

- solubility of the test chemical in solvent;
- percentage of solvent present in treatment medium.

Cells:

- type and source of cells;
- absence of mycoplasma;
- cell passage number, if known;
- Radiation sensitivity of cells, determined with the irradiation equipment used in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test.

Test conditions (1); *incubation before and after treatment*:

- type and composition of culture medium;
- incubation conditions (CO₂ concentration; temperature; humidity);
- duration of incubation (pre-treatment; post-treatment).

Test conditions (2); *treatment with the chemical*:

- rationale for selection of concentrations of the test chemical used in the presence and in the absence of irradiation;
- in case of limited solubility of the test chemical and absence of cytotoxicity: rationale for the highest concentration tested;
- type and composition of treatment medium (buffered salt solution);
- duration of the chemical treatment.

Test conditions (3); *irradiation*:

- rationale for selection of the light source used;
- spectral irradiance characteristics of the light source;
- transmission and absorption characteristics of the filter(s) used;
- characteristics of the radiometer and details on its calibration;
- distance of the light source from the test system;
- UVA irradiance at this distance, expressed in mW/cm²;
- duration of the UV/vis light exposure;
- UVA dose (irradiance x time), expressed in J/cm²;
- temperature of cell cultures during irradiation and cell cultures concurrently kept in the dark.

Test conditions (4); *Neutral Red viability test*:

- composition of Neutral Red treatment medium;
- duration of Neutral Red incubation;
- incubation conditions (CO₂ concentration; temperature; humidity);
- Neutral Red extraction conditions (extractant; duration);
- wavelength used for spectrophotometric reading of Neutral Red optical density;
- second wavelength (reference), if used;
- content of spectrophotometer blank, if used.

Results:

- cell viability obtained at each concentration of the test chemical, expressed in percent viability of mean, concurrent solvent controls;
- concentration response curves (test chemical concentration vs. relative cell viability) obtained in concurrent +Irr and -Irr experiments;
- analysis of the concentration-response curves: if possible, computation/calculation of IC₅₀

- (+Irr) and IC₅₀ (-Irr);
- comparison of the two concentration response curves obtained in the presence and in the absence of irradiation, either by calculation of the Photo-Inhibition-Factor (PIF), or by calculation of the Mean-Photo-Effect (MPE);
 - test acceptance criteria; concurrent solvent control:
 - absolute viability (optical density of Neutral Red extract) of irradiated and non-irradiated cells;
 - historic negative and solvent control data; means and standard deviations.
 - test acceptance criteria; concurrent positive control:
 - IC₅₀(+Irr) and IC₅₀(-Irr) and PIF/MPE of positive control chemical;
 - historic positive control chemical data: IC₅₀(+Irr) and IC₅₀(-Irr) and PIF/MPE; means and standard deviations.

Discussion of the results.

Conclusions.

REFERENCES

- (1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxic. In Vitro* 7: 95-102.
- (2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In "Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry" Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.
- (3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Saporá, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. *ATLA*, 22, 314-348.
- (4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In "The science of Photobiology" Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.
- (5) *Placeholder reference to the cut-off of value of the molar extinction coefficient of 10 mol⁻¹ cm⁻¹:
- (6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F. Moore, L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. *Toxic. In Vitro* 8, 793-796.
- (7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, *ATLA*, 26, 7-8.

- (8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. *Toxic. In Vitro* 12, 305-327.
- (9) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Lett.*, 24, 119-124.
- (10) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. *Analytical Biochemistry* 171, 225-237.
- (11) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.
- (12) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.
- (13) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints - Methods for measuring image stability.
- (14) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275
- (15) ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.
- (16) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679-708.
- (17) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127-138.
- (18) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, 445-462.
- (19) This will be a hyperlink to the OECD web pages that contain the software.

ANNEX 1DEFINITIONS

Irradiance: the intensity of ultraviolet (UV) or visible light incident on a surface, measured in W/m² or mW/cm².

Dose of light: the quantity (= intensity x time) of ultraviolet (UV) or visible radiation incident on a surface, expressed in Joules (= W x s) per surface area, e.g., J/m² or J/cm².

UV light wavebands: the designations recommended by the CIE (Commission Internationale de L'Eclairage) are: UVA (315-400nm) UVB (280-315nm) and UVC (100-280nm). Other designations are also used; the division between UVB and UVA is often placed at 320nm, and the UVA may be divided into UV-A1 and UV-A2 with a division made at about 340nm.

Cell viability: parameter measuring total activity of a cell population (e.g., uptake of the vital dye Neutral Red into cellular lysosomes), which, depending on the endpoint measured and the test design used, correlates with the total number and/or vitality of the cells.

Relative cell viability: cell viability expressed in relation of solvent (negative) controls which have been taken through the whole test procedure (either +Irr or -Irr) but not treated with test chemical.

PIF (Photo-Irritation-Factor): factor generated by comparing two equally effective cytotoxic concentrations (IC₅₀) of the test chemical obtained in the absence (-Irr) and in the presence (+Irr) of a non-cytotoxic irradiation with UVA/vis light.

MPE (Mean-Photo-Effect): measurement derived from mathematical analysis of the concentration response curves obtained in the absence (-Irr) and in the presence (+Irr) of a non-cytotoxic irradiation with UVA/vis light.

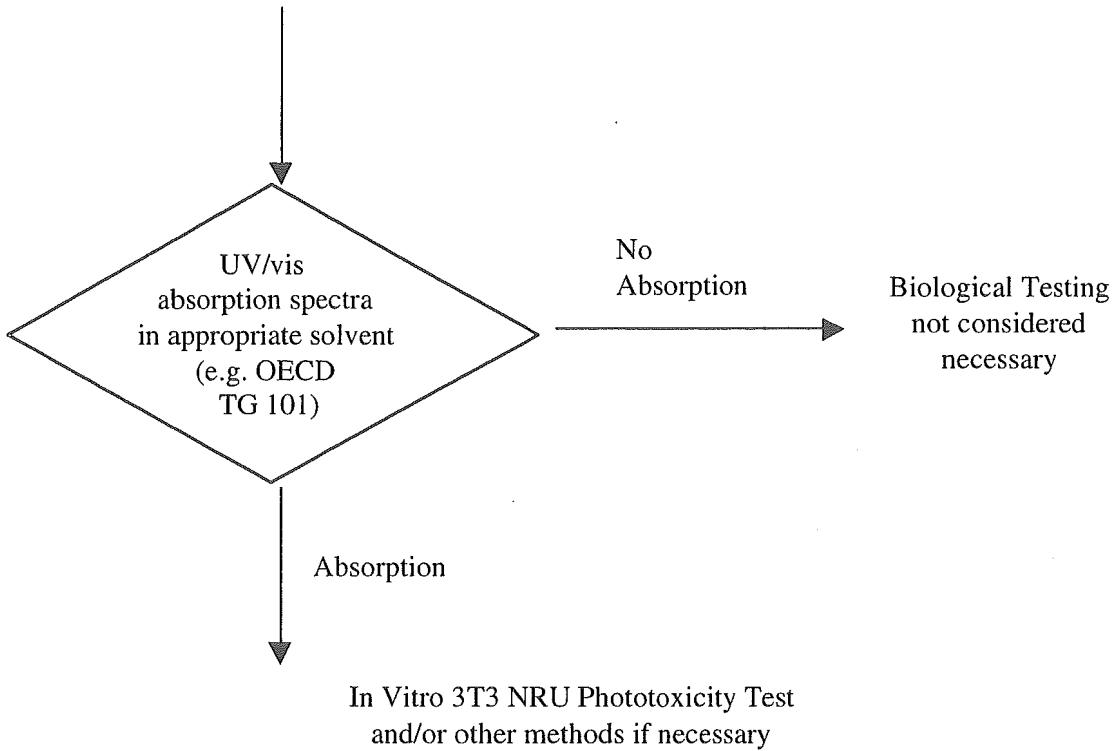
Phototoxicity: acute toxic response that is elicited after the first exposure of skin to certain chemicals and subsequent exposure to light, or that is induced similarly by skin irradiation after systemic administration of a chemical.

ANNEX 2

Role of the 3T3 NRU PT in a sequential approach to the phototoxicity testing of chemicals

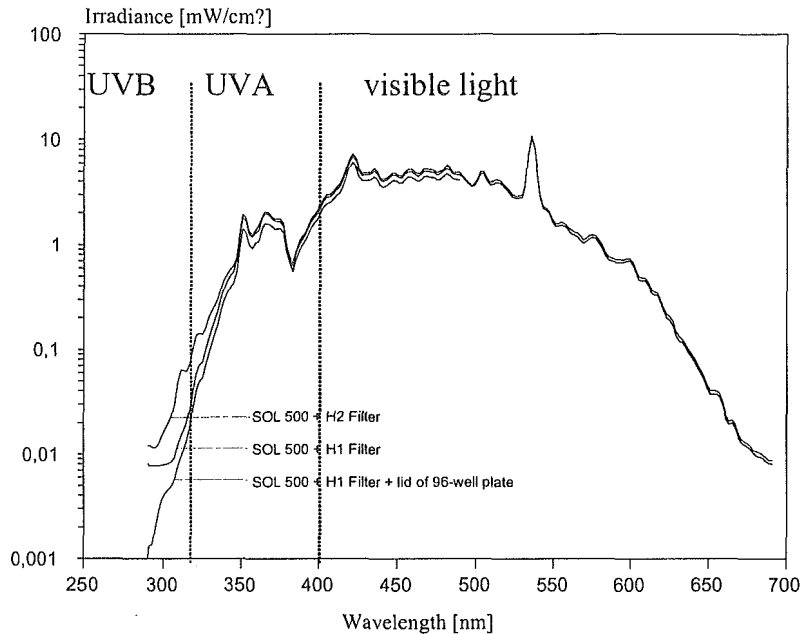
Initial Evaluation of the Physical, Chemical, and Toxicological Properties of the Test Substance

- Physico-chemical properties
- Chemical structure, structural alerts
- UV/vis - absorption
- QSAR - photochemistry
- General toxicity (including kinetics and metabolism)



ANNEX 3

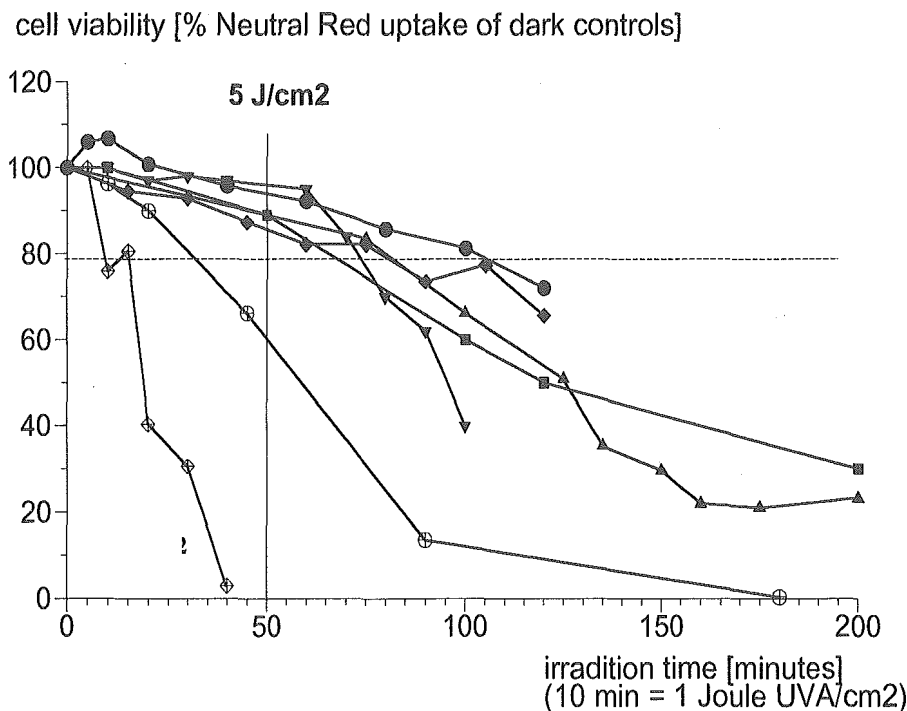
Figure 1: Spectral power distribution of a filtered solar simulator



(see paragraph 22)

Figure 1 gives an example of an acceptable spectral power distribution of a filtered solar simulator. It is from the doped metal halide source used in the validation trial of the 3T3 NRU PT (1)(3)(12). The effect of two different filters and the additional filtering effect of the lid of a 96-well cell culture plate are shown. The H2 filter was only used with test systems that can tolerate a higher amount of UVB (skin model test and red blood cell photo-hemolysis test). In the 3T3 NRU-PT the H1 filter was used. The figure shows that additional filtering effect of the plate lid is mainly observed in the UVB range, still leaving enough UVB in the irradiation spectrum.

Figure 2: Irradiation sensitivity of Balb/c 3T3 cells (as measured in the UVA range)



(see paragraphs 24, 28, 29)

Sensitivity of Balb/c 3T3 cells to irradiation with the solar simulator used in the validation trial of the 3T3NRU-Phototoxicity Test, as measured in the UVA range. Figure shows the results obtained in 7 different laboratories in the pre-validation study (1). While the two curves with open symbols were obtained with aged cells (high number of passages), that had to be replaced by new cell stocks the curves with bold symbols show cells with acceptable irradiation tolerance. From these data the highest non-cytotoxic irradiation dose of 5 J/cm₂ was derived (vertical dashed line). The horizontal dashed line shows in addition the maximum acceptable irradiation effect given in paragraph 29.

(添 付 資 料)
(6)

厚生科学研究班における光毒性試験代替法の
評価募集案内 (2001.2)

厚生科学研究班で光毒性試験代替法を評価します。

1, 評価委員会設立の経緯とその位置付け

安全性評価のための動物実験代替法の多くは適用できる化学物質の種類や評価できる毒性等に限界があります。また、in vivo 結果との対応が必ずしも十分でないことがあります。それらを十分に理解せずに代替法を利用すると誤評価してしまう可能性があります。それ故、適切なバリデーションおよび評価を行い代替法がどこまで従来の動物実験に代替し得るかを明確にしておくことが必須です。欧米では ECVAM や ICCVAM のような組織を設立し、バリデーションの支援や代替法を行政的に受け入れるための評価を行い、Episkin や Corrositex などの試験法を特定の行政目的のために受け入れてきました。一方、我が国にはそのような組織はなく、代替法の受け入れは十分ではありませんでした。

そこで、平成13年度より始まった厚生科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究（主任研究者 大野泰雄）」では動物実験代替法として提案されている試験法を評価し、厚生労働省に報告する計画を立て、そのために代替法評価委員会と代替法評価会議を設置しました。

2, 評価委員会と評価会議の目的

安全性評価のための動物実験代替法として報告されている試験法を客観的、科学的に評価することにより、その利点と問題点、限界を明らかにし、試験法としての妥当性の範囲を明らかにし、認定することにより、動物実験代替法の使用を促進する。

3, 評価委員会と評価会議の業務と位置付け

評価委員会は代替法について具体的に調査し、評価するための機関であり、代替法の評価および評価の対象となる試験法の専門家から構成されています。一方、評価会議はより広い知識・経験・視野のもとで代替法を行政的な目的のための使用における妥当性について評価します。評価会議は臨床医師、統計の専門家、行政官、および厚生科学研究の班員、班友により構成されています。評価委員会は提出された代替法の申請書を評価し、評価文書を作成し、試験法が特定の目的のために妥当とされた場合には厚生科学研究班に設置された評価会議に上げ、更に評価されます。ここで申請された代替法が妥当とされた場合には公開のシンポジウムを開催し、広く意見を求め、その結果に基づいて最終評価を行います。

4, 評価委員会の委員

委員長：

金子豊蔵（国立衛研 毒性部）

副委員長：

田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）

委員：

板垣 宏（資生堂 ライフサイエンス研究センター安全性研究所）

今井弘一（大阪歯科大学 中央歯学研究所組織培養実験施設）

大野泰雄（国立衛研 薬理部）

大森 崇（国立衛研 審査センター）

岡本裕子（コーセー 基礎研究所）

小島肇夫（日本メナード化粧品 総合研究所）

畑尾正人（資生堂 基盤研究センター 薬剤開発研究所）

若栗 忍（食品薬品安全センター 秦野研究所）

5. 評価会議の委員

委員長

大野泰雄（国立衛研 薬理部）

委員

金子豊蔵（国立衛研 毒性部）

田中憲穂（食品薬品安全センター 秦野研究所）

豊田英一（日本化粧品工業連合会・技術委員会）

西岡 清（東京医科歯科大学医学部）

林 憲一（厚生労働省医薬局審査管理課）

溝口 昌子（聖マリアンナ医科大学皮膚科学）

宮地 良樹（京都大学大学院医学研究科）

森本雅憲（城西大学薬学部）

吉村 功（東京理科大学工学研究科経営工学）

吉田武美（昭和大学薬学部）

6. 評価する試験法について

評価する試験法の種類は年度毎に厚生科学研究班で決定します。平成13年度は OECD のガイドライン案で示されている 3T3 細胞を用いた光毒性試験を文献的に評価しております。そこで、平成14年度はそれ以外の光毒性試験代替法について評価を希望する試験法を公募します。

7. 応募期限

平成14年8月末日

8. 評価スケジュール予定

- 9月：申請に必要な資料の確認
- 10月：資料を評価委員に配布
- 11月：評価委員会開催
- 12月：評価文書の作成
- 1月：評価会議の開催
- 2月：公開シンポジウム開催
- 3月：評価文書作成

なお、施設間バリデーションに関するデータが無いものについては原則として妥当な試験法としては認められません。しかし、我が国における代替法開発の促進を考え、施設間バリデーションのデータが無い試験法についても評価委員会でそれを行う価値があると認めた場合には日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に施設間バリデーションの実施を依頼し、その結果を合わせて評価し、評価会議にかける。この場合は評価会議の日程はバリデーションが終了してからとなります。

9. 申請に際して提出していただく資料

- 1) 代替しようとする試験法の名称
- 2) 代替しようとする *in vivo* 試験法に関する資料（プロトコール、再現性、特異性、予測性についての記述を含む）
- 3) 代替法の原理に関する資料
- 4) 試験法の詳細なプロトコール
- 5) 検討した被験物質のリストと化学物質としての特性に関する資料
- 6) 検討した被験物質の *in vivo* 及び *in vitro* 試験結果の結果に関する資料
- 7) 試験法の感度、特異性、予測性、精度（一致率）を記載した資料

- 8) 試験法の特徴 (適用範囲、false positive, false negative)
- 9) 試験法のバリデーションとそのQCに関する資料
- 10) その他、データ解析上有用な資料 (生データ等)
- 11) 論文 (または、学会発表資料&印刷中の論文原稿)
- 12) 提案者の研究歴及び専門性を示す資料

10. 問い合わせ・申し込み・資料送付先

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

大野泰雄

〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Tel: 03-3700-9692, fax: 03-3707-6950, E-mail: ohno@nihs.go.jp

(添 付 資 料)
(7)

公開シンポジウム記録

In vitro 光毒性試験に関する公開シンポジウム記録

副題： 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

開催日時：平成14年12月5日（木）午後2時～5時

会場：総評会館2階（東京都千代田区神田駿河台3-2-11）

主催：厚生科学研究班「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」

共賛：日本動物実験代替法学会、日本トキシコロジー学会

講師：大野泰雄（国立衛研・安全センター・薬理部）、畑尾正人（資生堂）、田中憲穂（食品薬品安全センター・秦野研）、Horst Spielmann（ZEBET）、戸倉新樹（産業医科大学・医・皮膚科）

参加者：事前申し込み者は54人。当日参加者約50人。講師、評価委員を合わせ、参加者は約120人。

1. 講演（講演スライドを添付した。）

イントロダクションとして大野より厚生科学研究で毒性試験代替法の評価することとなった背景と光毒性試験について評価した理由、およびin vivoの光毒性試験法について解説された。次に、ZEBETのHorst Spielmann所長よりEUにおける光毒性試験バリデーシヨンの結果およびそれに基づいて作成されたOECDガイドライン案が受け入れられた過程について解説された。

資生堂の畑尾より「EU/COLIPAのバリデーシヨンの結果の信頼性とin vivo光毒性試験結果との対応性についての評価結果」について説明され、3T3-NR法は陽性、陰性の判定の食い違いに着目した場合、施設間再現性を有している。また、vivoデータとの対応はよく、光毒性ポテンシャルを予測する上で有効であり、結果を判定する上である程度の施設間信頼性を有する。しかし、文献上の評価であり、データの質は十分に確かめられていないとし、評価したバリデーシヨンの研究データを入手し、今後文献に記載されたデータに問題がないか確認することが必要とした。そこで、引き続きZEBETのSpielmann教授より提供されたデータファイルによる論文データの確認作業の結果が報告され、一部パラメータ計算方法の変更による相違があったが、個別データの点で基本的に確認されたことが報告された。また、評価結果がばらついた原因の多くが技術的なものであると推定され、被験物質の溶解や光照射条件、また、培養方法についての訓練が必要と思われること、Furosemideについては施設による評価に差がある原因を推定できなかった。グレイゾーンの設置によりfalse negativeを減らすことができたこと、及び、水溶性の低いものでばらつきが大きい傾向があったことが報告された。

田中より「試験プロトコールの提案」として、代替法評価委員会での光細胞毒性試験法の評価結果に基づき、基本的にはOECDガイドライン（GL）案に準じて、照射条件や細胞株、試験条件などの具体的方法についての留意点をまとめ、推奨プロトコールとしてまとめた結果が報告された。また、現在の方法では代謝活性化を伴う光毒性は検出できないこと、水不溶性の

検体は評価が困難であることなどの限界が述べられた。また、試験結果の利用に関して、陰性の場合にはほぼ光毒性はないものと考えられるが、本系では光アレルギー等の可能性については予測できない。一方、陽性の物質の使用にあたっては、ヒトに対するリスク評価をする必要があり、動物を用いる光毒性試験やヒトパッチテスト等で確認するのが望ましいこと、また、光遺伝毒性や光発がんの可能性等、メカニズムに対応した試験について考慮する必要があると述べられた。

戸倉教授は「臨床医師の立場からのコメント」として、臨床で問題となるのは光アレルギーであることを強調し、光アレルギー性物質は多かれ少なかれ光毒性を持つが、逆は真ならず、キノロン系物質のように両性質が反対になる場合もある。今回の方法は光毒性のスクリーニングになるが、臨床的な光線過敏性物質のスクリーニングにはならないと述べた。一方、従来の動物を用いた試験に関しては、光毒性の非常に強い物質に対しては評価可能であるが、臨床的副作用の有無のスクリーニングには力足らずと述べた。また、一つの検査の精度を上げる努力をしても、それが人体にとっての光有害物質であるか否かを判定することに貢献できるかということとは別であると述べた。

2. 質 疑

1) 大野及び Spielmann 博士の講演についての質疑

質疑は無かった

2) 畑尾博士の講演についての質疑

戸倉：2,4物質の臨床データを知りたい。今回の結果は臨床データと対応するのか？

回答（大野）：化合物のほとんどで臨床報告があると思われる。また、3T3-NR 光毒性試験結果の臨床データとの対応は良い。Spielmann からバリデーションデータのパッケージを送ってもらったので公開できるかどうか聞いてみる。（対応1）

総てがカバーされているわけではないが、ドイツ、オーストリア及びスイスの医師が行ったヒトにおける光毒性試験結果が引用されている。

戸倉：光アレルギーとの関係は明らかか？

回答（畑尾）：明らかではない。光アレルギー試験法としての妥当性を見ることは今回の評価の対象ではない。

3) 試験プロトコルの提案（田中）についての質疑

黒田（遺伝研）：照射の時、水、培養液による紫外線吸収の影響はあるのか？

回答（田中）：バッファーを用いており、またコントロールとの比較で評価している。

黒田：付着している細胞の広がり具合で紫外線のあたり方が違うことが予想される。そのため、結果が異なるのでは？

回答（田中）：その可能性はあるかもしれない。

津田（食薬センター）：ヒトへ外挿するにはヒトの細胞を使ったほうが良いのでは？

回答（田中）：細胞による差はある。ヒトケラチノサイトの報告もある。Hazard identification
でやっているのでヒトの細胞は使用しなかった。

津田：代謝活性化は？

回答（田中）：培養系は生体と違う。

回答（大野）：一般的に薬物代謝活性は培養により低下することから、in vivo にあった時と同じとはいえない。ヒト細胞でもバリデーションは必要。

回答（田中）：3T3 は高感度なので問題ないと考えている。（メモ：代謝活性化に関しては対応していないことが報告書に記載されている。）

質問者不明：光照射のむらについて

回答（Spielmann）：場所を一定時間毎にずらしていけば照射量の均一化は可能。（対応2）

質問者不明：PIF で光毒性の程度を定量的に比較することは可能か？

回答（若栗）：自ラボ内であれば CPZ(陽性対照)を常において補正すれば問題ない。また、CPZ
の値が揃っていれば補正の必要もない。ラボ間の違いはバリデーションで評価。（対応3）

4) 戸倉教授の講演についての質疑

質疑は無かった。

5) 総合討論

戸倉：臨床的には光アレルギーの出現頻度が多い。この試験法では、光アレルギーと光毒性は
区別可能か？

Dr. Liebsch：この試験法は細胞毒性に基づくため、光アレルギーについては、光蛋白結合性
などの他の試験法との組み合わせが必要である。（対応4）

田中：光変異原性試験については、使用不可能である。

畑尾：この試験法は化学物質の光毒性をスクリーニングする方法である。その観点では使用可
能か？

戸倉：光アレルギーの多い臨床ではツールとなり得ないが、光毒性のスクリーニングとしては
使用可能と思う。（対応5）

大野：光感作物質が光毒性ポテンシャルを持っているのなら、この試験法で感度を上げれば光
感作物質捕まるか？

戸倉：光蛋白結合性と 3T3 NRU PT を組み合わせれば可能かもしれない。

質問者不明：EU や米国では医薬品のガイドラインにこの 3T3 NRU PT が入るといふ噂がある
が、日本では動物試験のガイドラインもない。厚生労働省はガイドラインを作る気はない
のか？要求が無いと行わない。

大野：今のところそのような話は聞いていない。但し、ガイドラインにあるからやるというこ
とではなく、化学構造や紫外線吸収等からみて必要ならば内服薬でも行うという態度が必
要と考える。

質問者不明：UVB に吸収を持つ化合物は UVB の光源を用いて試験したほうがよいか？

田中：サンセットは SOL500 よりも UVB 光が強いのでサンセットを使用してみるのも良いか

もしれない。

戸倉：光アレルギー反応では、化学物質の吸収波長よりも A 側に作用波長がある。UVB が Action スペクトルになる物質は非常に少ない。

畑尾：UVB は DNA 傷害が多いので、真の毒性プロファイルを見出すことは難しい。(対応 6)

大森：ヒトの光毒性を予測する上で、この in vitro 試験は in vivo 試験より感度が高いと思うか？

戸倉：in vitro の方が感度が高いと思う。

豊田：in vivo データには光アレルギーか光毒性かは不明のものがある。また、false negative がある試験法で陰性ならば問題なしと評価して良いか？

大野：光刺激性物質はほとんど検出できている。False negative は極めて少ない。また、技術的な原因で起こることがほとんどである。In vivo 法より今回の 3T3-NR 法の方が感度が良いと考えられることから、これで陰性であるならば陰性として良いと考える。但し、フロセミドで偽陰性となった理由がよくわからなかった。それについて戸倉先生はどのように考えるか？

戸倉：フロセミドは光アレルギー反応を起こす典型的な薬物であることが知られている。アレルギーは Type II reaction であり、3T3 NRU PT では Type I reaction と Type II reaction の区別ができない。(対応 7)

質問者不明：外用薬は光アレルギー試験結果を提出することになっているが、経口薬では提出が義務付けられていない。光アレルギー試験を実施して提出したほうがよいか？

回答(大野)：類薬の光毒性や被験物質の物理化学的性状や体内分布などに基づく考察により判断し、必要ならば試験を実施すべき。

質問者不明：ピロキシカムの Prodrug はどのような結果を示すと考えられるか？

回答者不明：わからない。

質問者不明：False negative について何か意見を？

回答者不明：試験系の問題点を明らかにするために適正な in vivo データが多数必要となる。

3. 質疑に対する対応

対応 1：Dr Spielmann より了解を得たので、戸倉先生にデータパッケージを送付する。その他にも希望者があれば送付する。

対応 2：標準的試験法に記載する。また、必要ならば報告書に記載する。→「また、照射の平面的な照射むらによるバラツキを防止するために、一定時間毎に位置をずらすことも有用である。」との文を 5-1-8) 照射条件に入れた。

対応 3：但し、今回のバリデーションはあくまで定性的な評価のみなので、定量的な評価が可能という文面は報告書には記載しない。

対応 4：光アレルギーについてはバリデーションされていないという内容とともに報告書に記載する。内容は対応 5 に示した。

対応5 : Spielmann の論文でも光アレルギー物質を検出できた例も示されていることから、false negative の可能性については否定できないという留保をつけて、記載する。「なお、光アレルギー性物質のスクリーニングにおける本方法の有用性は確認されていない」との文を5-2-3) の結論に追加する。

対応6 : 5-1-2) 被験物質の試験への適用性に「なお、地球に到達する紫外線のうち、UV-A は皮膚への透過度が高く光毒性もでやすく、より短波長である UV-B は皮膚への透過度は低いとその生物学的な作用は強い。一方、本来 UV-B は生体内の内因性の光増感物質と反応して皮膚傷害を起こすため、臨床的にも UV-B による外因性化学物質の光毒性そのものだけを特定することは難しいと考えられる。よって、本試験系でも UV-B 吸収が原因となる反応はとらえ難い可能性がある。」との文を追加した。

対応6 : 戸倉先生の回答の内容を6-3-3) と6-5)に記載した。)

公開シンポジウム
「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」

主催：
厚生科学研究
「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班
及び
日本動物実験代替法学会代替法評価委員会

2002,12,5

動物実験代替法の開発と利用
に関する調査研究

目的

●化粧品や医薬品の評価に用いられる動物試験法の代替法を評価・確立するために、代替法の開発研究および文献的調査および専門家による評価を行う。

研究内容

- ・（眼刺激性試験代替法のバリデーション）
- ・代替法に関する国際情勢の調査と国際対応
- ・皮膚吸収性試験代替法の検討
- ・光毒性試験代替法の検討

In vitro代替法による安全性評価

一般的な利点

- ・動物愛護に寄与する。
- ・多数の被験物質を迅速かつ経済的に評価できる。
- ・感度が高い。
- ・再現性が高い。
- ・実験者や環境の安全確保に有利。
- ・作用機序解明に便利。

一般的な問題点

- ・試験法の能力や限界について、バリデーションデータを基にした十分な知識を持たない者が使用したり、その結果を評価すると大きな過ちを犯す可能性が高い。

新しい試験法の評価

- ・EU: ECVAMはバリデーションとpeer reviewによる評価
EPISKINとTER皮膚腐食性試験法、3T3-NR光毒性試験法などを承認
- ・US: ICCVAMがpeer reviewによる評価
CorrositexとLocal Lymph Node Assayは評価済。
EPISKIN、EpiDerm法、TER法はコメント募集中。
急性毒性試験の初期量設定のためのin vitroデータの利用に関する指針
- ・日本：ケースバイケース
代替法を用いる眼刺激性評価スキーム報告

OECDにおける対応

代替法のバリデーションと行政的受け入れの基準

- ・Solna会議(1996)
- ・Stockholm会議(2002)

代替法関連OECDガイドライン

- ・急性毒性試験(2001)
従来法(TG401)の廃止とTG420: 固定用量法, TG423: 急性毒性等級法, TG425: 上げ下げ試験法
- ・光毒性試験代替法 (2002) TG 432: 3T3-NR法
- ・皮膚腐食性試験代替法(2002) TG430: TER法、TG431: 再構築ヒト皮膚モデル法 (EpiDerm)
- ・皮膚吸収性試験代替法 (2002) TG427: in vitro, TG428: in vivo, 解説文書28

本プロジェクトによる代替法評価の意図

- ・文献やバリデーションデータに基づいて安全性評価のための動物実験代替法のperformance (長所・欠点・限界)を明らかにし、行政的に採用することの可否について考察する。
- ・代替法の専門家だけでなく、臨床医師、毒性学者、行政担当者を含めた、より広い専門家により代替法を評価する。
- ・必要に応じて、施設間バリデーション実施を勧告する。

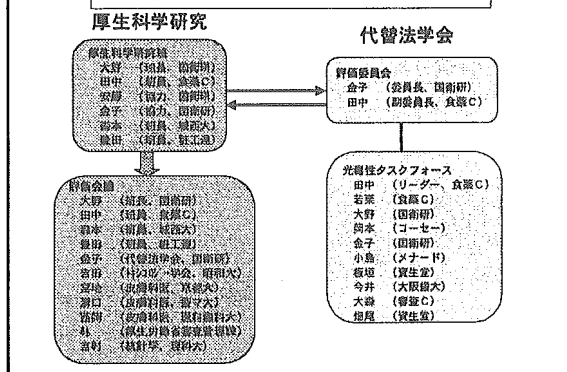
光毒性試験代替法を選択した理由

- 光毒性を示す薬物や生活関連物質が多くあり、その中には重篤な障害を起こすものがある。
- オゾン層の破壊の進行により、今後更に光毒性評価の重要性が高まる。
- 光毒性試験代替法が近い将来OECDで採用される可能性が高い。
- 光毒性試験代替法の専門家の協力を得られた。

光毒性の種類

- 医薬品や化学物質等との相互作用による障害
- 光刺激性
急性の一次刺激反応で用量・濃度依存的な反応として検出される反応。
- 光感作性、光遺伝毒性、光発ガン性

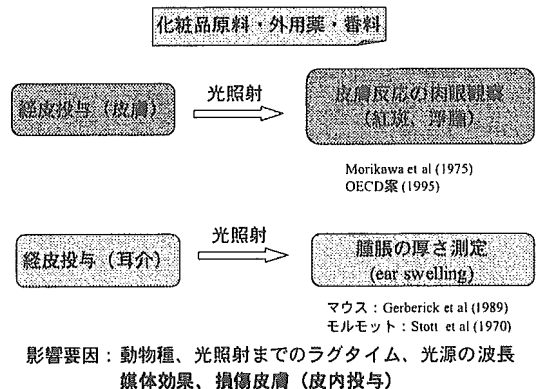
代替法の評価のための組織図



目次

- 第1章 序
 - 第2章 光毒性試験代替法について
 - 第3章 In vivo光毒性試験法について
 - 第4章 光毒性試験代替法について
 - 4-1) はじめに
 - 4-2) 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する光毒性試験方法(3T3-NR法)の評価
 - 4-3) 3T3-NR法以外の方法について
 - 4-4) 考慮すべき事項
 - 4-5) 関連項目
 - 第5章 標準的試験法の提案
 - 第6章 まとめ
- 資料、補足

in vivo光毒性試験法



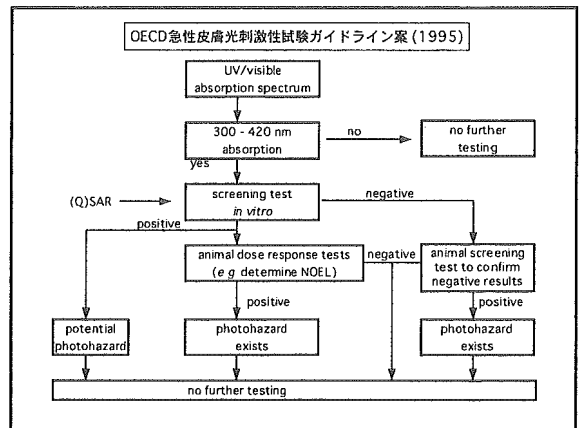
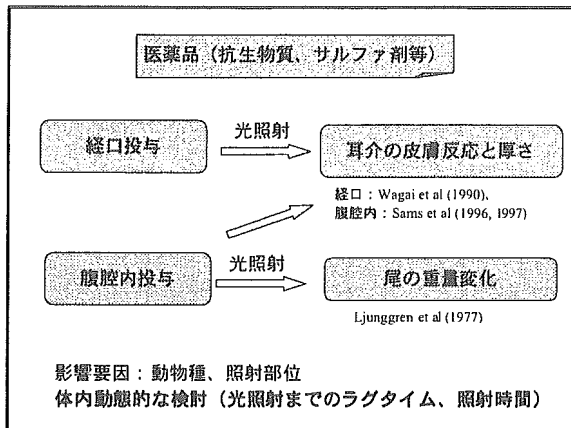


Table 3. 動物を用いる急性毒性試験に関する試験法の比較

動物種	Morikawa (1975)	急性皮膚光刺激性試験 (OECD案 1995)	低毒有害・化粧品刺激性試験 (2001)
動物種	ハートレイ系白色モルモット (約400g) あるいは白ウサギ (2.5-3.0kg)	ウサギ (2.0-3.5kg), モルモット (300-500g), マウス (20-30g) の各動物種	皮膚刺激方法として、白色ウサギ、又は白色モルモット (Morikawa, Sams, Stoltz) を用いることとする
照射部位	10E	照射しずれば10E (皮膚を照射、4Eを非照射)	照射しずれば皮膚3E (照射として7E皮膚以上照射する非照射部位、及び適当な非照射部位を設ける)
照射	UV-A領域のランプ、UV-B領域のランプ、UV-C領域のランプなどを用いる。照射時間: 2時間以内	UV-A領域のランプ、UV-B領域のランプ、UV-C領域のランプを用いる。照射時間: 110分	UV-A領域のランプ、UV-B領域のランプ、UV-C領域のランプを用いる。照射時間: 10-15分
照射量	0.05mJ/2x2cm ² 照射30分後に照射	1.5x1.5cm ² 0.025mJ/cm ² 照射30分後に照射	0.025mJ/2.5x2.5cm ² 照射30分後に照射
判定	24, 48, および72時間後に照射部位に紅腫、浮腫を判定	照射: 4, 24, 48, および72時間後に照射部位に紅腫、浮腫を判定	24, 48, および72時間後に照射部位に紅腫、浮腫を判定
評価	照射部位、非照射部位の反応を判定し、照射部位を有視して判定する	照射部位、非照射部位の反応を判定し、照射部位を有視して判定する	照射部位、非照射部位の反応を判定し、照射部位を有視して判定する

8-methoxypsoralen の光毒性反応の種差と最低红斑惹起用量

Species	Phototoxic Reaction to 8-MOP				MED (ergs./cm ²)
	0.0025%	0.001%	0.0005%	0.00025%	
Rabbit *	10/10(4.0)	8/10(2.9)	3/10(1.8)	0/10	3.5 × 10 ⁶ (± 1.4 × 10 ⁶)
**	8/10(2.6)	1/10(1.3)	0/10	0/10	3.0 × 10 ⁶ (± 1.8 × 10 ⁶)
Rat *	10/10(3.0)	9/10(1.9)	2/10(1.5)	0/10	3.3 × 10 ⁶ (± 1.0 × 10 ⁶)
Mouse *	0/10	0/10	0/10	0/10	
Hairless Mouse	1/6(1.2)	0/6	0/6	0/6	
Guinea Pig	10/10(2.1)	2/10(1.2)	0/10	0/10	7.2 × 10 ⁶ (± 3.1 × 10 ⁶)
Miniature Swine	0/5	0/5	0/5	0/5	5.9 × 10 ⁶

Phototoxic reaction to 8-methoxypsoralen (8-MOP) was read at 48 hr and minimal erythema dose was determined at 24 hr. The hair cycle was at the telogen* and anagen** phase.

Morikawa et al (1974)

光増感物質の in vivo 光毒性試験結果 (ウサギ、モルモット)

Compound	Rabbit		Guinea Pig	
	no UVL	UVL	no UVL	UVL
Chlortetracycline	0/10	0/10	0/5	0/5
Demethyltetracycline	0/5	0/5	0/10	0/10
Phenothiazine	0/10	10/10(2.7)	8/10(1.8)	10/10(2.5)
Chlorpromazine	0/10	8/10(2.3)	0/10	0/10
Prochlorperazine	0/10	3/10(2.0)	0/10	0/10
Sulfanilamide	0/10	0/10	0/10	0/10
Teibutamide	0/10	0/10	0/5	0/5
Stilben	0/6	0/6	0/10	0/10
Griseofulvin	0/10	0/10	0/10	0/10
Quinacrine	0/4	0/4	0/5	0/5
Coal tar derivate	1/4(1.0)	4/4(2.8)	0/5	5/5(1.8)
Acridine	0/5	5/5(2.6)	0/10	10/10(2.1)
Dibromofluorescein	0/4	0/4	0/10	0/10
Eosin Y.S.	0/6	0/6	0/10	0/10
Rose Bengal	0/6	0/6	0/10	0/10
Hexachlorophene	8/10(2.0)	9/10(2.0)	8/11(7.7)	6/11(3.3)
Bithionol	0/7	0/7	0/10	0/10
Fenitlor	0/13	4/13(1.5)	0/10	0/10
Irgasan CF ₃	0/10	0/10	0/10	0/10
3,3',4',5-TCSA	2/8(2.0)	10/10(3.6)	0/10	12/12(1.5)
3,4',5-TBS	0/10	0/10	0/12	0/12

Materials were tested in 1% concentration in appropriate solvents such as acetone, ethyl alcohol, and water.

Morikawa et al (1974)

動物を用いる光毒性試験法の比較

動物種	Morikawa (1975)	急性皮膚光刺激性試験 (OECD案 1995)	低毒有害・化粧品刺激性試験 (2001)
動物種	ハートレイ系白色モルモット (約400g) あるいは白ウサギ (2.5-3.0kg)	ウサギ (2.0-3.5kg), モルモット (300-500g), マウス (20-30g) の各動物種	皮膚刺激方法として、白色ウサギ、又は白色モルモット (Morikawa, Sams, Stoltz) を用いることとする
照射部位	10E	照射しずれば10E (皮膚を照射、4Eを非照射)	照射しずれば皮膚3E (照射として7E皮膚以上照射する非照射部位、及び適当な非照射部位を設ける)
照射	UV-A領域のランプ、UV-B領域のランプ、UV-C領域のランプなどを用いる。照射時間: 2時間以内	UV-A領域のランプ、UV-B領域のランプ、UV-C領域のランプを用いる。照射時間: 110分	UV-A領域のランプ、UV-B領域のランプ、UV-C領域のランプを用いる。照射時間: 10-15分
照射量	0.05mJ/2x2cm ² 照射30分後に照射	1.5x1.5cm ² 0.025mJ/cm ² 照射30分後に照射	0.025mJ/2.5x2.5cm ² 照射30分後に照射
判定	24, 48, および72時間後に照射部位に紅腫、浮腫を判定	照射: 4, 24, 48, および72時間後に照射部位に紅腫、浮腫を判定	24, 48, および72時間後に照射部位に紅腫、浮腫を判定
評価	照射部位、非照射部位の反応を判定し、照射部位を有視して判定する	照射部位、非照射部位の反応を判定し、照射部位を有視して判定する	照射部位、非照射部位の反応を判定し、照射部位を有視して判定する

(注) Isocha (ヘアレスマウス), Ljunggren (マウス), Morikawa (モルモット・ウサギ), Sams (モルモット), Stoltz (モルモット)