

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）

なお、資生堂から提供された資料は以下のとおり。

○酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の組み合わせによる光毒性評価方法の提案

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) 酵母光生育阻害試験プロトコール

資料 3-3) 赤血球光溶血性試験プロトコール

資料 4) 被験物質リスト（規格、特性）

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、一致率及びその他の特徴

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、一致率及びその他の特徴

資料 7-3) 赤血球光溶血試験における感度、特異性、予測性、一致率及びその他の特徴

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) 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, AATEX 2, 183-191, 1994.

資料 9-2) 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, AATEX 2, 193-202, 1994.

資料 9-3) 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, p213-221.

資料 9-4) 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 AATEX 5, 268-277, 1998.

資料 10) 試験実施者の経歴に関する資料

資料 11) 試薬・被験物質管理記録等の生データ

資料 12) 酵母光生育阻害試験の生データ

資料 13) 赤血球光溶血試験の生データ

#### B-2) 秘密の保持と評価結果の公表について

審議結果は公開シンポジウムや研究報告書等で公開することを前提としているが、個人に関する情報は公開せず、また、委員にも配布せず、事務局で保管し、必要に応じて口頭あるいは書面提示の上で説明するべきとされた。申請資料に添付された個別データは委員に配布せず、必要があれば委員にコピーを配布するとされた。また、今回の申請資料に掲載されたデータに基づいて今回の目的を越えて、利用、解析、公表する際には個別に申請者に了解を得なければならないとされた。なお、既に論文等に発表されたデータの利用は自由とされた。

#### B-3) 評価委員の資格および申請者が評価委員を兼ねることについて

評価委員会委員の資格は以下のとおり。

板垣: *in vitro* 毒性専門家、代替法専門家、バリデーション専門家

今井: 光毒性の経験のある *in vitro* 毒性専門家

大野: 研究班長、トキシコロジスト、バリデーション専門家

大森: 統計解析の専門家

岡本: *in vitro* 毒性専門家、光毒性専門家

小島: *in vitro* 毒性専門家、バリデーション専門家、代替法評価の専門家

田中：評価委員会委員長、in vitro 毒性専門家、光毒性専門家

畑尾：毒性専門家、代替法評価の専門家

若栗：光毒性専門家

一方、板垣 宏氏は今回の申請者の一人であり、評価の公平性に対する疑問を生じさせる可能性があることから、評価委員会の審議により今回の評価委員からはずれることとされた。

#### B-4) 解析に使用するデータについて

資生堂より提供を受けた、生データおよび集計データに基づいて評価した。

#### B-5) 評価の行い方について

今回の申請では多施設によるバリデーション結果は添付されていないことから、評価委員会では、まず申請者により提出された申請内容を評価し、その結果多施設でバリデーションする価値があるとされた場合には代替法学会にそれを依頼する計画である。その際、評価委員会の審議によりプロトコール等が若干修飾される可能性があるが、その際は申請者の意向を尊重する。

### C. 評価結果

評価委員会では平成 15 年度において 4 回の会議を開催し、資生堂より提供された申請資料を評価した。

#### C-1) 申請試験法についての申請者の説明

申請法についての申請者の説明は以下のように要約される。

- ①申請法は被験物質の光刺激性の有無を判定するものであると位置づけられる。また、光感作性を判定するものではない。
- ②化粧品には非水溶性物質が多く、本法はそれらにも適用可能である。
- ③公表された動物実験データと in vitro 試験結果を対比させた。
- ④in vitro 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 は無かった。
- ⑤全体として感度、評価の一致性は高い。
- ⑥被験物質の in vivo での光毒性の有無に関して、Spielmann らのバリデーションでの評価と今回の in vivo 結果とは食い違いが若干ある。その原因は、彼らの評価はヒト情報に基づくものであるのに対し、申請者のデータはモルモットを用いて行った結果であることによる。
- ⑦寒天培地の上に酵母と培地を混ぜた培地を播くが、その厚さは 1-2mm 程度であり、紫外線照射が全ての細胞に届くと考える。

#### C-2) 評価委員会での審議

##### 1) 提案された光毒性試験バッテリー法は評価に値するか？

in vitro 光毒性試験としては既に 3T3-NRU 法が OECD の専門家会議で承認されており、近々通知される予定である。しかし、in vitro 光毒性試験をこれのみに制限する必要はない。一方、提案された方法は提出データにおいて、ある程度の in vivo 光毒性の予測能を持つことが示されており、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先の報告（平成 14 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究報告書）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。また、施設内バリデーションの結果では、false negative の無い試験系であることが示されている。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当評価委員会で評価する価値があるものと判断した。ただし、提出された資料には複数の施設で実施したバリデーション際の結果が含まれていないため、評価委員会ではその科学的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。なお、評価委員会では主に以下の点について、申請者の意見も聞きながら審議した。その結果を以下に要約する。

##### 2) 開発のコンセプトの妥当性について

酵母生育阻害試験は細胞膜と細胞小器官への作用の両方に対する毒性を通じた細胞死と増殖抑制を指標とする方法である。一方、溶血性試験は細胞膜破壊のみを指標とする試験である。提案された方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理論的必要性について論議された。その結果を以下に示す。

光化学反応では、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挙げられており、これが光毒性の発現機構として考察されている。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、その試験系により大きく変化することが考えられる。その中で一番影響すると考えられるのは、試験系における水の有無や媒体である。水系の試験系では、溶存酸素や水分子の関係もありタイプ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試験や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り、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、申請者の検討結果では赤血球では捉えられた物質の一部は酵母で捉えられないことが判明した。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、浸透圧ショック等に対しても強いことから、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、この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。なお、未確認ではあるが酵母には活性酸素を消去する酵素等が多いとの指摘もあった。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溶血性試験法の方が感度が高いと思われた。

また、酵母が有機溶媒に強いことは今回の申請データでは被験物質の溶解にエタノール、メタノール、アセトン、及び DMSO を用いており、これを直接濾紙上に滴下しているが、溶媒対照群においては阻止円の広がりには全く認められておらず、酵母法にこれらの溶媒を用いることができることが確認された。なお、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、適切では無い場合があるが、他の溶媒ではそのような問題は生じなかった。

即ち、酵母は広範囲の被験物質や作用機序による光毒性の検出に適用できる。一方、細胞膜破壊を伴う光毒性に関する感度は赤血球溶血試験の方が高く、弱い作用を検出できる利点があると思われた。また、細胞内への移行を必ずしも必要としないとの利点がある。一方、酵母は感度は若干低い、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と思われた。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をカバーできる訳ではないが、かなりカバーできるとともに、False negative を無くすことができると考えられた。実際、酵母と 3T3-NRU 法を組み合わせる方法では Phantolid が false negative になるが、酵母と溶血性試験を組み合わせることにより false negative が解消されると報告されている（杉山：AAATEX,5,268-277, 1998）。

### 3) 難溶性物質への適用性の 3T3-NRU 法との比較について

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 amiodaron、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 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究報告書）。一方、酵母光生育阻害試験は、固体培地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。また、前項で述べたように酵母は耐溶媒性に優れている。

赤血球溶血試験も、液体培地中に被験物質を添加しているが、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ことができるうえ、膜破壊や蛋白変性を生じない溶媒を選択できる可能性があり、一般的な細胞毒性試験よりも耐溶媒性に優れていると考えられる。

前項で述べたように、提案者の申請データにおいても、酵母法はアセトン、エタノール、メタノール、及び DMSO などの有機溶媒に溶かした被験物質をそのまま試験系に滴下し、試験を行うことが可能であることが示されている。光非照射で阻止円がディスク以上に大きかったのは注射用水を用いた CPZ とアセトンを用いた acridine のみであり、同じ溶媒を用いた他の検体では広がっておらず、被験物質自身の細胞毒性によるものと思われる。また、液体の検体についてはそのまま適用でき、被験物質の種類や濃度などについて、適用範囲が極めて広いと思われる。

溶血性試験についてはそれらの溶媒に溶かした検体を 1% の濃度になるように添加して試験を行っており、1% で溶血を起こした DMSO を除き、他の溶媒では 1% までは問題なく試験を実施できると考えられた。

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。

なお、DMSO は一重項酸素消去剤としても働く可能性があり、結果の解釈に注意する必要がある。

### 4) 試験法で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と理解された。

#### 5) 被験物質の適用範囲の妥当性について

一義的には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と思われるが、資料 4 に示されたように提出データにおいては香料(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。

従って、評価委員会においては、まずは化粧品と化粧品原料の光毒性評価の有無の評価が可能か否かの評価評価を優先すべきと考えるが、その他の一般化学物質について、その適用の可能性の評価も可とすべきであるとする。

#### 6) プロトコールについて

6-1) プロトコールは他のものでも理解可能か？誤解を招く表記や不明な表記はないか？

試験法のプロトコールの記載は、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には下に示したような、修正提案があり、バリデーション実施までに検討し、修正する必要があるとされた。なお、プロトコール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。

- ① どちらの試験もバリデーションするためのプロトコールとしてはデータの記入方法の詳細が不明である。記録用紙のフォーマットを示すべきである。
- ② 酵母光生育阻害試験における阻止帯の測定について、境界線が不明確なことがあることから、その方法についてより詳細な記載があった方がよい。
- ③ どちらの試験法も光照射の有無による結果の差のみを求めているが、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を測定値として記録し、用量反応を確認するようにした方がよい。
- ④ 酵母法において、酵母含有プレートに試薬を含ませたる紙を着装した後、UV 照射までの時間（寒天培地中への拡散）の設定が必要であろう。
- ⑤ 酵母法において、照射後、試験期間終了まで、ろ紙はそのままなのか、或いは除去されるのか明確にすべき。つまり検体による曝露時間を明確にする必要がある。
- ⑥ プロトコール溶媒の選択方法と理由が曖昧である。
- ⑦ 被験物質を 5 倍希釈系列で試験することの妥当性について議論する必要がある。
- ⑧ 用量設定試験や本試験の設定に関する記載はない。適正な試験の繰り返し回数を明記する必要がある。
- ⑨ 溶血性試験では、24 ウェルマイクロプレートから 96 ウェルマイクロプレートに割り付ける際の割付方法について図を入れて説明した方がよい。
- ⑩ 両試験ともプロトコールが手順の順に書かれていないことから、フローチャートが記載されていることが望ましい。
- ⑪ バリデーションではいずれの被験物質でも酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験の両方を行うことから、それらを同時に実行しても良いようにすべきである。

6-2) プロトコールに必要な機器、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る。なお、社内の手順書であれば更にメーカーやカタログ番号も必要かも知れないが、バリデーションで使用するプロトコールとしては有る程度の自由度が必要である。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。

6-3) 結果の判定方法の妥当性について

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、今回のプロトコールでは 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より小さい場合は擬陽性とするがされた。

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が明確ではなかった。これについては5倍希釈濃度比で試験を行っているため用量反応が得られにくいことから、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つの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、二つの方法のうち一つの方法でしか結果が得られなかった場合、その結果が陽性の場合には陽性と判断する。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ことに決められた。

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

なお、濃度設定のプロトコル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いようにプロトコル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（平均値をとるのか、それとも一つでも陽性であったら光刺激ありと判定するのか。判定が食い違った場合はどのように考えるべきか）については、平均値を採用するが、判定が大きく食い違う場合には、追加試験により食い違いの原因を検討することもあるとプロトコルに明記するべきとされた。

#### 6-4) 被験物質の最高濃度について

最高用量を溶解できる最高濃度としている事に関し、溶解性の低い物質の場合は極めて低い濃度になってしまい、溶媒の選択によっては、適正に評価できない可能性が示された。また、溶解しない物でも光毒性を示すものは無いか粉体を例に議論された。このようなことから、場合によってはあらかじめ試験の最高濃度を指定しても良いのでは無いかとされた。また、完全に溶解していなくても良いのではないかと意見も出された。これらについての結論は出ていないが、提案者から意見を聞くべきとされた。また、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。

#### 6-5) 太陽光類似光源 (solar simulator) について

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ことが若栗により示された。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。光源に関連して、以下の質問及び意見が示された。

- ① 光源が変わった場合の照射量の設定法（標準試料のセットと用量反応性の基準値）があるとよい。
- ② 照射むらのある場合の対処方法についてプロトコルに具体的な記載する。  
色の付いている検体については赤血球の入っていない培地で色を補正する必要はないか。

#### 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。そのため、COLIPAで実施された PHASE 2 の赤血球による光毒性試験ではヘモグロビン変性による影響の少ない 525nm で実施している。本試験法は、UV 照射の有無による差を取って判定していることから、この点に特に注意する必要がある。もしも国際的な試験法としてバリデーションを実施するのであればこの点について問題となる懸念があるので明確にする必要がある。（\*バリデーションでは525nmでも評価することとしてこの点をクリアするのも方法かもしれない。）

また、プロトコルの書式の統一すべきとされた。

#### 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となる。

#### 8) 提案書に記載されたバリデーションの種類

提案者の施設内で実施された試験の再現性が評価されている。また、提案者の施設は光毒性について長い経験があるとのことであるが、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。

#### 9) 今後行われるバリデーションについて

今後バリデーションを実施する場合の考慮点として、以下の意見が出された。

- ①異なった光源を使用することにより、光源の設定や結果、判定に用いる数値の比較が行える。
- ②酵母を用いる方法に関しては阻止帯の測定値に個人差がどれくらいあるかも情報となり得る。
- ③施設バリデーションを行う場合、光照射機器の問題もあり、試験条件等は十分に検討してスタートする必要がある。
- ④多施設バリデーションを行う前に光源の違いによる条件設定について考える方がよい。プロトコル通り SOL500 で行う場合トプコン製の UV 検出器を使用している点を直す必要があるかもしれない。
- ⑤できるだけ多くの施設の参加が望ましいが、始める前に技術研修が必要である。

#### 10) 申請者の行ったバリデーションの結果について

##### 10-1) 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、今後行われるバリデーションに際しては、tetracycline や ketoprofen, amiodaron, 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 となった物質も追加することが望ましいとされた。より多くの物質を用いて評価することが望ましいが、協力機関の capacity や vivo データが限られた物質にしか無いという現実も考慮する必要もある。

##### 10-2) 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、プロトコルの様式が 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、当初、提出された生データのランダムサンプリングにより実施され、全ての個別データとまとめのデータなど、二次データの信頼性を確認することができた。その後、全ての提出データについて電子媒体に手入力する段階で、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、一部のデータについて、以下に示したような問題が見いだされた。

- ① 生データの食い違いが一つの試験結果についてあった。
- ② 溶血性試験で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。この理由について提案者に問い合わせたところ、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の回答を得た。

評価委員会では①については単純なデータの転記ミスであり、この食い違いは試験法の評価に影響するようなものではないとされた。②について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こととは試験法プロトコルにも明記されていなかったことから、軽く見ることはできないと考えた。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、悪意を持って隠したものでは無いと思われた。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プロトコ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プロトコルに明確に記載するべきであるとされた。

##### 10-3) 施設内再現性

提案者は眼刺激性試験代替法を評価した厚生科学研究の結果を参照し、その変動係数からの議論をしていたが、厚生科学研究での変動係数は施設間差を含んだばらつきを評価している。本試験も施設間差を考慮すればばらつきは今よりは大きくなると考えられるため、この比較の結果から再現性が高いという結論を導くのは誤っていると考えた。この場合は、vivo との比較をすべきであるとされた。

in vivo データの再現性については、陽性対象物質の 0.02%の 8-methoxypsolaren の歴史データの変動係数は 0.16-0.22 であることが示されていた。一方、申請資料の結果では、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溶血性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。

なお、論文データとの比較により光源の違いにより判定に若干差があるようであると指摘された。

#### 10-4) 施設間再現性

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。

#### 10-5) 比較対照とした 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、資料 1-2 で提案者の施設で実施された 0.02%の 8-methoxypsolaren の歴史データが示されている。その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。

#### 10-6) In vivo データとの対応性 (感度、特異性、予測性、精度 (一致率)、適用範囲、false positive, false negative)

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。施設間差を考慮した場合に false negative 発現率が 0%となるかどうかは疑問がある。したがって、多施設バリデーションが実施されていない現時点では提案試験法に false negative がまったく無いから認められるという判断を下すのは時期尚早である。

なお、酵母光生育阻害試験で 10% indomethacine 10%の個々の阻止帯は 4.8、5.3、4.6、4.9mm であり、これらの平均値が 4.9mmとなったことで陰性とされているが判断基準値が任意に決められていることもあり、擬陽性の区分を作るなり、更に検討する必要がある。また、musk Xylene、bithinol、TBS の結果では濃度依存性がない。濃度依存的な反応をとらえることが重要であり、公比 5 を変更する必要性についても議論する必要がある。

#### 10-7) 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。

#### 10-8) 3T3-NR 法との比較

3T3-NR 法と比較し、それに勝る点は以下のとおりと考えた。

- ① 水難溶性物質への適応範囲が広いという点は 3T3-NR 法より優れていると思われる。
- ② 酵母光生育阻害試験においては無菌操作が 3T3-NR 法ほど厳密では無くても良いし、赤血球試験では無菌操作が不要であることから、操作は相対的に容易である。また、DMEM 培養液やそれに添加する新生牛血清等のコストが不要である。
- ③ in vivo データとの対応性については提出データの結果のみでは false negative はなく、3T3-NR 法より優れていると思われた。文献的には同レベルであった。しかし、多施設バリデーションが実行されていないことから、詳細な比較はできない。

一方、劣る点としては、以下の 2 点が上げられる。

- ① 3T3 細胞はほ乳類由来細胞であるので、ヒトに近いとの一般的な利点がある。
- ② 提案方法は 2 つの試験を行わなくてはならないことから、人的・時間的にコストがかかる。

#### 10-9) 判定基準

酵母光生育阻害試験において galoxolide (陰性 4.4mm)、CPZ (陰性 4.6mm)、anthracene (陽性 5mm) 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、例えば 4mm に変えるとすべてが陽性となる可能性がある。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。なお、設定値の妥当性については多施設バリデーションの結果も考慮し、判断せざるを得ない。

なお、酵母光生育阻害試験での cut off 値を 4mm と設定すれば、モルモット試験で陽性であった galaxolide、CPZ が溶血性試験と同じく、陽性と判定され、モルモット試験で陰性であった TBS が陽性と判定される結果になる。これらは溶血性試験と同じであり、バッテリーを組む必要性が無くなると推定された。

#### 10-10) 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、溶血度を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思われた。

同様に、電子媒体として評価委員会に提供されたデータは提出書類のファイルは個別の生データを記録したもので無く、現在電子媒体として記録されているデータは UV 照射の有無による阻止帯の大きさの差のみであった。一方、溶媒の影響や濃度作用曲線を確認するためには UV+ と - 別の阻止帯の実測値を見る必要がある。なお、生データレベルでは全ての測定値が記録されており、今後バリデーションを行う際には、実測値をコンピュータに入力すべきとされた。

##### 1 1) 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。

##### 1 2) コストからの妥当性

コストの面については詳しい積算は示されていないが、特にコストパフォーマンスが悪いとは思われない。しかし、2つの試験を行うことから材料費や手間の点で 3T3-NR 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。

##### 1 3) 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-NR 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。

##### 1 4) その他

溶血性試験で chlorpromazine (CPZ) で大きな負の値が出た理由に関して、非照射の場合でもほぼ完全に溶血性を示す濃度においては、照射することによるヘモグロビン変性の分、負の値となったと考えられた。光照射により生じたラジカルや活性酸素によるヘモグロビンの変性により吸収ピークが変わることによるものであることから、回答が了承された。なお、このような問題に対してはヘモグロビンの吸収ピークのみで評価するのではなく、525nm でも測定することが良いと思われた。

溶血性試験で bithionol が低濃度で陽性となる理由については、その濃度における bithionol は非照射の場合でもやや溶血性を示すことから、照射することによるヘモグロビン変性の分と相殺されたものと考えられた。CPZ の場合と同様に bithionol の高濃度では溶血が出ているとともに、同じ機構でヘモグロビンの変性による光吸収低下が起こり、高濃度では負の値となっていたが、低濃度では相対的に変性が少なくなり陽性となったものとおもわれた。

溶血性試験で Rose bengal の溶血性が低濃度でも強くでている理由については、rose bengal 自体の色を溶血性と評価しているものと推定するとともに、このことから水溶性の色素の場合は評価を慎重に扱うべきである。

酵母光生育阻害試験で false negative を示した物質は、galaxolide、CPZ の 2 化学物質で、これらの化学物質は赤血球光溶血試験では陽性であった。このことから、細胞膜破壊に基づく光毒性の検出においては、赤血球光溶血試験の方が酵母光生育阻害試験よりも優れていると考えられた。赤血球光溶血試験で false negative を示した物質は、8-MOP、5-MOP の 2 化学物質で、これらの化学物質は DNA と架橋を形成し DNA 合成を阻害することが知られている。赤血球光溶血試験では、DNA 損傷に基づく光毒性の検出においては無効であることが示された。このように両試験法で false negative となる物質が異なることは、光毒性における Hazard Identification において機序の異なる試験法 バッテリーの必要性を示すものと考えられる。

提出された資料 5 の in vivo データの判定区分と記載された判定に食い違いがあった。それについて確認

し、誤記であることが判明し、資料 5 が修正された。

### C-3) 現時点での総合評価

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る。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的判断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-NR 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際には、他の施設が誤解することがないようにプロトコル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-NR 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 NR-3T3 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プロトコルを、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。

これらを踏まえ、日本動物実験代替法学会に今回の光毒性試験バッテリーの多施設によるバリデーションを依頼することとした。

### C-4) 多施設バリデーションについて

今回の評価で評価委員会としては多施設バリデーションを行う必要があること、また、その価値があると判断した。その目的は、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 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 細胞を用いた光毒性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性が生ずることから、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。

以上

## 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5日	改訂責任者	吉村 功
2003年11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（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

丁寧に言うところ「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）、森真輝（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  
 (これは終了)  
 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)コーセイ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物質を大野が選り被験物質とする。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. H nle社のSOL500とする。光源の手配は、田中が指示する。

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. バリデ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
  - (8-1) 酵母光生育阻害試験用シート
  - (8-2) 酵母光生育阻害試験用シートの説明文書
  - (8-3) 赤血球光溶血試験用シート
  - (8-4) 赤血球光溶血試験用シートの説明文書

以上

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、紫外線吸収（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 真輝 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. 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）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 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

コ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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 10 mL 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 50 mg ずつ入れる。
- 3) 溶媒を 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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	原体が固体的場合	原体が液体的場合
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) 原体が固体的場合

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) 原体が液体的場合

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  $\mu$ 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/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup>)

照射時間(S) = [(8.5 × 1,000 mJ/cm<sup>2</sup>)/(A mW/cm<sup>2</sup>)] (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。

#### 4.16. 培養（8 項参照；試験記録⑩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。

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

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。