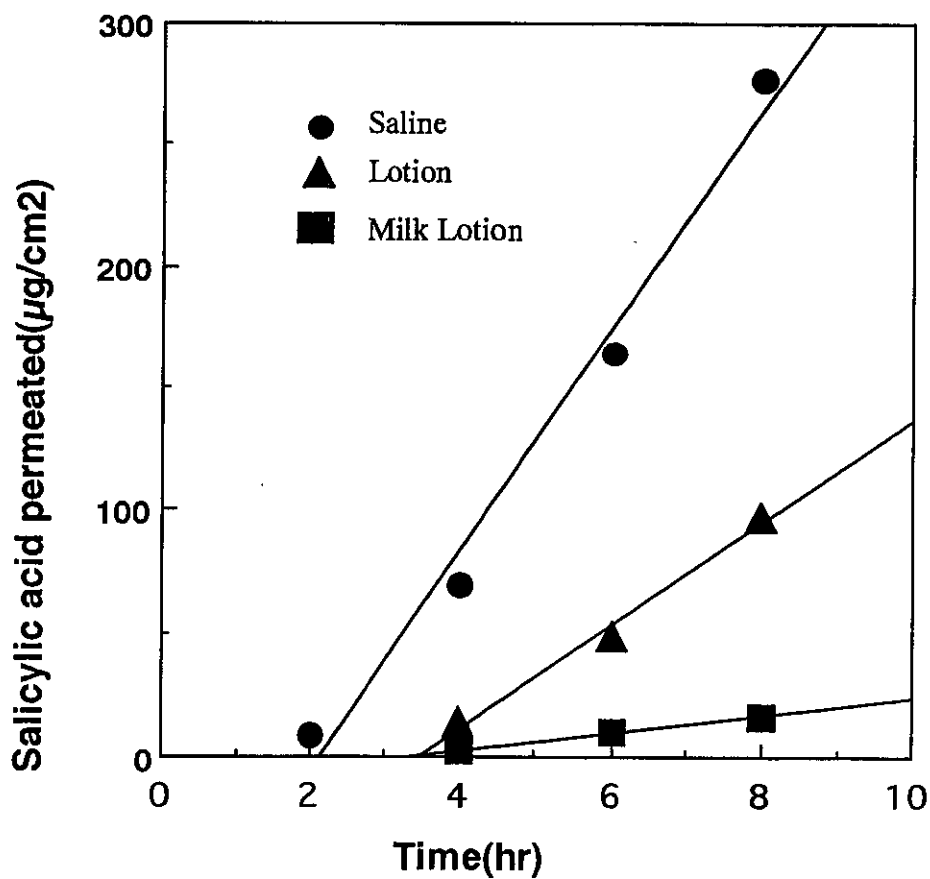


Fig.4 Permeation of Salicylic Acid through the Skin for 2 to 8 hours

Table 1 Flux and Lag Time of Sodium Benzoate and Salicylic Acid through the Guinea-pig Abdominal Skin

	Sodium Benzoate			Salicylic Acid		
	Buffer	Lotion	Milk lotion	Saline	Lotion	Milk lotion
Flux (μ g/cm ² /hr)	4.70 (21.3)	10.22 (17.9)	8.69 (29.1)	44.94 (15.9)	20.89 (24.6)	3.46 (18.1)
Lag time (hr)	1.94 (27.2)	1.91 (14.4)	1.38 (28.9)	2.12 (6.5)	3.51 (6.3)	3.19 (20.4)

(): Relative standard deviation (%)

Table 2 Description of the Method

1. Diffusion cell design	static vertical cell
2. Receptor fluid	1/30M Phosphoric buffer (pH 7.4) saline
3. Skin membrane	guinea-pig excised abdominal skin, full thickness skin
4. Membrane integrity	no
5. Skin metabolism	no
6. Test substance	Sodium benzoate, Salicylic Acid
7. Test preparation	1/30M Phosphate buffer (pH 7.4), saline, cosmetic lotion, milk lotion
8. Test preparation	10mg/mL of Sodium benzoate 1mL 2mg/mL of Salicylic acid 1mL
9. Temperature and humidity	32 °C (incubator)
10. Study time	2-24 hours, 2-8 hours
11. Terminal procedures	no
12. Sampling	200 μ L
13. Analysis	HPLC

In vitro 試験法を用いた化粧品の安全性評価法及び
その国際的ハーモナイゼーションに関する研究
分担研究：化粧品における OECD in vitro 経皮吸収試験法
ガイドライン（案）の予備的検討

研究分担者 森本 雅憲 城西大学薬学部 教授

A. 研究目的

OECD in vitro 経皮吸収試験法ガイドライン（案）は、化学物質の有効性と安全性を評価するための試験法であることに加え、最小限度の in vivo 経皮吸収試験法の実施に留めるために、経皮吸収に関連した in vivo で起こりえる様々なプロセスを可能な限り予測できるような試験法として提案された。試験法の対象となる化学物質には、医薬品をはじめ、化粧品、製剤原料を含む添加物、あるいは毒性物質等がある。このうち、化粧品や添加物等は、その目的上、安全性の確認を重視した試験法であるべきである。

本年はこのことを踏まえ、抗菌剤である安息香酸ナトリウムとパラベンメチルの経皮吸収を OECD in vitro 経皮吸収試験法ガイドライン（案）に沿って評価し、化粧品や添加物等の試験法として有用であるかを評価した。

B. 研究方法

1. In vitro 経皮吸収試験

(1) 安息香酸ナトリウム

雄性ヘアレスラットを麻酔後、1匹のヘアレスラットの腹部から3枚の皮膚を摘出し、透過試験に供した。摘出した皮膚を横型の2-チャンバー拡散セル(有効透過面積:0.95 cm²)に挟んだ。試験(試料)溶液は、安息香酸ナトリウムの最大使用濃度である 10 mg/mL (1.0%) とした。拡散セルのドナー側にこの試験溶液を、レセプター側に M/30 リン酸緩衝液 (pH 7.4) を入れ、透過実験を行った。試験温度は皮膚温度である 32℃で行い終始この温度を保持した。サンプリングの際には

シンク条件を保つため採取した量と等量の緩衝液を加えた。安息香酸ナトリウムの測定には HPLC を用いた。以下に主な透過実験条件、安息香酸ナトリウムの測定条件を示す。

実験条件

動物：ヘアレスラット

皮膚摘出部位：腹部

セル：横型セル(容量 2.5 mL)

ドナー溶液：10 mg/mL 安息香酸ナトリウム
(M/30 リン酸緩衝液)

レセプター溶液：M/30 リン酸緩衝液
(pH 7.4)

温度：32℃

サンプリング時間：2、4、6、8、10、
24 (hr)

サンプリング量：0.5 mL (10時間目はシンク
条件を保つため 1.5 mL 採取)

測定条件

波長：230 (nm)

移動相：アセトニトリル：0.05M リン酸
緩衝液 (pH 2.5、30:70)

流速：1.2 (mL/sec)

内部標準物質：P-安息香酸エチル
(12.5 μg/mL アセトニトリル溶液)

(2) パラベンメチル

安息香酸ナトリウムのとおり同様に摘出皮膚を拡散セルに挟んだ。試験(試料)溶液は、パラベンメチル懸濁液(最大使用濃度：10 mg/mL)とした。試験温度は、皮膚温度である 32℃で行い終始この温度を保持した。サンプリングの際にはシンク条件を保つため採取した量と等量の緩衝液を加えた。また、緩

衝液に対する溶解度試験も行った。パラベンメチルの測定にはHPLCを用いた。以下に主な透過実験条件、パラベンメチルの測定条件を示す。

実験条件

動物：ヘアレスラット

皮膚摘出部位：腹部

セル：横型セル（容量 2.5 mL）

ドナー溶液：10 mg/mLパラベンメチル懸濁液

(M/30 リン酸緩衝液)

レセプター溶液：M/30 リン酸緩衝液
(pH 7.4)

温度：32℃

サンプリング時間：2、4、6、8、10、
24 (hr)

サンプリング量：0.2 mL (10時間目はシンク
条件を保つため1.2 mL採取)

測定条件

波長：256 (nm)

移動相：アセトニトリル：0.05M リン酸
緩衝液 (pH 2.5、28:72)

流速：1.0 (mL/sec)

内部標準物質：P-安息香酸エチル
(12.5 μg/mLアセトニトリル溶液)

2. In vivo 静注単回投与試験

(1) 安息香酸ナトリウム

雄性ウイスターラットを麻酔後、ラットの頸静脈から 50 mg/kgの安息香酸ナトリウムを注射した。採血は投与側と逆側の頸静脈から行った。血液はヘパリン処理し、4℃、13600 rpm、5分で遠心分離し、血球と血漿に分けた。次に血漿1に対して内部標準物質を2倍量加え、同条件で遠心分離し上澄み

を採取した。(内部標準物質がアセトニトリル溶液なので同時に除蛋白が出来る)測定にはHPLCを用いた。この試験を3例行い、平均を求めコンピュータープログラムMULTIを用いて1-コンパートメントモデルで解析した。

静注実験条件

動物：ウイスターラット

投与物質：安息香酸ナトリウム (50 mg/kg
等張リン酸緩衝液 pH 7.4)

採血時間：1、5、10、20、30、45、60、
90 (min)

採血量：0.2 (mL)

測定条件

波長：230 (nm)

移動相：アセトニトリル：0.05M リン酸
緩衝液 (pH 2.5、29:71)

流速：1.2 (mL/sec)

内部標準物質：P-安息香酸エチル (12.5 μg/mLアセトニトリル溶液)

(2) パラベンメチル

安息香酸ナトリウムと同様に静注実験を行った。パラベンメチルの投与量は 10 mg/kgとした。この試験を3例行い、平均を求め、MULTIを用いて2-コンパートメントモデルで解析した。

静注実験条件

動物：ウイスターラット

投与物質：パラベンメチル

(10 mg/kg溶液 pH 7.4)

(エタノール：プロピレングリコール =
20% : 2.5%水溶液)

採血時間：1、3、5、10、15、20、25、

30、35、40 (min)

採血量：0.25 (mL)

測定条件

波長：256 (nm)

移動相：アセトニトリル：0.05M リン酸
緩衝液 (pH 2.5、28:72)

流速：1.0 (mL/sec)

内部標準物質：パラベンエチル
(12.5 μ g/mLアセトニトリル溶液)

3. 血中濃度推移の推測

In vitro 経皮吸収試験の結果と in vivo 静注単回投与試験の結果を用い、コンボリューション法により、in vivo 経皮吸収時における血中濃度の推移を推測した。なお、塗付時の面積を100 cm²とした。

C. 研究結果

1. In vitro 経皮吸収試験

Fig. 1a にヘアレスラット摘出皮膚を介する安息香酸ナトリウムの透過プロファイルを示す。Fig. 1b にパラベンメチルの透過プロファイルを示す。安息香酸ナトリウムでは約6時間、パラベンメチルでは約2時間のラグタイムの後、直線的な透過プロファイルを示した。

Table 1 にこれら抗菌剤の物理化学的性質と透過パラメータを示す。これら抗菌剤の透過速度 (Flux) は、用いた溶液の薬物濃度および溶解度に依存した。また、透過係数はほぼ同程度であった。

2. In vivo 静注単回投与試験

Fig. 2a にウィスター系ラットに安息香酸ナトリウムを単回急速静注したときの血中濃度プロファイルを示す。Fig. 2b にパラベンメチ

ルの血中濃度プロファイルを示す。安息香酸ナトリウムの体内からの消失は、時間に対して濃度の対数値が直線的に減少したことから、1-コンパートメントモデルで現わされると考えられた。一方、パラベンメチルでは、濃度の対数値の時間曲線が2相性を示し、2-コンパートメントモデルに従うと推察された。Table 2 に薬動学的パラメータを示す。安息香酸ナトリウムの半減期は約8分と体内からの消失が非常に速いことがわかった。また、みかけの分布容積は、約0.4 L と速やかな組織への分布が示唆された。パラベンメチルでは、血中からの半減期は約1分、 β 相の傾きから得られる体内からの半減期は、約3分と安息香酸ナトリウムの場合と同様に体内からの消失が非常に速いことがわかった。みかけの分布容積は、約0.13 L であり、組織への分布も大きいことがわかった。

3. 血中濃度推移の推測

Fig. 3a に安息香酸ナトリウムの in vitro 経皮吸収試験の結果と in vivo 単回急速静注試験の結果を用いてコンボリューション法により、安息香酸ナトリウムを100 cm²の皮膚に塗付したと仮定したときの血中濃度の類推曲線を、Fig. 3b にパラベンメチルのシミュレート曲線を示す。安息香酸ナトリウムでは、塗付後徐々に血中濃度が上昇し24時間前後で定常状態に達すると思われた。このときの定常状態血中濃度は、約1.2 μ g/mL と計算された。パラベンメチルでは、安息香酸ナトリウムよりも血中濃度の立ち上がりがおそく、また40時間以上で定常状態に達すると思われた。このときの定常状態血中濃度は、約200 μ g/mL と計算された。

D. 考察

今回、抗菌剤である安息香酸ナトリウムとパラベンメチルの経皮吸収性を OECD in vitro 経皮吸収試験法ガイドライン（案）に沿って評価し、化粧品や添加物等の試験法として有用であるかを評価した。

安息香酸ナトリウムとパラベンメチルの in vitro 経皮吸収試験では、経皮吸収試験法ガイドラインで大きな問題となる所はなかった。今回のデータは、ラットにおける in vitro 経皮吸収試験であるためヒトにおける経皮吸収を推測したものではない。しかし、ラットで考えると安息香酸ナトリウムの LD 50 は、経口で 4 g/kg であり、今回使用した濃度は 1/80 の使用量 (10 mg/mL) であり、コンポリューション法による血中濃度の類推曲線から、体内に吸収されても消失速度が速いために血中濃度が高値を示さず、類推濃度からは安全に使用できると考えられた。

本試験においては、whole skin を用いて行ったが、化粧品等は、皮膚に損傷があっても使用することが考えられるので、一般に透過律速となる角質層を取り除いた条件においても、このような実験や類推を行う必要があるかもしれない。また、用いた抗菌剤は、体内動態の結果から、分布容積が大きいので組織への移行性も安全性の評価に必要なパラメータと考えられ、多くの添加剤についての評価が必要となろう。

今回は、安全性の観点から経皮吸収後の体内動態を類推し、OECD in vitro 経皮吸収試験法ガイドライン（案）の評価を行った。しかし、化粧品や添加物等においては、これらを皮膚に適用したときの皮内滞留性、蓄積性も安全性に関して重要な評価ポイントと考えられる。今回はこの点の評価はできなかったが、簡便に類推できる評価法を検討することが今後の課題と考えられる。

E. 結論

1. OECD in vitro 経皮吸収試験法ガイドライン（案）により化粧品や添加物の経皮吸収性を評価できると考えられた。
2. 化粧品や添加物の安全性の評価のためには、より多くの物質の静注後の体内動態解析が必要と思われた。
3. 化粧品や添加物の安全性の評価のためには、皮膚に適用したときの皮内滞留性、蓄積性を簡便に類推できる評価法を検討する必要が考えられた。
4. 化粧品や添加物の安全性の評価のためには、損傷皮膚を用いた経皮吸収試験を行い、データを蓄積する必要があると思われた。

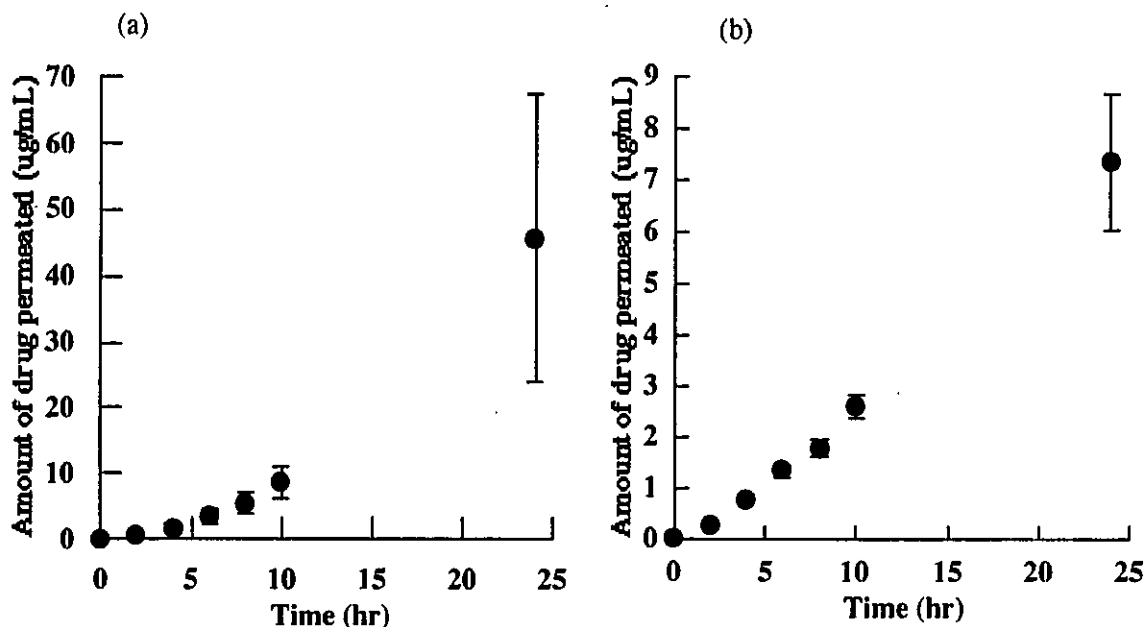


Fig.1 Permeation profiles of sodium benzoate (a) and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester (b) through the excised hairless rat skin

Table.1 Physicochemical property of sodium benzoate and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester, and kinetic parameters for drug permeation

	Sodium benzoate	4-Hydroxybenzoic acid methyl ester
M.W.	144.11	152.15
Solubility ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.556E+05	3564.6
partition coefficient (log Kow)	-3.85	1.53
Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	2.1067	0.3742
permeability coefficient (cm/sec)	5.852E-08	2.916E-08

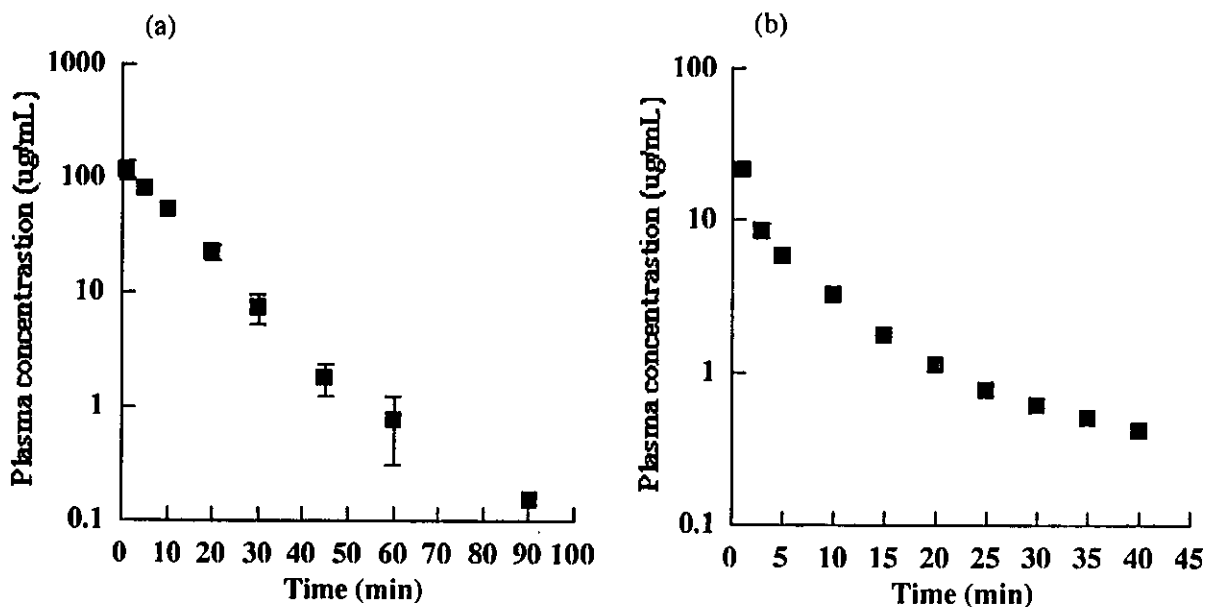


Fig.2 Plasma concentration of sodium benzoate (a) and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester (b) following i.v. bolus injection

Table.2 Pharmacokinetic parameters following i.v. bolus injection of sodium benzoate and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester

	Sodium benzoate	4-Hydroxybenzoic acid methyl ester
Dose (mg/mL)	50	10
t1/2 (min)	7.8481	
t1/2a (min)		0.9285
t1/2b (min)		8.4206
Vss (L)	0.1108	0.2792
AUC (µg/mL/min)	1432.0	124.13
MRT (min)	11.325	8.5379
CL (L/min)	9.786E-03	3.271E-02

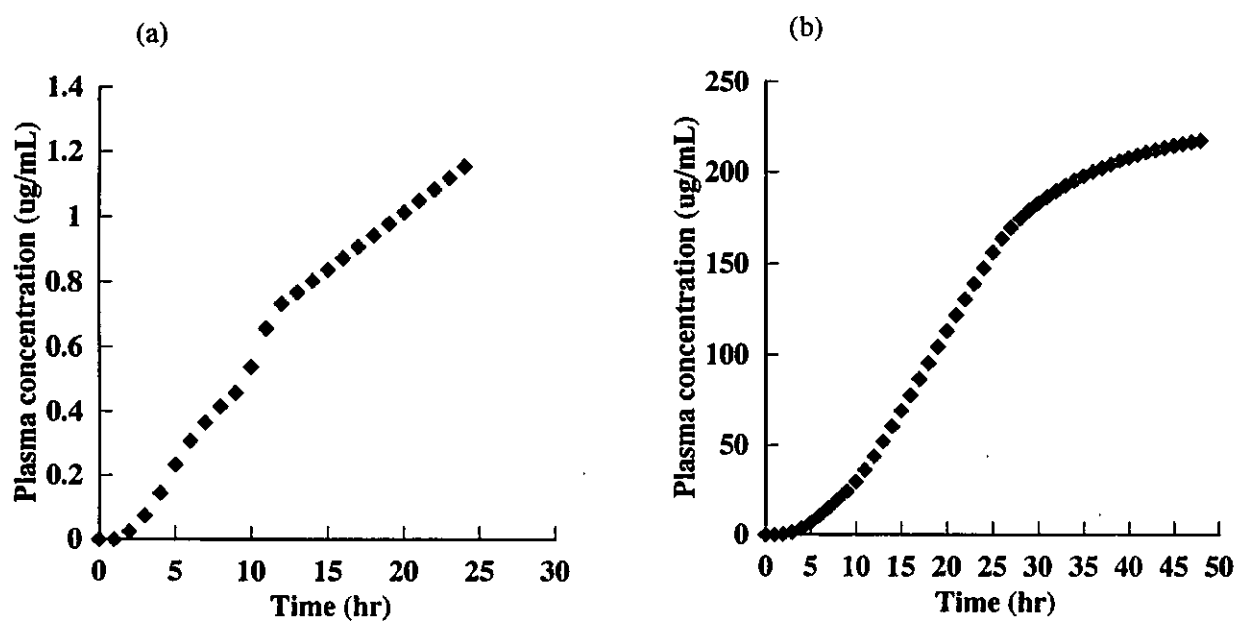


Fig.3 Simulated plasma concentration of sodium benzoate (a) and 4-hydroxybenzoic acid methyl ester (b) after topical application by convolution method

* Applied surface area was assumed 100 cm² (10 cm * 10 cm)

分担報告書

in Vitro 試験法を用いた化粧品の安全性評価法 及びその国際的ハーモナイゼーションに関する研究 (細胞を用いる光毒性試験における試験条件の検討)

分担研究者：食品薬品安全センター 秦野研究所 田中憲穂

研究要旨

本年度の研究では、これらの要因のうち照射線量や照射時間、前処理の時間等について検討し、光毒性物質を検出する為に用いる最適な照射線量は、3J と 5J のいずれの線量でも良い事がわかった。次に、同一照射線量の 3J に調整して、UV 照射強度と照射時間の関係を調べたところ、調べた実験条件下では 3J と 3J とで、ほとんど光細胞毒性に差は見られなかった。即ち、処理溶液に培地成分や血清を含まない EBSS を用いて被験物質を溶解し、それで長時間の薬物処理は出来ない事から、ガイドライン案に示す条件で良いと考えられる。ただし、光遺伝毒性の場合はエンドポイントが異なることから、その実験条件下で処理条件を十分に検討する余地がある。前処理時間と照射時間の関係については、意義は明らかでなかった。

細胞を用いる光毒性試験の代替法は、EU/COLIPA 主催で実施された評価試験で in vivo 光毒性の結果と良い相関を示すこと、アッセイ法が簡便で、同一プロトコールで実施した場合ほとんどの機関で同様の結果が得られたことから、光毒性物質の予知の面からは、動物実験の代替法として高く推奨できる方法である。しかしながら、光毒性として検出される物質の毒性発現の機構は、化学物質によつて多様である事から、より精度の高いプロトコールを完成させる為に、今後さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

化粧品等の光毒性試験における動物実験代替法開発において、細胞を用いる方法については EU/COLIPA (1992-1997) によって実施された国際的な評価試験 (validation study) が終了し、すでに OECD ガイドライン案 (Committee Draft: In vitro 3T3 Phototoxicity Test) として提案され、この案に対して各国からのコメントの収集が始まる段階となっている。

そこで本研究では、OECD ガイドライン案として提出されているプロトコールのなかで、試験条件として重要な要因となる、最適照射線量、照射時間と照射線強度の関係、前処理時間と照射時間の関係などについて検討した。

B. 研究方法

試験方法は原則的には OECD ガイドライン案に従って実施した。

細胞： EU/COLIPA の評価試験で用いられた BALB3T3 A31 細胞の代わりに、当研究室で汎用されている感度の高い亜株である BALB3T3 A31-1-1 細胞株 (JCRB0601) を用いて検討した。

培地と培養条件： 10% fcs 含 DMEM 培地にグルタミン、抗生物質を添加して用いた。細胞は 37°C, CO₂ インキュベーター内で培養した。用いる細胞は液体窒素中アンプルを解凍し、試験に用いる前、1-2 回適当な細胞数が得られるように前培養した。細胞は 96 ウェルプレートに 10⁴ 細胞/100 μ l 培地/ウェルを播種し、24 時間培養後に試験に供した。

照射装置： サンシュミレーター (SOL500, Dr. Honle 社) に UV-B (320nm 以下) をカットするための H1-フィルター (335nm の波長 50% 透過を示す) を装着して用いた。照度の測定は UV-A メーター (Type No. 37, Dr Honle 社) を用いてあらかじめ照射部位について、蓋の下の線量を測定した。

用いた被験物質： EU/COLIPA の評価試験で用いられた物質 18 種を含み 28 物質を用いた。

被験物質の調整： 原則として被験物質が溶解する溶媒として、DMSO と蒸留水をもちいて調整し、細胞の処理に用いる EBSS (Earl's Balanced Salts Solution) に添加した。

照射と培養： EBSS で洗浄後、被験物質を細胞に処理し、照射前に一定時間前処理した。その後、UV 照射

群は一定時間照射し、非照射群は一定時間室温暗所に置いた。照射後、EBSS で洗浄し、新鮮な培地と交換し、培養を 24 時間続けた。

ニュートラルレッド (NR) アッセイ： 培養した細胞は、NR を含む培地 100ul を加え、更に 3 時間培養した。その後、NR 培地を捨て 150ul の EBSS で洗い、新鮮なエタノール:酢酸混液 150ul を加えて NR 色素を溶出した。色素が均一になるように、約 10 分程緩やかに揺すり、溶出された NR の吸光度 (540nm) を、プレートリーダーを用いて測定した。

1. 最適照射線量

化学物質は EU/COLIPA の評価試験で用いられた物質 18 物質 (陽性物質:10、陰性物質: 8) に、10 物質を加えて 28 物質を用いた (Table 1)。照射時間を 30 分と 50 分の 2 条件、UV-A の照射強度は $1.6\text{mW}/\text{cm}^2$ である事から、総照射線量は 3J と 5J となった。この条件で得られた IC_{50} 値より、どの線量条件が妥当かを検討した。

2. 照射時間と照射線強度の関係

4 種の化学物質 (クロロプロマジン塩酸塩、テトラサイクリン塩酸塩、ドキシサイクリン塩酸塩、ピチオノール) を用いた。照射線量 3J の条件で、 $1.6\text{mW}/\text{cm}^2$ で 30 分の場合と $1.0\text{mW}/\text{cm}^2$ で 50 分の場合で得られた IC_{50} 値を検討した。

3. 前処理時間と照射時間の関係

クロロプロマジンを試験に用いた。前処理時間 60 分にして照射時間 0, 10, 30, 50, 70 分にした系列と前処理時間 0, 20, 40, 60, 80 分にして照射時間を 50 分にした系列を設けた。それぞれの系列 IC_{50} 値を比較検討した。

C. 研究結果

1. 最適照射線量について (Table 1)

EU/COLIPA の評価試験で陽性を示した 10 物質は、本試験でも全て陽性を示し、陰性物質は 3J (30 分)、5J (50 分) のいずれの条件でも全て陰性となった。陽性物質によってえられた IC_{50} 値の線量依存の傾向には、2つのパターンが見られた。即ち、9 物質中 5 物質は 3J ですすでに低い IC_{50} 値が得られた。一方、ほかの 4 物質は 3J より 5J へと線量の増加に依存して IC_{50} 値が更に低下した。しかしながら、3J の線量で陰性と判定されるような物質はなかった。ただし、アミダロン塩酸塩は 3J でやや弱い光毒性を示した。

我々が新たに追加して試験した 10 物質に関しては、4 物質が陽性、5 物質が陰性 (1 物質は測定不能) となったが、陰性を示した中の 1 物質は弱い光毒性を示した。陽性の 4 物質のうち 3 物質については、3J から 5J にかけての IC_{50} 値の低下傾向は見られず、1 物

質でのみその傾向が見られた。このように、3J 照射ですすでに光毒性を示す物質が大部分であった。

2. 照射時間と照射線強度の関係について (Fig. 1)

総照射線量 3J の同一条件で 30 分照射した場合と、50 分照射した場合の光毒性の強さは、4 種の化学物質のいずれにおいてもほとんど差は見られなかった。

3. 前処理時間と照射時間の関係について (Fig. 2)

EU/COLIPA のプロトコルでは、光照射の前 60 分間、細胞を EBSS に被験物質を加えて前処理する。その後 50 分間、光照射下で処理する。そこで前処理の時間が妥当であるか、また、光照射下での被験物質の処理時間が適正であるかを確認した。まず、前処理時間を 60 分に固定し、その後それぞれ 0, 10, 30, 50, 70 分間 UV 照射下で処理したところ、照射時間に依存して光毒性は強くなった。その毒性は、照射 50 分・70 分でほぼピークに達した。一方、処理後の UV 照射時間を 50 分に固定し、前処理の時間をそれぞれ 0, 20, 40, 60, 80 分間設けたところ、前処理の時間は光毒性の発現にさほど影響を及ぼさなかった。ただし、室温で 40 分以上前処理して UV 被照射下においたものは、0 または 20 分前処理したものに比べ毒性が弱くなった。

D. 考察

化粧品等の光毒性試験の代替法として、BALB3T3 細胞を用いる方法が EU/COLIPA によって提案され、その評価試験が行われたのち、OECD ガイドライン案として提出されている。この案は、光毒性試験を行う際の結果に影響を及ぼす要因について、あらかじめ予備検討がなされたうえで評価試験がなされている。たとえば、用いる細胞株により光毒性の感受性が異なる可能性がある。その点では OECD ガイドライン案で推奨する BALB3T3 A31 の細胞株は、感度が高く適切な細胞株の選択といえる。また、照射に用いる光源の種類も重要なファクターで、どれを用いるかにより結果に直接影響を及ぼす可能性がある。ここでは自然条件に近い太陽光類似の波長を示すキセノンランプ、またはメタルハロゲンランプの使用が推奨されている。このようにかなり吟味して作成されたガイドラインではあるが、細部にわたっては、未だ検討を要する事項もある。

本年度の研究では、これらの要因のうち照射線量や照射時間、前処理の時間等について検討した。光毒性物質を検出する為に用いる最適な照射線量に関しては、本実験で用いた 3J と 5J のいずれの線量でも検出可能である事がわかった。即ち、陽性物質の大部分は 3J ですすでに低い IC_{50} 値を示し、実用上 3J でも検出可能である事が確認されたが、反応の弱い物質などの事も考慮すれば 5J の選択は妥当な線量と

考えられる。ちなみに、本実験で用いた 28 物質のうち、3J で全く毒性がみられず 5J で毒性が現れるような物質はなかった。

次に、同一照射線量の 3J (1.6mW×30min と 1.0mW×50min) に調整して、UV 照射強度と照射時間の関係を調べた。その結果、調べた実験条件下では 3J (1.6mW×30min) と 3J (1.0mW×50min) とで、ほとんど光細胞毒性に差は見られなかった。したがって、処理溶液に培地成分や血清を含まない EBSS を用いて被験物質を溶解し、それで長時間の薬物処理は出来ない事から、ガイドライン案に示す条件が良いと考えられる。ただし、光遺伝毒性の場合はエンドポイントが異なることから、その実験条件下で処理条件を十分に検討する余地がある。

前処理時間と照射時間の関係については、前処理時間が短くても (20 分) 長くても (80 分)、光毒性の発現に影響を及ぼさなかった。そもそも、前処理がどのような意味でなされるのかについての理由付けはなされていない。おそらく、照射前に被験物質を EBSS によく溶解させてなじませる事と、細胞と被験物質を適当な時間接触させることによって、溶けた物質が本実験結果から前処理する事の意義は明らかでなかった。

E. 結論

細胞を用いる光毒性試験の代替法は、EU/COLIPA 主催で実施された評価試験で *in vivo* 光毒性の結果と良い相関を示すこと、アッセイ法が簡便で、同一プロトコールで実施した場合ほとんどの機関で同様の結果が得られたことから、光毒性物質の予知の面からは、動物実験の代替法として高く推奨できる方法である。しかしながら、光毒性として検出される物質の毒性発現の機構は、化学物質によつて多様である事から、より精度の高いプロトコールを完成させる為に、今後さらに検討する必要がある。

Table 1 Results of phototoxicity assay in the *in vitro* 3T3 phototoxicity test

Chemicals	IC50 (ug/ml) with UVA 1.6 mW/cm ²			Factor		Judgement ⁴⁾
	0 min	30 min	50 min	0/50 UV	0/30UV	
<i>Class I UV-absorbing, phototoxic</i>						
1 Promethazine HCl	13.7	1.88	0.49	28.1	7.3	+
2 Chlorpromazine HCl	6.6	0.56	0.073	89.8	11.7	+
3 6-Methylcoumarine	677	22.3	13.0	51.9	30.4	+
4 Doxycycline HCl	1754	16.1	13.4	131.4	109.0	+
5 8-MOP	950	6.4	7.4	127.8	148.5	+
6 Tetracycline	601	81.8	7.4	81.7	7.4	+
7 Amiodarone HCl	17.9	5.1	2.2	8.3	3.5	+
8 Bithionol	3.6	0.66	0.60	5.9	5.4	+
9 Neutral Red	- ²⁾	0.080	0.066	-	-	+
10 Rose Bengal	3.2	0.031	0.033	97.9	103.9	+
<i>Class II UV-absorbing, non phototoxic</i>						
11 Piroxicam ¹⁾	> 667	> 667	> 667	-	-	-
12 Chlorhexidine	3.8	4.1	3.1	1.2	0.9	-
13 Uvinul MS 40	4582	5652	6349	0.7	0.8	-
14 PABA	1632	1697	2223	0.7	1.0	-
<i>Class III non UV-absorbing, non phototoxic</i>						
15 Penicillin G	46860	41655	39875	1.2	1.1	-
16 L-Histidine HCl	3069	3629	4239	0.7	0.8	-
17 Thiourea	7417	9780	8746	0.8	0.8	-
18 SDS	31.8	27.5	29.1	1.1	1.2	-
<i>Miscellaneous substances suspected phototox.</i>						
19 PCP	> 1000 ³⁾	835	821	-	-	*
20 Hexachlorophen	3.8	2.9	2.02	1.9	1.3	-
21 Tetrabromofluorescein	4073	1.67	0.58	6973.9	2442.7	+
22 Levomepromazine	3.8	0.9	0.75	5.1	4.1	+
23 Sulfanilamide	1484	1476	> 2500	-	-	-
24 3, 4', 5-Tribromosalicylanilide	106	1.77	1.80	58.9	59.7	+
25 2,4-Dinitrochlorobenzene	0.9	0.9	0.73	1.3	1.1	-
26 Benzylamine HCl	44.2	36.4	28.3	1.6	1.2	-
27 Pyriothioxin	> 500 ³⁾	> 500 ³⁾	24.3	-	-	+
28 l-Cinnamaldehyde (CAS No. 14371-10-9)	14.1	8.0	5.9	2.4	1.8	-

1): Not solved in DMSO more than 66.7 mg/ml

2): Not determined IC₅₀ in this method

3): Not tested because of precipitation

4): Positive: > factor 5.0 (0/50 UV)

* : Not determined

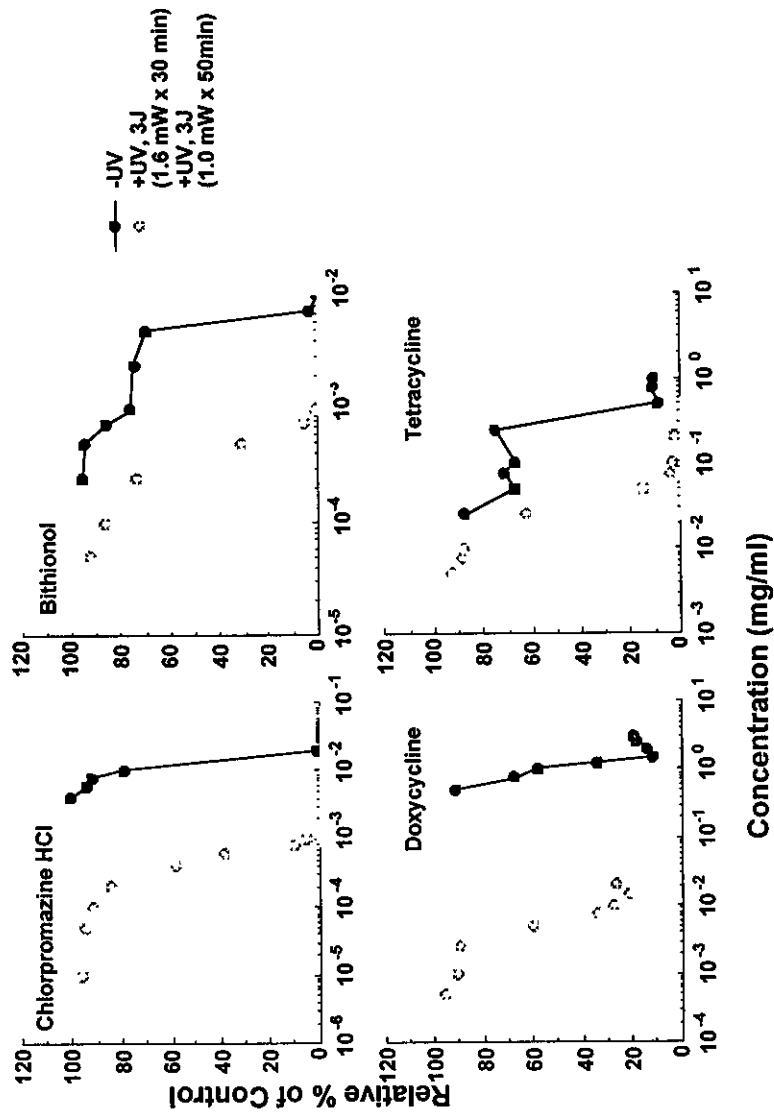


Fig 1 Relation between UV intensity and exposure time in the *in vitro* 3T3 phototoxicity test

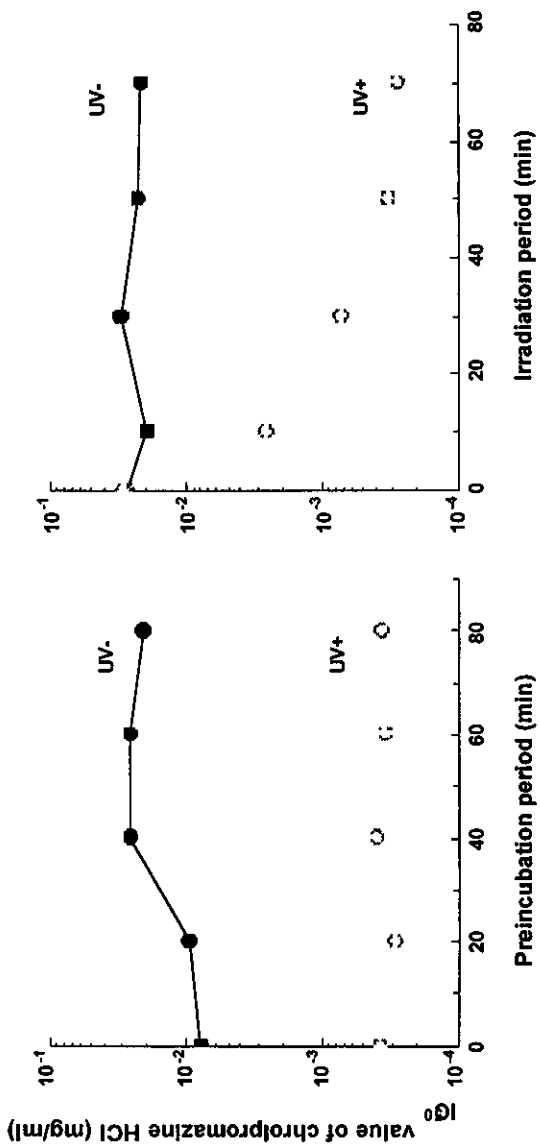


Fig 2 Relation between pretreatment and exposure periods in the *in vitro* 3T3 phototoxicity test