

試験実施のプロトコールは添付した評価報告書を参照されたい。なお 2 回の試験を繰り返し、同一の判定が得られたときは、その判定を採用し、異なる判定結果が得られた場合は、3 回目の試験を実施し、その結果を合わせ多数決で判定した。

C. バリデーシヨンの結果

添付文書 3-3 に基づいて、皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法が評価委員会で評価され、その結果が添付資料 3-4 として報告された。それを以下に要約する。

C-1) Vivo データとの対応性

EpiDerm™ で腐食性物質を正しく腐食性と判定した事例は 6 被験物質 30 試験中、29 試験であり、感度(sensitivity)は 96.6%であった。一方、非腐食性物質を正しく非腐食性と判定した事例は 6 被験物質 30 試験中、20 試験であり、特異性(specificity)は 66.7%であった。なお、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、この場合、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。腐食性との結果が得られたもののうち、真に腐食性である割合、陽

表 3-3 : EpiDerm™

Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Corrosive	29	1
Non-Corrosive	10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

表 3-4 : Vitrolife-Skin™

Vitro	Corrosive	Non-Corrosive
Corrosive	30	0
Non-Corrosive	10 (5% KOH, Lactic Acid)	20

C-3) データの信頼性

本バリデーシヨン研究は GLP の精神準じて実施された。試験実施の際にはキットの搬入から、被験物質の適用、OD の測定まで詳細な記録を求め、データの入力もミスしにく

性予知能力(positive predictivity)は 74.4%であった。非腐食性との結果が得られたもののうち、真に非腐食性である割合、陰性予知能力(negative predictivity)は 95.2%であった。1 点の擬陽性を詳しくみてみると、施設 1 において、腐食性物質 Sulfuric acid を EpiDerm™ で 2 回とも陰性と判断した。この結果を調べてみたが、60 分処理の生存率が 18.54%および 38.80%であり、1 回目の値が腐食性の判断基準である 15%未満と比較して、微妙な数値であった。結果がいずれも正しい判定結果が得られた割合、一致率は 81.7%であった。

Vitrolife-Skin™ では感度は 100%であり、特異性は 66.7%、陽性予知能力は 75%、陰性予知能力は 100%、一致率は 83.3%であった。EpiDerm™ の場合と同様に、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。

これらのように、いずれの場合も、EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™ によりほとんど同じ結果が得られた。また、判断を誤る物質も同じであった。

い入力用紙を用いた。また、データおよび試験の記録は、すべて大野または吉村まで送付され、その内容が確認されており、得られたデータの信頼性は高い。

C-4) 施設内再現性

2 回の本試験において、施設内で異なる結果が出たのは、EpiDerm™ においては、72 試験の内 sulfuric acid、Lactic acid で各 2 施設であり、発生率 5.56%であった。Vitrolife-Skin™ においては、sulfuric acid、Octanoic acid、Sodium hydroxide(4.88%)で各 1 施設であり、発生率は 4.17%であった。極めて施設内再現性は高いと判断した。

C-5) 施設間再現性

施設における最終判定が異なった場合は、EpiDerm™ においては、sulfuric acid の結果が他の陰性とした 1 施設の 4 施設の腐食性という判定結果と異なった場合のみであった。全結果では 1/60、即ち、1.7%であった。Vitrolife-Skin™ においてはこのような例なく、いずれも極めて施設間再現性は高いと判断した。

C-7) 方法の比較

今回の結果を以下の表 3-5 にまとめた。EpiDerm™ および Vitrolife-Skin™ の感受性、特異性、正確性の比較はまったく同じであり、培養皮膚キット間に差はないと考える。ECVAM の結果と比べてもほぼ同等の結果であると考えられる。むしろ、同じ培養皮膚でも偽陽性が多い EPISKIN™ の予測性は高くない。これは培養皮膚の性能の差というより

も、方法の違いによるものと考える。EpiDerm™ の方法も Pre-Validation を経て、改良された経緯があり、現方法がもっとも高い予測性を求めやすいと考える。日本の偽陰性が 0% であることは素晴らしい結果であるが、バリデーション結果は、被験物質の数、種類の選択にもよることから、早急に最終結論を出すのは望ましくない。

表 3-5: EpiDerm™ および Vitrolife-Skin™ の特異性、感度、一致度の比較
(国立衛研、sulfonic acid を除外して計算)

	EpiDerm™	Vitrolife-Skin™	EpiDerm(ECVAM)	EPISKIN(ECVAM)
試験物質数	12	12	24	60
感受性	100% (12/12)	100% (12/12)	92%	82%
特異性	66.7% (4/6)	66.7% (4/6)	83%	84%
正確性	83.3% (10/12)	83.3% (10/12)	92%	83%
偽陽性率	16.7% (2/12)	16.7% (2/12)	17%	16%
偽陰性率	0% (0/12)	0% (0/12)	8%	18%

C-8) その他の面からの考察

Vitrolife-Skin™ において、強度のアルカリにより本皮膚三次元モデルの支持組織であるコラーゲンスポンジが完全に溶けてしまい、腐食性の判定に支障を来した。今回の判定においては、強い刺激性があるものとして、腐食性と判定したが、SOP 上もそのように改定する必要がある。なお、酸やアルカリ検体について、その他の障害は認められておらず、pH 変化による viability 測定のための色素の発色への影響は洗浄などの操作により解消できたと考えられる。一方、着色物質の中には、細胞や培養基材への吸着の強いものがあることも考えられることから、それら被験物質の場合には取り扱いには注意する必要がある。また、ポンチで切り取る組織の大きさが皮膚モデルの膨潤率により変化する可能性があり、注意を喚起する必要があるとされた。更に、Vitrolife-Skin™ では被験物質として用いたアルカリがコラーゲンスポンジに残留することにより発色が影響される場合があり、このような被験物質の場合ではコラーゲンスポンジのみのブランクが必要であった。

D. まとめ

陽性対象物質 2 品目、皮膚腐食性物質 6 品目、非腐食性物質 6 品目（その内劇物 3, 非劇物 9）を用い、6 施設によって行った EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™ との比較バリデーションを行った。

その結果、EpiDerm™ で腐食性物質を正しく腐食性と判定する感度(sensitivity)は 96.6%、非腐食性物質を正しく非腐食性と判定する特異性(specificity)は 66.7%であった。なお、偽陽性と判定したのは、5% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。腐食性との結果が得られたもののうち、真に腐食性である割合、即ち陽性予知能力(positive predictivity)は 74.4%であった。非腐食性との結果が得られたもののうち、真に非腐食性である割合、即ち陰性予知能力(negative predictivity)は 95.2%であった。正しい判定結果が得られた割合、即ち一致率は 81.7%であった。即ち、ECVAM や ICCVAM, OECD で腐食性試験代替法として承認された EpiDerm™ は若干偽陽性があるが、腐食性物質を腐食性物質と判定する十分な能力を有することが確認された。

一方、Vitrolife-Skin™ では感度は 100%、特異性は 66.7%、陽性予知能力は 75%、陰性予知能力は 100%、一致率は 83.3%であった。EpiDerm™ の場合と同様に、非腐食性物質を誤って腐食性物質と判定したのは、5% Potassium hydroxide と Lactic acid であり、いずれの施設でも腐食性物質と判定した。即ち、EpiDerm™ と Vitrolife-Skin™ いずれにおいてもほとんど同じ成績が得られた。判断を誤る物質も同じであった。これらの結果から腐食性試験代替法として国際的に承認されている

EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられた。また、EpiDerm™ のような表皮モデルと Vitrolife-Skin™ のような皮膚モデルの結果にはほとんど差がないことが明らかになった。

E. 添付資料

添付資料 3-1 : 皮膚腐食性試験バリデーション SOP

添付資料 3-2 : 日本動物実験代替法学会バリデーション委員会 皮膚腐食性試験代替法バリデーション会議議事録

添付資料 3-3 : 日本動物実験代替法学会バリデーション委員会 皮膚腐食性試験バリデーション結果報告

添付資料 3-4 : 日本動物実験代替法学会評価委員会 皮膚三次元モデルを用いた皮膚腐食性試験代替法評価報告書 (案)

4) 感作性試験代替法の開発

要旨

ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法(human Cell Line Activation Test: h-CLAT)が日本において開発された。本試験法の信頼性を評価するためには多施設による共同研究が必要と考えられる。そこで本研究では、厚生労働科学研究班のもと国内 7 施設による共同研究を実施した。その結果、本試験法は技術移転が容易であり、基本的に施設間再現性が良好であると考えられた。一方で施設間でばらつきの認められた化合物も存在し、今後その原因究明および対応策を検討することが必要と考えられた。本試験法を日本発の国際的な試験法として提案することを目標に、さらに基礎データの取得などの研究も遂行して行きたい。

研究協力者

日本化粧品工業連合会：足利太可雄、坂口齊、岡本賢二、水野誠、山田貴亮、吉田真由美、佐藤淳、児玉達治、太田尚子、長谷川靖司、岡本裕子、桑原裕史、小坂七重、藺さき子

A. 研究目的

感作反応は免疫応答に基づく全身系の反応である。従って、複雑な発現機序に基づく感作反応を *in vitro* 試験法で置き換えることは非常に困難と考えられてきた。そのため、代替法の 3R の Reduction や Refinement の観点から、マウスを用いる Local Lymph Node Assay (LLNA) が *ex vivo* 試験法として検討されてきた。Replacement を目的とした *in vitro* 試験法としては、感作性物質が皮膚に暴露された際に生じるランゲルハンス細胞の変化に着目した試験法がいくつか報告されている。その1つとして、ランゲルハンス細胞の代わりにヒト血液から調製された細胞を使用する試験法が検討されているが、用いる細胞の個人差や安全なヒト血液の供給の問題などから、未だ実用に足る試験法は開発されていない。

資生堂と花王は、そうした血液由来細胞の代わりに THP-1 細胞などヒト細胞株が感作性物質処理により表面抗原である CD86 や CD54 が増加すること、およびこの変化を捉えることで感作性物質を評価できる可能性を見出してきた(Ashikaga T. *et al.* 2002, Yoshida Y. *et al.* 2003)。さらに感作性試験代替法は社会全体に大きく貢献できる技術であることから、両社は企業の枠を超え、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法(human Cell Line Activation Test:

h-CLAT)を共同で開発した(足利太可雄、坂口齊 2003)。

本研究では、日本で開発された本試験法を国際的な試験法として提案することを目指し、厚生労働科学研究班のもと多施設による共同研究を行った。こうした研究により本試験法の有用性が明らかになるとともに、技術移転や施設間再現性に関する課題が明らかとなり、将来の目標である公的バリデーションに向けた有用な情報が得られるものと期待される。

B. 研究方法

細胞は、ヒト単球由来の細胞株である THP-1 細胞を ATCC より購入して使用した。CD86 及び CD54 の発現は、上記の細胞に被験物質を 24 時間処理し、細胞生存率とともにフローサイトメトリーを用いて測定した。細胞株、血清、抗体については各施設同一のロットを使用した。また、被験物質適用濃度についても各施設同一とした。適用濃度は、予め予備試験として細胞毒性試験を行い、生存率が 75%に相当する濃度(CV75(=IC25)と定義)を基準に、以下のように公比 1.2 で 8 濃度設定した。1.2x, 1x, 1/1.2x, 1/1.2²x, 1/1.2³x, 1/1.2⁴x, 1/1.2⁵x および 1/1.2⁶ x CV75 尚、各施設ともフローサイトメトリーは、FACSCalibur (Becton Dickinson)を用いた。試験は 3 回行い、その平均値で評価した。コントロールと比較して CD86/CD54 の発現量がそれぞれ 1 濃度でも 150, 200%を超えた場合を陽性とした。

(倫理面への配慮)

本研究は感作性試験代替法を開発することにより、実験動物の福祉向上を目指すものであり、ヒトや動物の権利や福祉に抵触するところはない。

C. 研究結果及び考察

C-1 試験法の技術移転の検討

参加 7 施設については本試験法を初めて導入するところが多かったことから、まず資生堂および花王が試験プロトコルを作成し、各施設に対して説明を行った上で配布した。このプロトコルに基づき、予備試験として代表的感作性物質である DNCB (Dinitrochlorobenzene) の 2 濃度(2.5, 5.0 µg/mL)を各施設において 3 回測定した。結果はいずれの施設とも 2 濃度のいずれかで CD86/CD54 とも陽性となっており、濃度依存的な細胞毒性も観察されたことから、本試験法の移転性(transferability)は基本的に大きな問題はないと判断された(表 4-1)。

C-2 代表的被験物質 3 品による施設間再現性の検討

C-2-1 概要

各施設が基本的な技術移転を終了したことを確認したため、代表的な被験物質 3 品による 7 施設間の再現性の検討を行った。以下にその概要について示す。

- ・被験物質：3 品(感作性物質 2 品、非感作性物質 1 品)
- ・感作性物質と CV75：
DNCB (Dinitrochlorobenzene, 7.2µg/mL),
Ni (Nickel sulfate hexahydrate, 150µg/mL)
- ・非感作性物質と CV75：
SLS (Sodium lauryl sulfate, 60µg/mL)

C-2-2 結果

全ての施設において、DNCB, Ni は 4 点以上の設定濃度で CD86 および CD54 の発現を亢進させた。一方、SLS はいずれの施設においても全ての濃度で CD86 および CD54 の発現を亢進させなかった。すなわち、評価した 3 品において全ての施設は正確に感作性物質を陽性、非感作性物質を陰性と判断したことから、本試験法の施設間再現性は基本的に良好であると考えられた。しかしながら、陽性・陰性の判断に影響しない範囲で、濃度と CD86/CD54 発現量の関係に関して施設間で多少ばらつきが認められた。こうした違いは、同一施設における 3 回の測定で同一濃度での細胞生存率が大きく異なる時に認められたことから、細胞の調子が不安定だったた

めに生じた可能性が考えられた。したがって試験の再現性を向上させるためには、培養条件のコントロールを十分に行うことが重要と考えられた。そこで今後は細胞の状態を確認することを目的として、DNCB の 1 濃度(5 µg/mL)を陽性対照として試験ごとに設定することとした。陽性対照において CD86/CD54 発現亢進が見られない場合や、細胞生存率が通常より大きく異なる場合(90%以上または 50%未満)、細胞培養が適切に行われていない可能性があると考え、試験不成立とすることとした。その条件で一部の施設において再試験を行ったところ、用量反応性も含めた施設間再現性が向上した(図 4-1)。3 品の結果を図 4-2 に示す。

C-3 被験物質追加 5 品による施設間再現性の検討

C-3-1 概要

さらに被験物質を 5 品追加した。以下にその概要について示す。

- ・被験物質：5 品(感作性物質 4 品、非感作性物質 1 品)
- ・感作性物質と CV75：
BQ (p-Benzoquinone, 6.0µg/mL),
GA (Glutaraldehyde, 9.0µg/mL),
ED (Ethylene diamine, 300µg/mL),
EU (Eugenol, 150µg/mL)
- ・非感作性物質と CV75：
LA (Lactic acid, 2200µg/mL)

C-3-2 結果

各施設の陽性、陰性の結果についてのまとめを表 4-2 に示す。本試験法の予測モデルでは、CD86 と CD54 のどちらかが陽性となれば、その被験物質は陽性と判断しており、5 品の 7 施設で偽陰性は 2 例のみ、偽陽性はなしという結果であった。したがって基本的に本試験法の施設間再現性は良好と考えられる。ただし一部の施設において、Ethylene diamine や Eugenol などの感作性物質は CD86/CD54 いずれも発現を亢進させなかった。さらに、CD86 と CD54 の両方が陽性となるべき被験物質でもいずれかが陰性になるなどのケースも散見された。今回は成立基準を満たしていれば、どの試験結果を採用するかについて制約を設けなかったが、今後正式なバリデーションの際はこの点も留意する必要があると考えられた。ばらつきの原因としては、安定性や溶解性などが悪い場合、施設

によっては適切な濃度で評価できなかったことや、発現亢進が弱い場合捉えられないこともあることが考えられた。今後こうしたばらつきの原因を確認し、プロトコールや予測モデルの改良あるいは試験の適用限界を明らかにすることが必要と考えられた。

D. 結論

ヒト細胞株 THP-1 細胞の CD86 および CD54 の発現亢進を指標にした感作性試験代替法である h-CLAT の施設間再現性の確認を目的として施設間共同研究を行った。その結果、本試験法は移転が容易であり、基本的に施設間再現性も良好であった。しかし被験物質によってはばらつきも散見されたことから、今後こうした原因の究明を行う必要があると考えられた。

E. 参考文献

- 1) Ashikaga T. *et al.*, "Evaluation of CD86 expression and MHC class II molecule internalization in THP-1 human monocyte cells as predictive endpoints for contact sensitizers", *Toxicol. In Vitro*, **16**, 711-716, 2002.
- 2) Yoshida Y. *et al.*, "Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naïve THP-1 cell line" *Toxicol In Vitro*, **17**, 221-228, 2003.
- 3) 足利太可雄、坂口齊、"ヒト細胞株(THP-1)を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と 2 施設間バリデーション"、フレグランスジャーナル、**8**、108-111、2004.

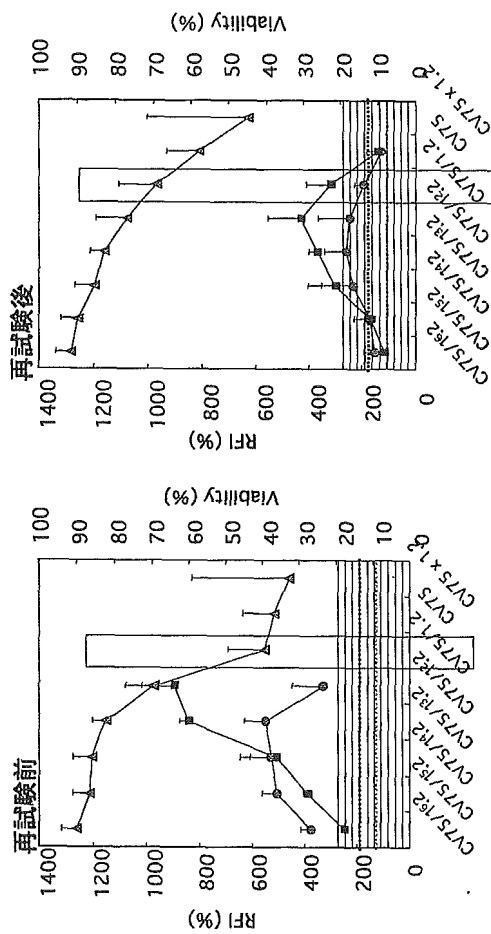
表 4-1 予備試験結果

施設	A		B		C		D		E		F		G	
	2.5	5	2.5	5	2.5	5	2.5	5	2.5	5	2.5	5	2.5	5
DNCB (? g/mL)	220	261	524	340	214	248	361	115	385	62	274	201	572	471
Mean	186	360	792	1187	181	342	210	99	419	140	278	705	767	1289
Cell viability	93	88	86	68	92	84	85	75	74	42	88	72	77	66
	60	32	141	72	92	48	46	94	156	28	40	32	74	78
SD	60	62	217	482	81	84	36	89	223	166	42	180	239	415
Cell viability	1	3	5	11	2	5	3	3	3	0	3	8	2	1

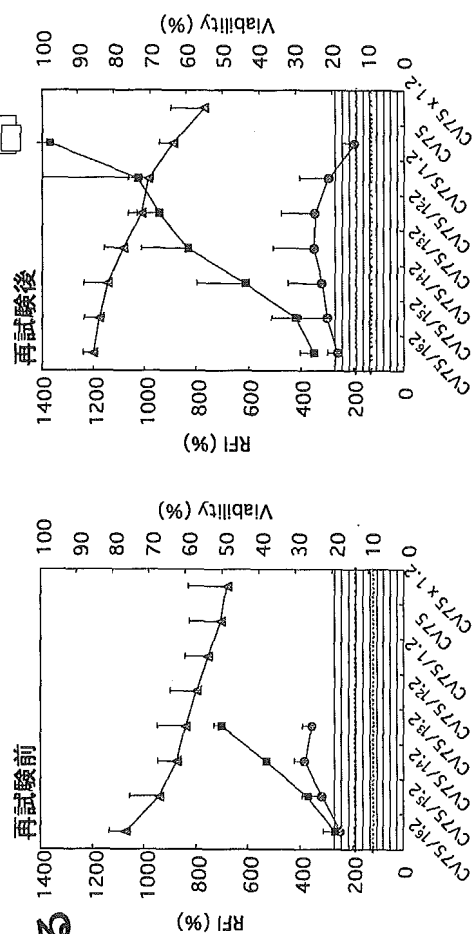
各施設におけるDNCB (2.5, 5 µg/mL)の結果を示す。CD86/CD54が陽性となった場合太字で示した。すべての施設において、いずれかの濃度でCD86/CD54とも陽性となった。

図4-1 細胞生存率を指標にした細胞培養の管理

施設 F における DNCBの再試験

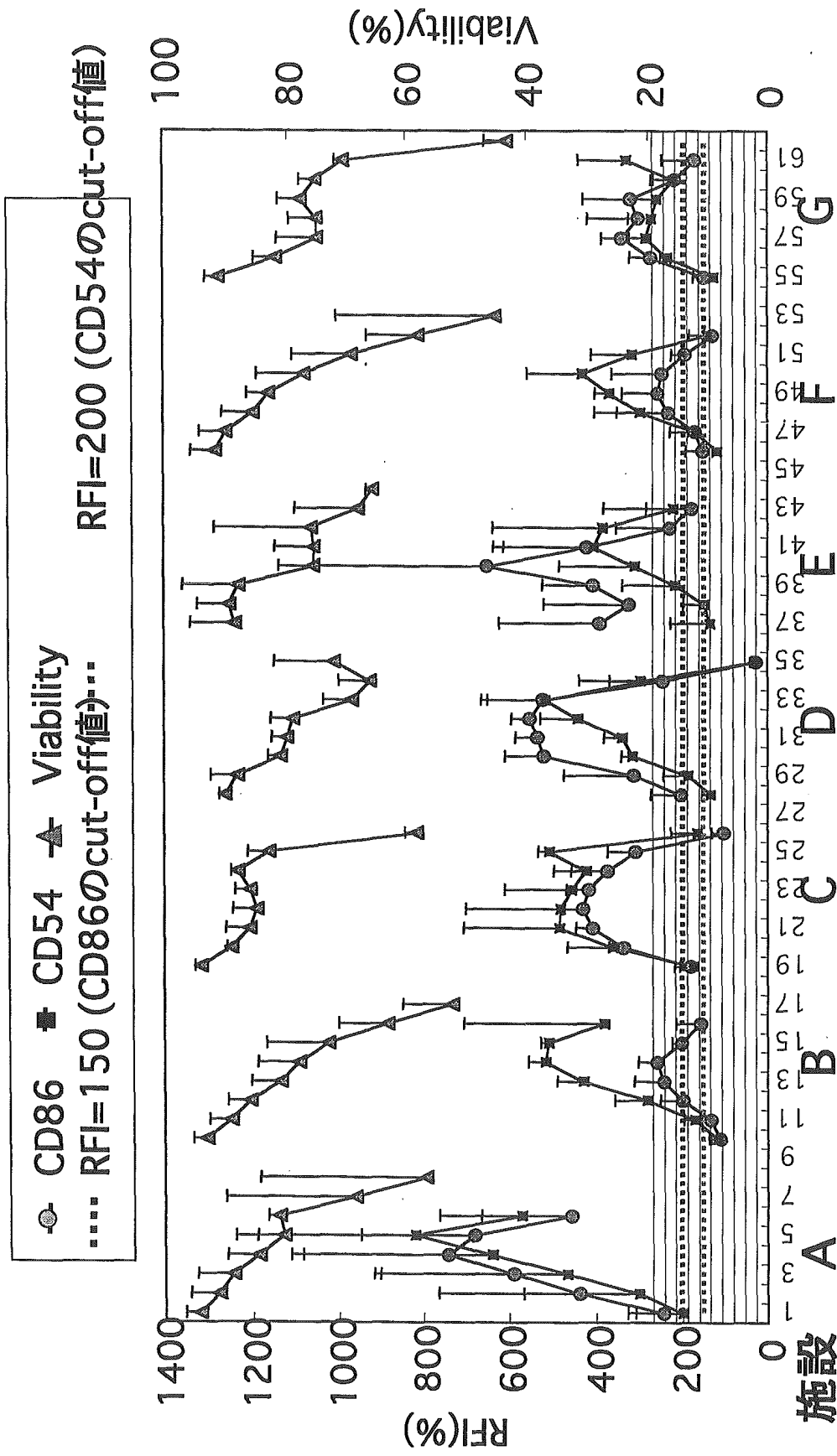


施設 D における Niの再試験



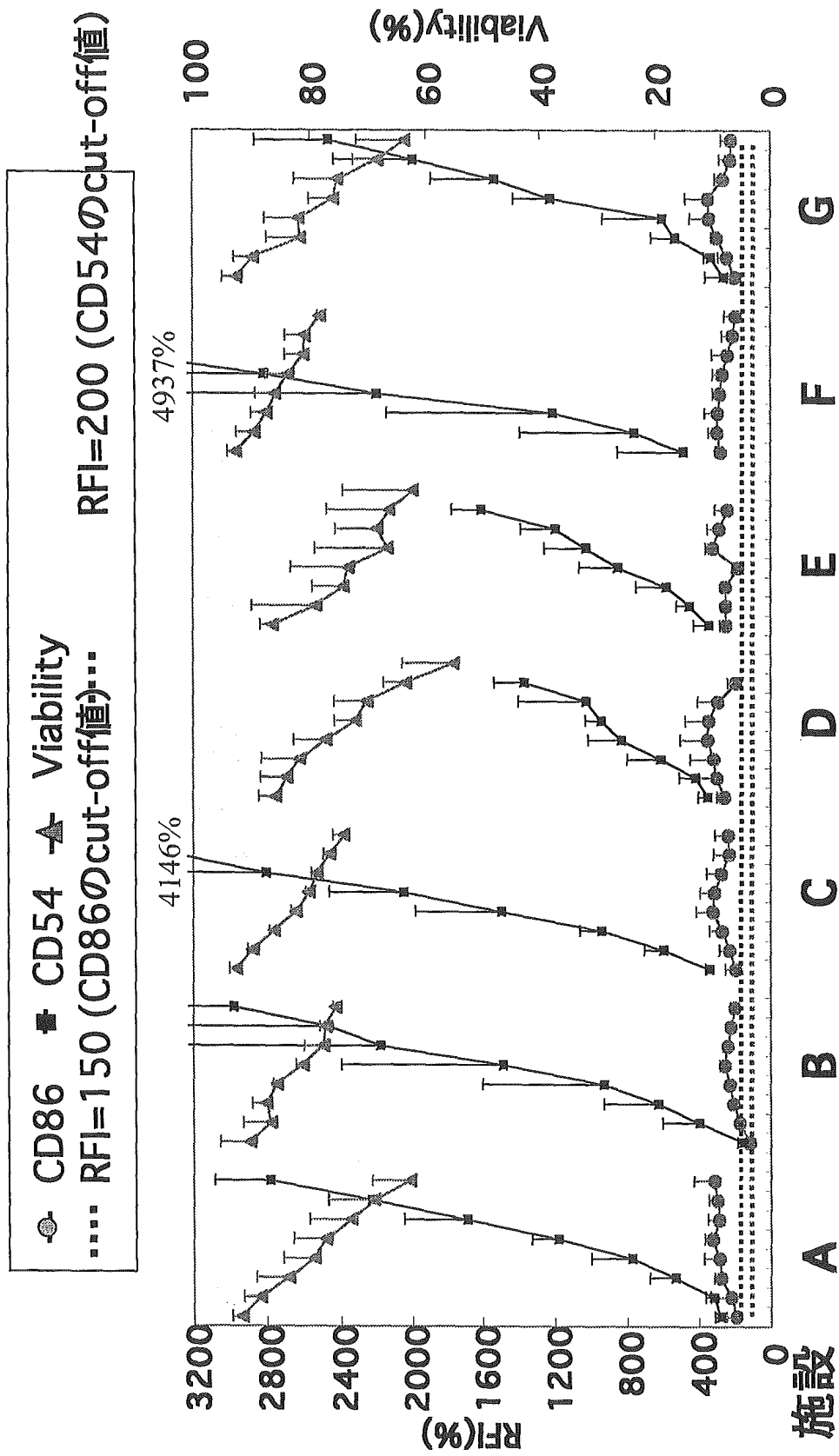
当初施設 F において、陽性対照として設定したDNCB 5μg/mL(赤線枠。今回は CV75/1.2相当)の生存率が50%未満でありCD86/CD54の発現量の測定ができなかった。また施設 D において、Niの測定時にコントロールの生存率が90%未満となった。それぞれ細胞の不調が考えられたため新たに細胞を起こし直して再び試験を行ったところ、陽性対照とコントロールの生存率がそれぞれ50%、90%を超え用量反応性も他施設とほ

図4-2a DNCB (感作用物質) の施設間再現性



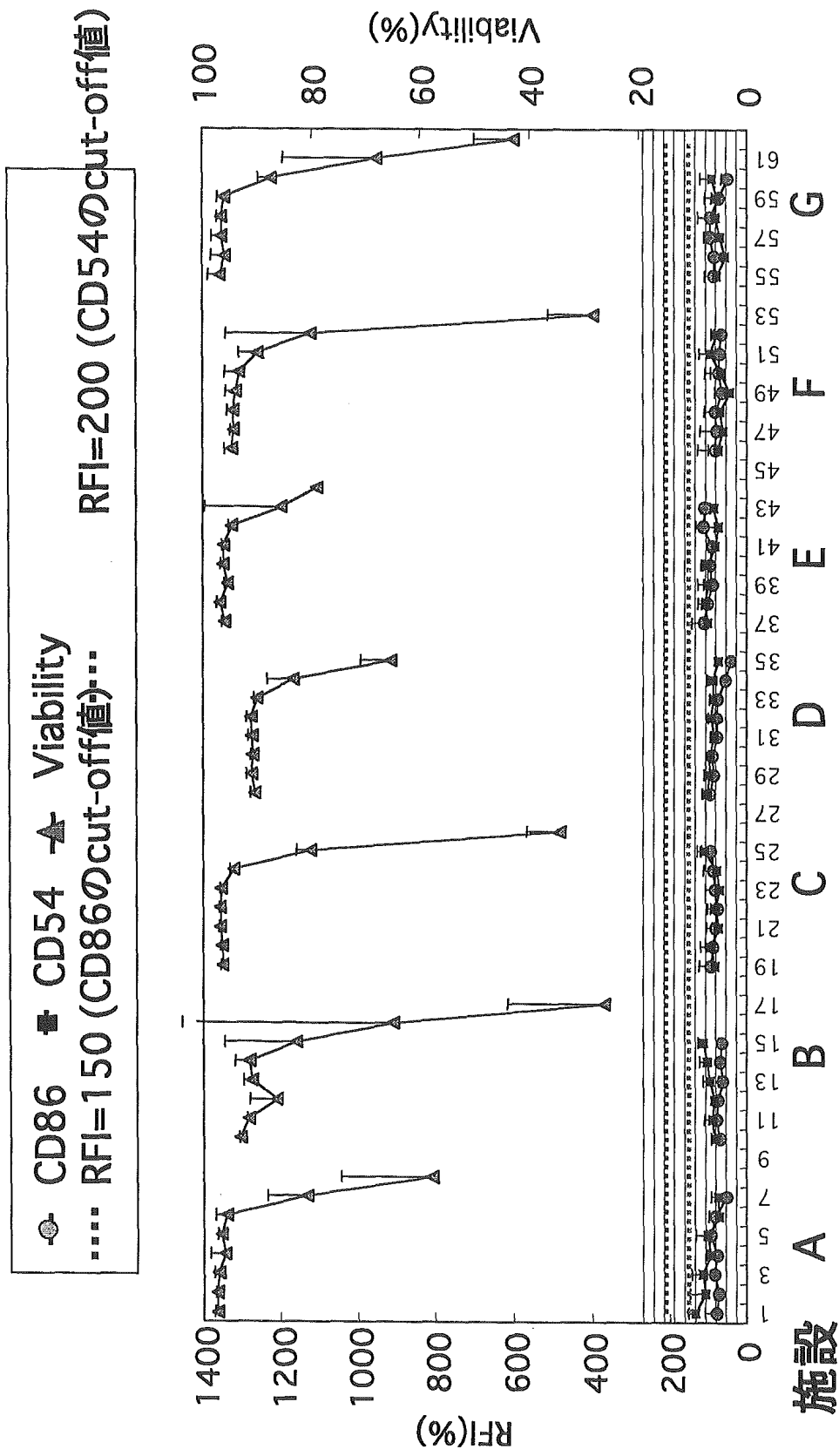
横軸に適用濃度 (CV75を基準に公比1.2の8濃度) 、縦軸 (左) にCD86/CD54のRFI (相対発現量) (%)、縦軸 (右) に細胞生存率(%)を示した。7施設全てCD86/CD54とも複数濃度において陽性を示した。全ての施設で低濃度から濃度依存的にCD86/CD54の発現量が亢進し、高濃度では細胞毒性の影響により亢進が抑制されていた。

図4-2b Ni (感作性物質) の施設間再現性



7施設全てCD86/CD54とも複数濃度において陽性を示した。特にCD54については濃度依存的に非常に強い発現亢進が認められた。各施設ともほぼnon-toxicからsub-toxicまでの毒性が見られる濃度範囲において評価していた。

図4-2c SLS (非感受性物質) の施設間再現性



7施設全てCD86/CD54とも全ての濃度において陰性を示した。各施設ともnon-toxicからsub-toxic (あるいはそれ以上の毒性) までの毒性が見られる濃度範囲において評価していた。

表4-2 施設間再現性のまとめ

被験物質	施設							
	A	B	C	D	E	F	G	
p-Benzoquinone (BQ)	+	(+/+)	+	(+*/-)	+	(+/-)	+	(+/-)
Glutaraldehyde (GA)	+	(+/+)	+	(+/-)	+	(+/-)	+	(-/+)
Ethylene diamine (ED)	+	(+/-)	+	(+/-)	+	(+/-)	+	(+/-)
Eugenol (EU)	+	(+/-)	+	(+/-)	+	(+/-)	+	(+/-)
Lactic acid (LA)	-	(-/-)	-	(-/-)	-	(-/-)	-	(-/-)

結果: += 陽性、-= 陰性 Battery (CD86/CD54)

LLNAが陽性でh-CLATが陰性(不一致)の箇所は網掛けで示した。
 *:施設“D”は8回の試験を行い、総合的にBQを陽性と判断した。

基本的に施設間再現性は良好であったが、偽陰性が2例(Ethylene diamine, Eugenol)存在した。さらに陽性でもCD86/CD54の発現パターンが異なる例も散見された。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
大野泰雄	動物実験代替法研究の重要性とその課題—薬理学会における動物実験の問題点—	日薬理誌	125	325-329	2005
大野泰雄、酒見和枝、簾内桃子	ヒト組織の研究利用体制の構築と研究応用、4. 手術摘出肝組織からの肝細胞調製とヒト肝細胞を用いた試験系のバリデーション.	臨床薬理	36	127-128	2005
Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., Miyazawa, M., Ito, Y., Suzuki, H., and Toyoda, H	Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol	Toxicol In Vitro	accepted		2006
Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H	Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT	Toxicol In Vitro	accepted		2006

2006年2月24日

光毒性評価会議報告資料

厚生労働科学研究のin vitro光毒性試験バリデーション
における酵母光生育阻害試験のプロトコル修正につ
いて

(株) 資生堂 安全性・分析セン
ター

本日の報告

1. 背景
2. 目的
3. 試験方法
4. 試験条件の設定
5. 試験条件の検証
6. 総括

1. 背景

1.1. 2003~2004年度酵母光生育阻害試験バリデーション

結果

Chemical name	in vivo result	Evaluation of each experiment and final assessment												
		Lab-a		Lab-b		Lab-c		Lab-d		Lab-e		Lab-f		
		1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	
SLS	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
BMDM	N				N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Chlorhexidine	N	E	E	E	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Bismuth	N	P	P	P	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
6-MC	N				N	N	N	E	E	E	E	E	E	E
Acridine	P				P	E	P	E	E	P	E	E	E	E
Anthracene	P	P	P	P	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Amiodarone	P	P	P	P	N	N	P	E	P	E	E	E	E	E

P: 陽性
E: グレーゾーン
N: 陰性

CPZ および 8-MOP 本邦市場での使用は、これらグレイゾーンに属する結果がばらばらにみられる。また、CPZ および 8-MOP の阻害帯の幅が、これらグレイゾーンに属する結果がばらばらにみられる。

陽性対照である8-MOPを含めいくつかの陽性（5mm≦阻止帯の差）の被験物質の阻止帯がグレイゾーン（2mm≦阻止帯の差<5mm）に分類された

厚労科学研の大野先生より、「これらグレイゾーンとなったいくつかの被験物質について陽性となる新たな試験条件を設定してほしい」との要請があった。

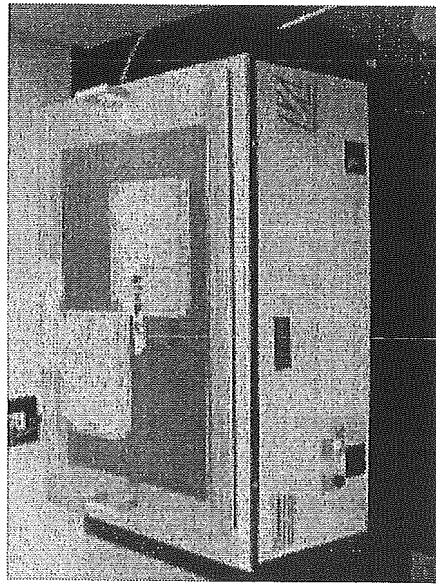
1.2.パリテーションで多くの陽性物質がグリーンに落ちた

理由

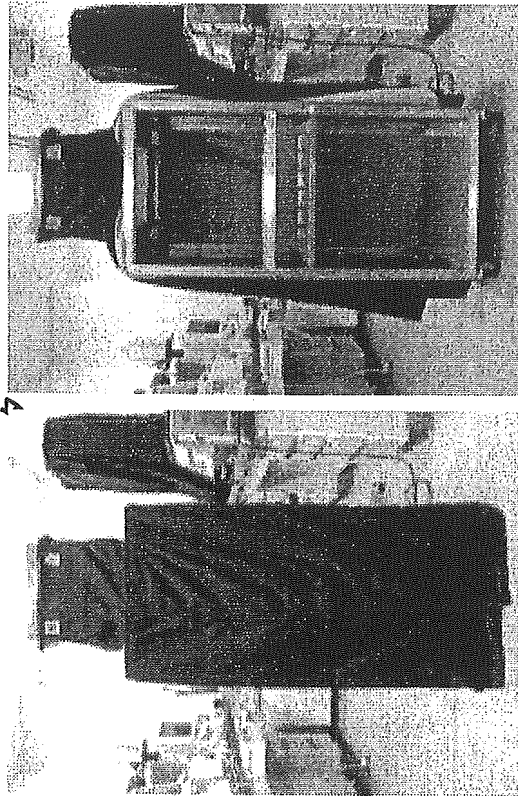
- ①資生堂で開発研究が行われた時とパリテーション時で光源が異なっている
- ②パリテーションにおいて光源を覆う暗幕の使用が施設によって異なっている。
(プロトコルには暗幕の使用について記載されていない)

	光源	暗幕
資生堂における開発研究時	トランスイルミネーター (UVA)	—
厚生労働科学研究パ リテーション時	ソーラシミュレーター (人工太陽光)	あり
	資生堂以外 ソーラシミュレーター (人工太陽光)	なし

トランスイルミネーター



ソーラシミュレーター



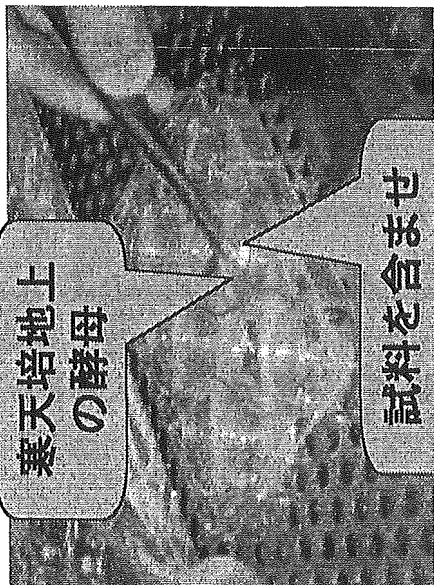
暗幕があると光が反射して、照射強度が上がる。また、温度が上昇する

2. 目的

- ・厚生労働科学研究・in vitro光毒性試験バリ
デーションにおける酵母光生育阻害試験で、
陽性対照である8-MOPが明らかに陽性を示す
新たな試験条件を設定することを目的とした
- ・さらに、バリデーションで使用された物質
及び論文で報告した物質の中から13種の被験
物質を選択し、設定した試験条件の妥当性を
確認した。

3. 試験方

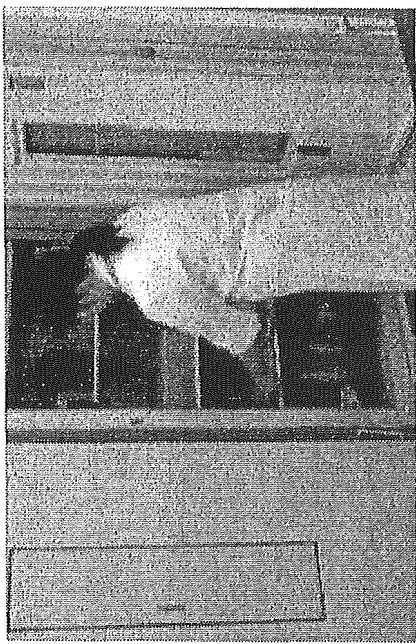
法



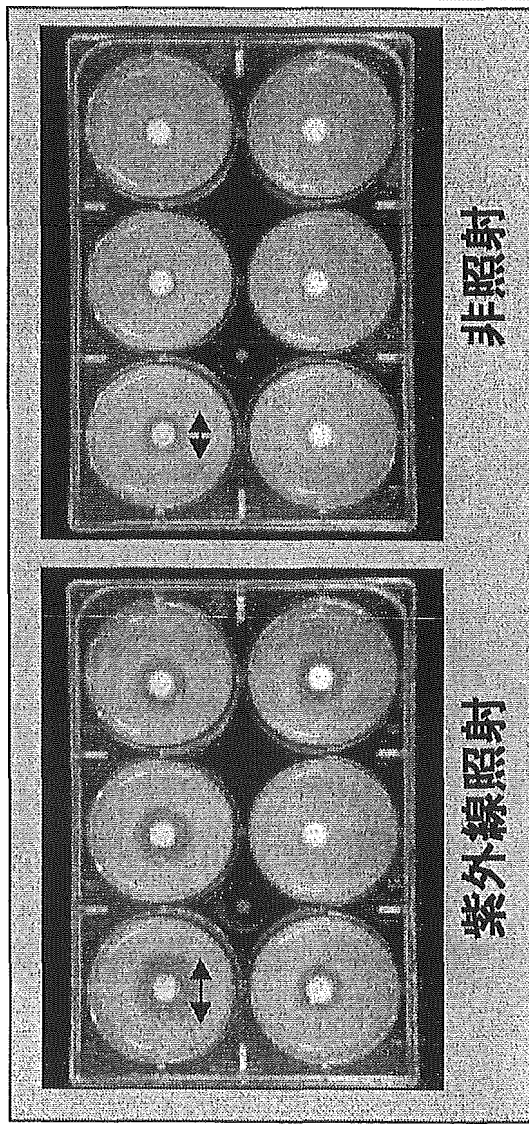
酵母に試験料を接触し、前培養



人工太陽光を照射
(暗幕を使用せずに実施)



恒温槽(25°C)で72時間培養



阻止帯の長さを測定

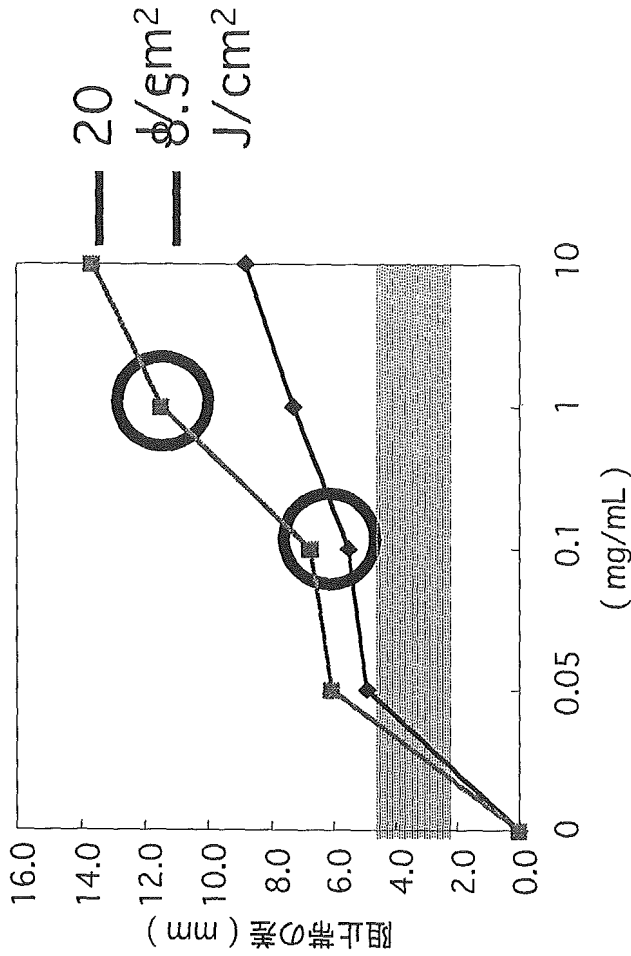
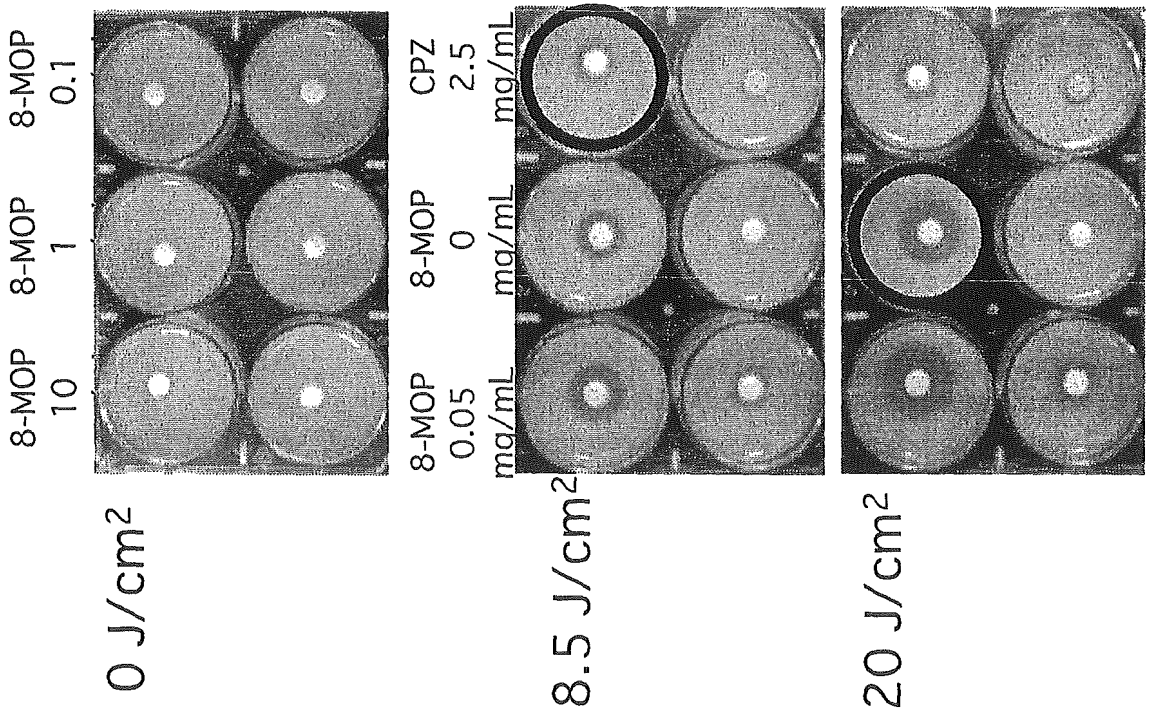
判定方法
(阻止帯の直径) -
(ペーパーディスク
の直径)

陰性：阻止帯の差<2mm
グレーゾーン：2mm ≤ 阻止帯の差 < 5mm
陽性：5mm ≤ 阻止帯の差

4. 試験条件の設定

定

4.1. 陽性対照8-MOPを用いた試験条件の検討



従来の試験法での陽性対照である0.1 mg/mL (赤)では阻止帯が小さくはつきりしていない

→ 明らかな阻止帯が観察された1 mg/mL (黄)を陽性対照とした。

陽性対照物質8-MOPの試験条件として濃度 1 mg/mL, 照射量 20 J/cm²を設定した。