

③提案法で光毒性が陽性と出た物質の中には in vivo 試験で陰性となるものもあったが、false negative は無い。全体として感度、評価の一致性が高い。

C-1-2) 評価委員会での審議

評価委員会の審議結果を以下に要約する。

C-1-2-1) 提案は評価に値するか？

in vitro 光毒性試験としては既に 3T3 細胞を用い neutral red 取り込みを指標とする光毒性試験法(3T3-NRU 法)が OECD の専門家会議で承認されている。提案法は 3T3-NRU 法と同等の結果が期待できる。また、3T3-NRU 法では水難溶性の薬物では評価結果のばらつきが大きくなる可能性を平成 14 年度の報告で示しているが、提案試験法は水難溶性物質にも対応できる方法である。これは水難溶性のものが多い化粧品の評価においては重要である。更に、いずれの方法も簡便な方法であり、必ずしもクリーンベンチでの操作を必要としない。これらのことから、提案された光毒性試験バッテリーは評価委員会では評価する価値があるものと判断した。ただし、多施設バリデーションの結果が含まれていないため、評価委員会ではその妥当性に関する最終的な判断のためには、複数の施設で実施するバリデーション研究が必要であると判断した。

C-1-2-2) 開発のコンセプトの妥当性

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る。赤血球光溶血試験は細胞膜破壊を指標とする試験である。提案されたバッテリー法は両者を組み合わせることにより、多様な作用機序に基づく光毒性を評価できるとともに、光毒性のメカニズムに関する情報を得る事ができると考えられる。なお、膜破壊は酵母でも観察されることから、酵母と赤血球での本質的な差およびバッテリーを組む必要性について論議された。その結果を以下に示す。

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幾つかの反応がある。それらは、電子伝達に基づく機構(タイプ1)、酸素のエネルギー伝達に基づく機構(タイプ2)及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。水系ではタイプ2型の反応が中心と考えられる。一方、有機溶媒ではラジカル反応(タ

イプ1)が中心と考えられる。反応系が水系の赤血球光溶血試験や光細胞毒性試験では主にタイプ2の光毒性を捉えることが可能である。一方、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とらえることができると期待できる。

一方、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が見られるものと想定されるが、赤血球で光毒性を検出できた物質の一部は酵母では捉えられないことがある。これは赤血球の膜構造は細胞膜のみから構成されているが、酵母では細胞膜とグルカン等の多糖類からなる細胞壁から構成されており、酵母の膜構造が赤血球より安定であることによると思われる。即ち、膜破壊作用の弱いものは捉えにくいと考えられる。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、false negative になる可能性がある。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試験の方が感度が高いと思われた。

また、酵母は有機溶媒に強く、エタノール、メタノール、アセトン、及び DMSO 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ない。一方、赤血球光溶血性試験では試験系において溶媒濃度が 1% になるように被験物質溶液が添加されるが、DMSO では溶血が現れる場合がある。

即ち、酵母は、細胞膜破壊を伴う光毒性に関する感度は若干低い、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思われた。これに対し、赤血球光溶血試験の方は、細胞膜破壊を伴う光毒性に関する感度が高く、作用機序が明確であること、弱い作用を感度良く検出できる利点があると思われた。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全てではないが、多くをカバーできると考えられた。

C-1-2-3) 3T3-NRU 法との比較

OECD が提案している 3T3-NRU 法は、液体培地と細胞を使用した方法である。この方法では、水難溶性被験物質を培地全体に分散させることが難しい。また、用いた媒体が細胞に毒性を示す場合があり、媒体の選択にも注意を要する。実際、3T3-NRU 法では水難溶性の薬物では anthracene や

amiodarone、fenofibrate などの水難溶性物質では評価結果の施設によるばらつきが認められている（平成14年度厚生労働科学研究報告書）。一方、酵母光生育阻害試験は、寒天ゲルで菌を培養する方法である。この方法では、培地上に被験物質を乗せるだけで水溶性、水難溶性を問わず、被験物質が良好に拡散することが期待できる。

赤血球光溶血試験はプレートの底面に付着している 3T3-NRU 法と異なり浮遊している赤血球と反応させる方法であり、膜破壊や蛋白変性を生じない溶媒を選択できる。

以上の点から、今回提案した本試験系は、3T3-NRU 法よりも耐溶媒性並びに評価可能な被験物質の範囲の両面から優れていると考えた。

C-1-2-4) 評価できる光毒性の内容

提案方法が毒性の有無を判定するのか、毒性の強さの段階付けか、あるいは定量的判定が可能かの問題に関して、酵母法および溶血法はいずれも試験結果が数値で示され、光毒性の強さについてある程度の情報を得ることができる。しかし、バッテリーでの評価の結果は光毒性の有無の判定のみである。

C-1-2-5) 被験物質の適用範囲の妥当性

化粧品及び化粧品基剤を含む化粧品原料の光毒性の評価を目的にしているが、提出データによれば香料(8)、紫外線吸収剤(5)、薬剤(4)、抗生物質(4)、染料(3)についても試験が行われており、医薬品、医薬部外品なども含む化学物質一般にも応用可能と思われる。

C-1-2-6) SOP について

C-1-2-6-1) SOP は理解しやすいか？

試験法の SOP の記載は、全くの素人でない限り理解に問題は生じないが、多施設バリデーションを実施する際にはいくつか修正する必要があるとされた。その詳細は省略する。なお、SOP を一般化するには多施設バリデーション結果を踏まえ、その修正について議論する必要があると考えた。

C-2-6-2) SOP に必要な機器、器具、器材は十分に記載されているか？

必要な機器、器具、器材については十分に記載されていた。なお、光照射に際しては、試験条件を明確に規定する必要があること、光源の特性を確認することの必要性の記載、

及び照射むらを少なくするために、場合によってプレートを回転させたり、移動させたりすることの必要性について記述されるべきとされた。

C-1-2-6-3) 結果の判定方法の妥当性

酵母光生育阻害試験の判定基準が以前の論文では判定基準が 2mm となっていたが、今回の SOP では 5mm となっており、今回の判定基準を決めた根拠となるデータを示して欲しいとの指摘に対し、判定基準を 2mm とした場合、false negative はなくなるが一致率が低くなるため、判定基準を変更した、また、2mm の判定基準では、静置したディスクのわずかなずれ動きが判定に影響を及ぼすことから幅を広げた、と回答された。

一方、施設内バリデーションの結果では 5mm の基準値よりほんのわずかな小さい値の被験物質が多くあったことから、グレイゾーンの設置の必要性について議論され、グレイゾーンを設置することとされ、阻止帯の差が 2mm 以上 5mm より小さい場合は疑陽性とする とされた。

赤血球光溶血試験の判定基準 (5-10%) を決めた根拠については、不十分な洗浄や赤血球の状態などによっては少量の溶血がみられることもあるため、5%までは許容範囲とした。さらに in vivo 試験において、±、+と評価していることから、赤血球光溶血試験においても 10%までグレイゾーンを設けた判定基準とした、と回答された。

陽性の判定において、1 濃度でも陽性となれば陽性と判定するのかが明確ではなかったが、1 濃度でも再現性の有る陽性結果が得られれば光毒性陽性と判断するとされた。

二つの方法のうち一方しか結果が得られなかった時のバッテリー試験としての判定について検討され、一つの方法で陽性の場合には当該被験物質は光毒性陽性と判断するとされた。陰性の場合には、もう一つの方法の結果によって評価が左右されるので判定不能とする とされた。

なお、これらの内容をバリデーションのために作成する SOP で明確にすべき とされた。

なお、濃度設定の SOP では最高溶解濃度を含む 3 段階と一義的に定められているが、実際にはいくつかの濃度で実験が行われていることがあった。必要性に応じて濃度設定の変更が可能なように SOP を変更すべき とされた。

また、実際の評価において、繰り返し試験

を行った場合の判定方法については、原則として2回の試験結果の平均値を採用するが、判定が大きく食い違う場合には、追加試験を行うとSOPに明記するべきとされた。

C-1-2-6-4) 被験物質の最高濃度について

溶媒の選択基準や最高濃度の設定について曖昧であると、光毒性の判定結果に影響がでる可能性があることから、未知の被験物質について、溶媒の選択基準と最高濃度の設定方法を統一するべきと提案者にコメントされた。

C-1-2-6-5) 光源

光源に SOL500 を用いる場合、24 ウェルプレートや 6 ウェルプレートをすべて使用するとかなりの照射量ムラができる。むらの無い部位にプレートを置く方法と照射の途中でプレートの向きを変えるか、使用するプレート数を制限する方法が示された。

C-1-2-6-6) その他

赤血球光溶血試験法において、赤血球から遊離したヘモグロビンを定量する際、540nmの波長での吸光度では、ヘモグロビン変性が生じたとき溶血性を低く見積もってしまう懸念がある。そこでヘモグロビン変性による影響の少ない 525nm でも実施することが提案された。

C-1-2-7) 試験は容易に実施できるか？

光照射の器械さえあれば操作は簡単と思われた。なお、赤血球の完全溶血液の調製が溶媒のエバポレーションを行うなど、用時調製だと面倒なステップが含まれている。Triton X-100 添加などの簡便な方法で対応できないのか、議論され、改善するとされた。なお、多施設バリデーションを実施する際には、経験の無い施設には技術トランスファーが必要である。

C-1-2-8) 提案書に記載されたバリデーションの種類

提案者の施設内での再現性が評価されているが、公平な評価を行う上では多施設バリデーションの結果が必要である。

C-1-2-9) 申請者の行ったバリデーションの結果について

C-1-2-9-1) 被験物質の妥当性

被験物質として 24 物質 (香料(8)、紫外線

吸収剤 (5)、薬剤(4)、抗生物質(4)、染料 (3)) が使用され、評価されている。この中には提案試験法の特徴を確認するために水難溶性物質も多く含まれている。また、紫外線吸収剤や香料などの化粧品原料だけでなく、薬剤や抗生物質も含まれ、それらについて in vivo と対応する結果が得られている。これらのことから、化学物質全般を対象とした試験法の評価のための被験物質として、選択はほぼ妥当と思われた。

一方、今後のバリデーションに際しては、tetracycline や ketoprofen, amiodarone, nalidixic acid, ofloxacin, fenofibrate, demecrocycline など EU/COLIPA のバリデーションで施設により false negative となった物質も採用することが望ましいとされた。

C-1-2-9-2) データの信頼性

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、技術的には問題無いと考えられる。一方、施設が GLP 認定施設ではないこと、SOP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の正文が提出され、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」と見なして良いと考えた。

生データと個別データ、まとめの結果との対比については、多くのデータについて二次データとの相同性が確認されたが、赤血球光溶血試験のまとめのデータには被験物質毎に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いう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回同じ判定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。

評価委員会で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ときに終了するとのことは試験法 SOP 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無いとされた。また、このようにすると3回の試験結果の平均をとって

評価するという SOP 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無い限り行った試験結果全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 SOP に明確に記載するべきであるとされた。

C-1-2-9-3) 再現性

繰り返し実験でのデータのばらつきは酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験のいずれにおいても多くの物質において極めて小さく、ある程度の経験のある者が実施すれば、施設内再現性の良い方法であると思われた。

施設間再現性については、多施設でのバリデーションが実施されていないことから、判断できなかった。

C-1-2-9-4) in vivo データの妥当性

適切な方法で行われたモルモットでの実験結果と比較している。しかし、その報告では評価点の平均値は与えられているが個々の値は提出されておらず、今回の実験での評価点の精度について判断できない。但し、提案者の施設で実施された 0.02% の 8-methoxypsolarene の歴史データの変動係数は 0.16-0.26 とばらつきも少なく信頼できる。また、提案試験法を評価する上でモルモットの結果と比較することの妥当性について議論され、論文等に示された動物実験データやヒトデータとの比較も必要であるとされた。

C-1-2-9-5) In vivo データとの対応性

動物実験結果との比較では false negative は無く、false positive は幾つか認められた。しかし、false positive とされた薬物の多くはヒトであるいは他の論文では陽性とされたものであり、バッテリーとしての光毒性物質の予測性は良いと思われる。但し、酵母法および溶血法のそれぞれ単独では false negative が出ていることに留意すべきである。なお、false negative が 0%であるという判定は陽性物質 9 検体での結果であることにも留意すべきである。

C-1-2-9-6) 試験法の頑健性

異なる光源を用いた論文データを比較し、酵母 4 例、赤血球 2 例、結果が異なっていた。使用する溶媒、酵母の種類、羊赤血球の年齢による相違や赤血球の種による相違があるか否かについては不明である。これらの事を調べるためには更にバリデーションが必要であ

る。

C-1-2-9-7) 判定基準

酵母光生育阻害試験において galoxolide、chlorpromazine、anthracene のように、結果が判定基準に近いものが多くあった。これらは判定基準を少し変えるだけで、判定が変わる可能性がある。結果の判定基準は蓄積されたデータに基づいてどこかの値に決めるものではあるが、基準値に近いところに多くの物質が集まることは、判定の不確実性につながり、望ましくない。このような場合は、グレイゾーンを設置するのが良いとされた。

C-1-2-9-8) 結果の記録方法について

結果をまとめた記録紙からは被験物質の濃度による用量依存性がどちらの試験法でも認められなかった。これはどちらの試験法も評価のエンドポイントについて、光照射の有無による差のみを求めるように規定されているためである。しかし、照射・非照射の用量反応関係は重要であるので、酵母光育成阻害試験では阻止帯を、赤血球光溶血試験では、溶血度の測定値から用量反応を確認するようにした方がよいとされた。

C-1-2-10) 動物福祉面からの妥当性

酵母の方法は問題なし。赤血球光溶血試験は羊から採血した血液を用いている。動物材料を少しでも減らすと云う点から云えば、人血での代用可能性もあるが、羊は採血後に屠殺せず、同じ動物から何度も採血することができることから、動物福祉面での問題は無いと考えた。

C-1-2-10) コストからの妥当性

2つの試験を行うことから材料費や手間の点で 3T3-NRU 法よりコストがかかるかも知れない。また、酵母法では 25℃と通常のインキュベーションと異なることによるコストがかかるかも知れない。

C-1-2-11) その他の面からの考察

提案法を受け入れる条件として、3T3-NRU 法単独よりも今回の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同等であっても他のメリットがあれば良いのかということについて、検討され、同等ならば受け入れても良いのでは無いかとされた。

C-1-2-12) 総合評価

試験法の背景および提出データの結果に基づく、現時点での総合評価として、以下の様な利点があり、光毒性の有無を判断することを目的とする化学物質のスクリーニングに有用と思われた。しかし、多施設バリデーションを実施して、その結果を見て最終的な総合評価を行うべきであるとされた。

試験法の利点

- ① 実験方法に培養細胞を用いていないので試験法が比較的簡便である。
- ② 水難溶性物質に対しても適応可能である。
- ③ 化粧品や化粧品原料だけでなく、広く一般の化学物質にも使用可能である。
- ④ 特性の異なる2種の試験法の組合せによって異なる毒性機序に基づく光毒性を検出可能である。
- ⑤ 光毒性物質の予知の際に最も困る false negative は出なかった。

なお、提案された試験法で捉えられるものは光増感作用のある物質である。光感作性については、この試験法で陽性と評価された物質を光蛋白結合性等の他の試験法で評価することが必要と考える。また、3T3-NRU 法も含め、これらの試験系で陽性結果が得られた物質を産業的に利用する場合には、リスク評価を行うための試験が必要となる。

多施設バリデーションを実施するには、他の施設が誤解することがないように SOP の詳細を検討する必要がある。また、提案された方法が適切か否かを判断する場面では、3T3-NRU 法と比較されることになることから、バリデーション研究の結果として明確な結論を導くためには、同様の条件下で 3T3-NRU 法を同時に実施することが望ましいが、参加施設への負担をも考慮し判断すべきである。

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験とのバッテリーを組む必要性については、その理論的な背景と実際のデータの両面からの疑問が十分払拭されておらず、更に検討する必要がある。

なお、多施設バリデーションの際に提案者の SOP を、評価委員会やバリデーション委員会が、提案者の了解を得ずに、勝手に変更する事は許されないことを確認した。

C-2) 多施設バリデーション

多施設バリデーションの目的は、①施設間のばらつきを評価する。これは PIF や MPE レベルでの施設間の比較では大きな差が生ずる可能性があることから、3T3-NRU 法との

比較の上で評価することが重要であるとされた。しかし、作業量の関係から、3T3-NRU 法での試験を平行して行うのではなく、Dr Spielmann らのバリデーション結果と比較すべきとされた。また、②in vivo 試験結果との対応性について詳細な検討を行うためには多数の被験物質が必要であるが、それは実施困難であることから、バリデーション目的として、施設間のバラツキ評価を重視すべきとされ、被験物質の数や種類を絞ることが提案された。また、過去のデータを基にクリティカルな被験物質（明確な陽性、陰性、境界領域、ばらつきや誤評価の多かったもの等）を選択し、なるべく少数で結論が得られる事が重要であるとされた。また、比較すべき in vivo データとは動物実験結果かヒトデータかということについて議論され、ヒト試験では光感作性と光毒性とが混在している可能性があり、ヒトでの結果が明確な場合を除き、動物データと比較すべきであるとされた。③提案試験法の利点を確認する。④製品への適応性に関しては、陽性を示す製品は入手できる可能性は低いこと、クリーム等に被験物質を添加したとしても、その光毒性を同時に動物実験で確認する必要が生ずることから、困難であるとされた。

なお、多施設バリデーションは3ヶ月程度で終了できる程度の被験物質数にすべきとされた。また、可能であるならば、ECVAM との共同バリデーションの途を探るべきとされた。

C-3) 多施設バリデーションの結果

C-3-1) データクリーニング

バリデーション実施機関より酵母光生育阻害試験では本試験と予試験合わせて 228、赤血球光溶血試験では同じく 192 のデータファイルが提出された。これらについて妥当性について検討し、前者では 39、後者では 183 のファイルについて疑義があり、試験実施施設と連絡をとり、必要な修正を行った。その内容は①何かしらの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)、③SOP 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入力され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後データを確定し、被

験物質コードが開示された。

C-3-2) 陽性対照物質の施設内再現性

酵母光生育阻害試験において、陽性対照物質 8-MOP は1施設で1回陽性対照であると判定できず疑陽性と判定された。それ以外はすべて陽性と判定された。

赤血球光溶血試験において、陽性対照物質 acridine は全ての試験で陽性と判定された。

C-3-3) バッテリーシステムとして再現性

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バッテリーシステムとしての評価結果の施設内再現性の評価に際しては、試験実施手順書に規定されている2回の平均をとらずに、1回毎の試験の組合せを行って判定した。その結果、1施設を除けば、ほとんどの施設で判定が異なることはなかった。今後、再現性の悪かった施設における原因を検討する必要がある。

C-3-4) バッテリーシステムでの判定とその施設間再現性

バッテリーシステムでの判定結果と *In vivo* の判定との一致割合の結果は、acridine、chlorhexidine、bithionol、及び 4-5-butyl-4-methoxydibenzoylmethane において、すべての施設で判定が一致した。SLS と 6-methylcoumarine は1施設で他の3施設と異なった判定が下された。一方、anthracene、amiodarone、chlorpromazine については2施設の判定が他の2施設の判定と異なった。

一方、赤血球光溶血試験での測定波長を 520-525nm としたときの判定結果は acridine、chlorhexidine、chlorpromazine、bithionol、及び 4-5-butyl-4-methoxydibenzoylmethane で測定結果が全ての施設で一致し、amiodarone の判定は2施設が陽性であったが他の施設は疑陽性と陰性であった。他の3物質 (anthracene、SLS、6-methylcoumarin) については1施設のみ判定が他の3施設と異なっていた。

C-3-5) バッテリーシステムでの判定と *in vivo* 判定との一致性

バッテリーシステムによる判定結果を赤血球光溶血試験における吸光度測定波長の違いから表 C-1 と表 C-2 にまとめた。*in vivo* 結果との一致性については陽性物質を陽性と判定する能力においては全施設の平均は

63.9% (表 C-2 では 83.3%)、陽性物質を陽性、或いは疑陽性と判定する力はそれぞれ 94.4% (同 94.4%)、陰性物質を陰性と判定する力は 38.9% (38.9%)、判定の *in vivo* 結果との一致率は 50% (58.3%) であった。即ち、疑陽性も含めて陽性と判定すれば、陽性物質の識別率は1施設を除けば 100% であった。陰性物質の識別率は低かったが、この理由については *in vivo* 試験結果の妥当性も含め、更に検討する予定である。

表C-1: バッテリーシステムでの判定結果と施設間再現性 (%)

	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
一致性	67	0	67	50	50	67	50.0

感度 I : 陽性物質を陽性と判定

感度 II : 陽性物質を陽性或いは疑陽性と判定

特異度 : 陰性物質を陰性と判定

一致性 : 判定の *in vivo* 結果との一致性

溶血性を 540nm で測定

表C-2: バッテリーシステムでの判定結果と施設間再現性 (%)

	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
一致性	67	33	67	50	67	67	58.3

表の説明は表C-1と同じ。

溶血性を 520-525nm で測定

C-4) 新しい代替法の募集

班会議では、新たな代替試験法を募集することについて検討し、本研究班が平成16年度以後継続するとの保証は無いが、場合によっては研究班で評価されない可能性を明示した上で募集したところ、皮膚感作性試験代替法として Local Lymph Node Assay (LLNA) の放射性同位元素を使用しない変法がダイセル (株) より提案された。また、皮膚三次元モデルを用いる皮膚腐食性試験代替法が大野より提案された。これらを班会議で審議した結果、平成16年度に審議するとされた。

C-5) ECVAM との協力関係の構築

ECVAM の Hartung 博士は日本のバリデーション及び評価への協力に同意し、プロトコールなどの計画段階から試験結果の解析への協力を約した。また、日本および ECVAM と ICCVAM との共同バリデーションができればもっと良いと述べた。また、基準に則ったデータを伴った試験ならば ESAC へ上程への協力についても了承した。また、Hartung 所長は日本にも ECVAM や ICVAM に相当する機関を設立することの希望が述べられた。(添付資料 5)

E. まとめ

- 1) 資生堂より提案された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を評価委員会で一次評価した結果、この方法が被験物質の識別に有用な方法であり、水難溶性物質に適応可能であると思われた。しかし、多施設でのバリデーション結果が無いことから、日本動物実験代替法学会に多施設バリデーション実施を依頼した。
- 2) 多施設バリデーションの結果についての一次評価では、酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験の結果、及びそれらのバッテリーとしての判定結果の再現性は 1 施設を除き比較的良いと思われた。特異度は低いが陽性物質を陽性或いは疑陽性と判定する感度は高かった。また、赤血球光溶血試験においてヘモグロビン測定のための波長は 520-525nm の方が成績が良かった。
- 3) 放射性物質を用いない LLNA 変法を評価することとされた。
- 4) 代替法のバリデーションと評価についての ECVAM との協力関係ができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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試験代替法の評価結果報告, JSAAE 2004 印刷中
- 2) Yasuo Ohno, The validation and

regulatory acceptance of alternative methods in Japan. Proceeding of Fourth World Congress, 643-655, 2004

2. 学会発表

- 1) 大野泰雄、最近の非臨床試験ガイドラインの動向_特に急性毒性試験と in vitro 代替法について、安全性評価研究会 2003 年春のセミナー (2003.5.17)
- 2) 大野泰雄、安全性試験の代替法としての In vitro 試験_特に医薬品開発における応用一、安全性評価研究会 (2003.8.30)
- 3) 大野泰雄、近年の代替試験法の開発とその受け入れ状況、化学物質点検推進連絡協議会 (2003.9.3)
- 4) 大野泰雄、「動物実験代替法の国際情勢と我が国の取り組み」日本学術会議トキシコロジー研連講演会 (2003.12.3)
- 5) 赤石樹泰、中澤憲一、佐藤 薫、斉藤 洋、大野泰雄、伊藤 芳久、Functional modifications of voltage-gated Ca^{2+} channels by 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, in cultured rat dentate granule cells. 第 77 回日本薬理学会総会、大阪(2004.3.8)
- 6) 大野泰雄、「動物実験代替法研究の重要性とその問題点」日本薬理学会シンポジウム「薬理学における代替動物実験の展開」第 77 回日本薬理学会総会、大阪 (2004.3.10)
- 7) 宮島敦子、簾内桃子、酒見和枝、大野泰雄、尿素系農薬 Linuron のヒト培養肝細胞における薬物代謝酵素に及ぼす影響、日本薬学会年会(2004.3.29)

H. 知的所有権の取得状況

無

I. 謝辞

本研究の遂行にあたっては日本動物実験代替法学会の評価委員会(田中憲穂委員長)とバリデーション委員会(吉村 功委員長)、バリデーション参加機関、及びそれぞれに属する委員及び職員の方々のお世話になった。ここに感謝申し上げる。

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、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

綿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。

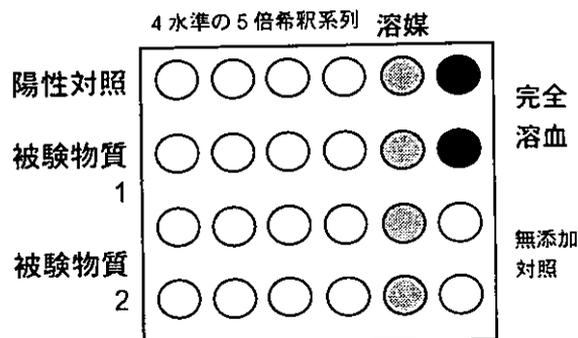
5. 8 被験物質の添加

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枚のプレートが必要とする。

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, (株)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. 11 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. 12 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
$5 \leq L < 10$	±	更なる評価が必要
$10 \leq L$	+	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、(株)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

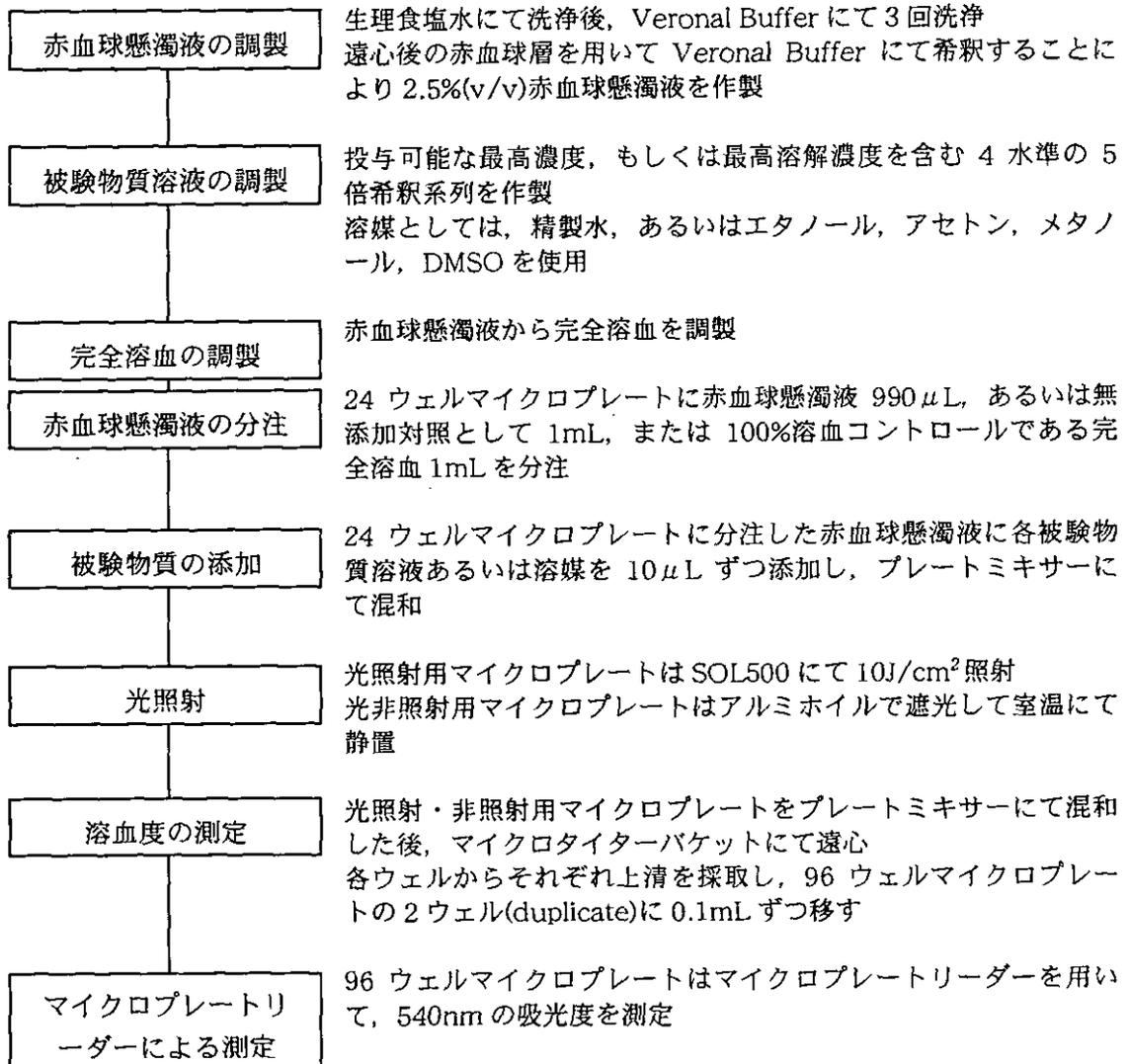
10 参考文献

- 1) Sugiyama M. et al. (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of

- Chemicals:(l) 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



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

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

4.2. 器具類

1) 6 ウエ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) アルミ箱

8) ビニル袋

4.3. 滅菌

ガラスびん、濾紙円板、ピンセット、アルミ箱および 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 H 1 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. トップアガール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 ウエルマイクロプレートに被験物質添加用ウエル, 溶媒対照ウエルおよび陽性対照ウエルを割り付ける。

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エ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エルへの移動は、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 ウエ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エ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

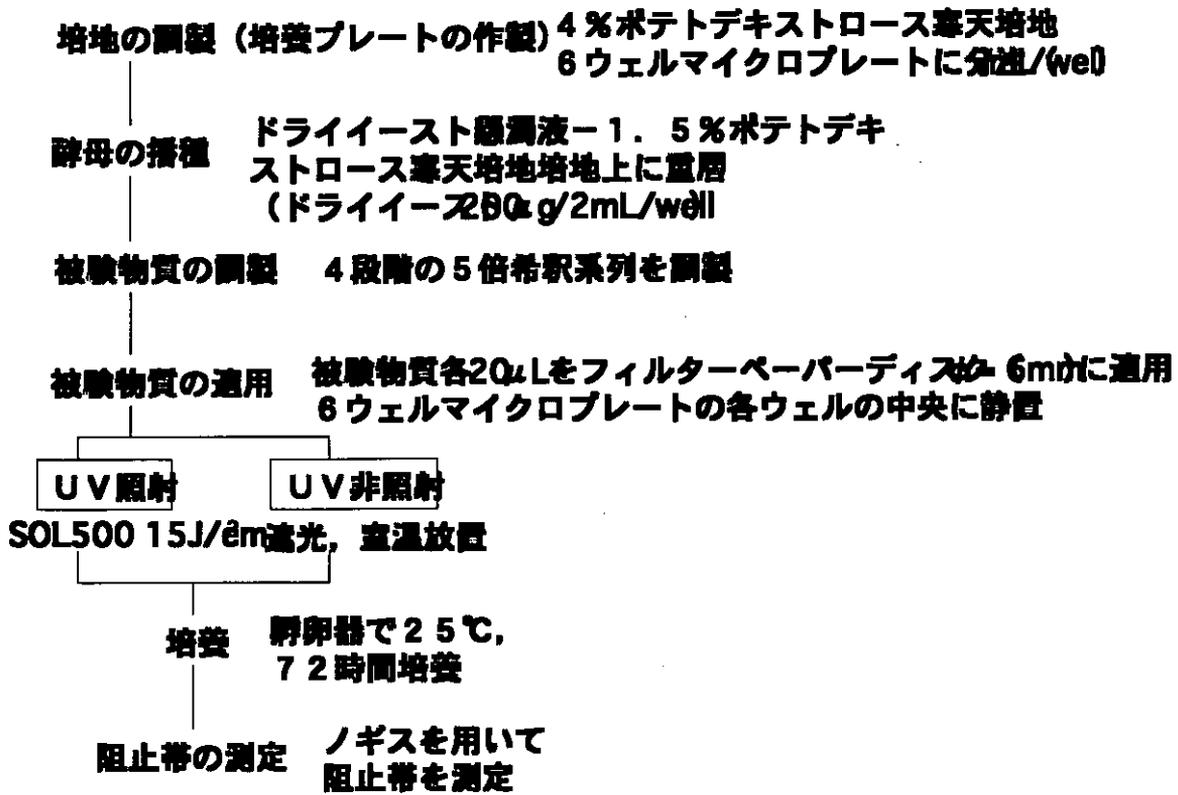
以下の試験記録は、記録保管場所に保管する。

- 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

資生堂より提案のあった酵母光生育阻害試験および光溶血試験を用いた
光毒性試験バッテリーの一次評価報告

評価委員会委員長 田中憲穂

要旨

平成14年度の厚生科学研究班の決定により、資生堂から提案のあった酵母光生育阻害試験と溶血性を指標とした光毒性試験を組み合わせた光毒性試験バッテリーを評価した。評価委員会での一次評価の結果、本試験法は不溶性物質への適応性の良い新たな光毒性評価試験法であるとともに、バッテリーを組むことにより適応可能な被験物質の範囲が広がるとともに、false negative が無くなり、適切な方法であると判断された。しかし、提案者のデータのみであり、データの信頼性や施設間でのばらつきについての情報を得るためには、多施設バリデーションの実施が必要であり、日本動物実験代替法学会に依頼することとされた。

A. 目的

代替法に関する厚生労働研究班で評価を希望する新しい動物実験代替法の募集について、資生堂より独自の光毒性代替法の申請があった。これは酵母を用いる光毒性試験法（酵母光生育阻害試験）と溶血性を指標とした光毒性試験（赤血球光溶血試験）を組み合わせたものであり、申請書に示された提案施設での試験結果では感度、再現性、in vivo 結果との対応性が3T3-NR法に匹敵するとともに、3T3-NR法で不得意とする不溶性の被験物質についても評価可能であることが示されていた。そこで、本研究班では平成15年度に客観的な検討を行うとした。なお、本試験法については多施設によるバリデーションが実施されていないことから、評価委員会で検討したのち、適切と判断された場合には施設間バリデーションを行うように勧告し、その結果を待って、再度評価することになる。

B. 評価方法

B-1) 評価組織

評価委員会は日本動物実験代替法学会の協力を得て、光毒性試験の専門家および米国の代替法評価組織であるICCVAMでの評価に協力した経験を有する専門家、および統計の専門家により構築した。これらに委員会の名簿を以下に示す。

評価委員会

委員長

田中憲穂（食薬センター・秦野研究所 2003年1月より委員長）

委員

板垣 宏（資生堂・安全性分析センター）申請者でもあることから、会議においては情報提供のみ行い、審議には参加しなかった。

今井弘一（大阪歯科大学・歯科理工学）

大野泰雄（国立衛研 薬理部）

大森 崇（京都大学・医学部）

岡本裕子（コーセー研究本部・品質保証センター）

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）

若栗 忍（食薬センター・秦野研究所）

評価会議

委員長

大野泰雄（国立衛研 薬理部）

委員

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）申請者の属する施設の上司であることから、審議には参画せず、の森福義（ポーラ化成工業）が代行することとされた。

西岡 清（東京医科歯科大学医学部）

吉田佳督（厚生労働省医薬食品局審査管理課）

溝口昌子（聖マリアンナ医科大学皮膚科学）