

4.2. Rose Bengalを用いたプレインキュベーション時間の検討

討

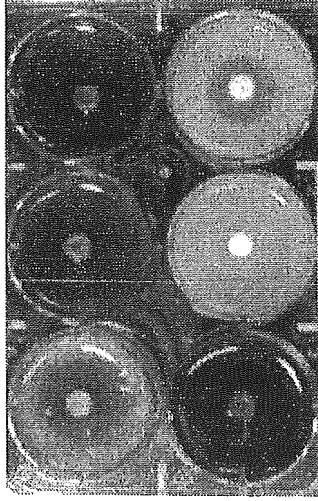
光毒性物質

Rose Bengal
10 mg/mL

KOSEさんより「プレインキュベーションが阻止帯の差を大きくする」との情報提供があり、プレインキュベーションの有用性について照射量を20 J/cm²として検討した。（詳細はKOSEさんから報告予定）

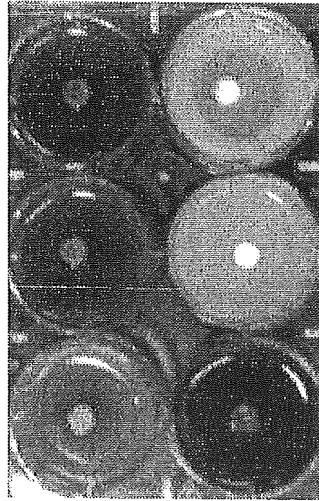
プレインキュベーション

0 時間

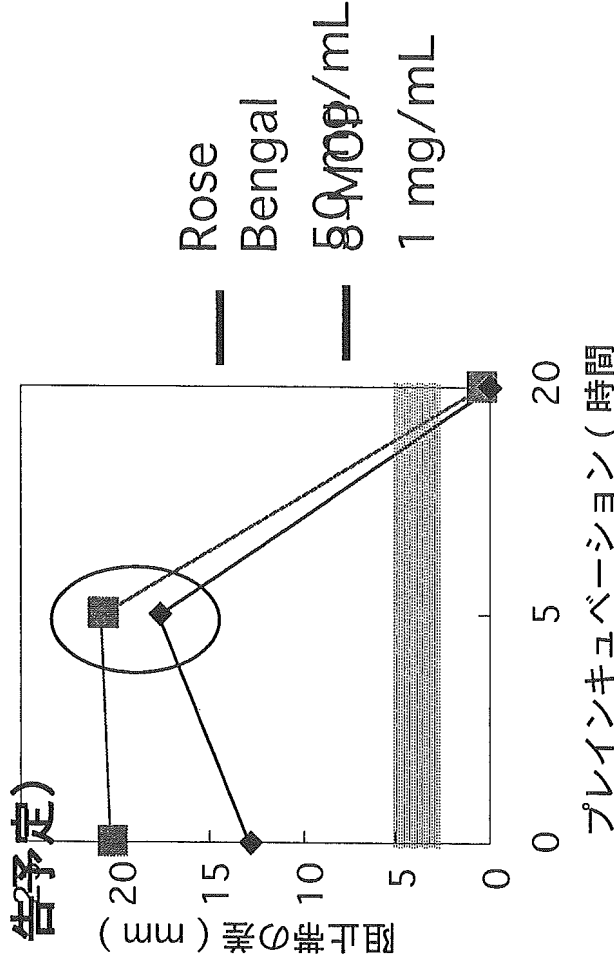
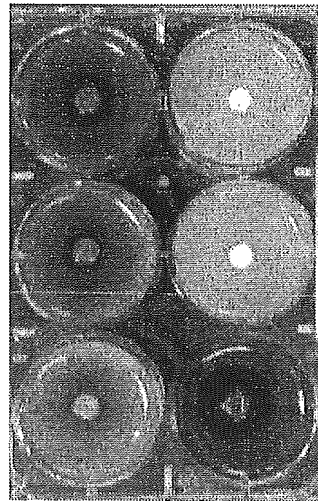


Rose Bengal DMSO 8-MOP
250 mg/mL 1 mg/mL

5 時間



20 時間



プレインキュベーション20時間ではRose Bengal及び8-MOPのどちらにおいても阻止帯が小さかった。

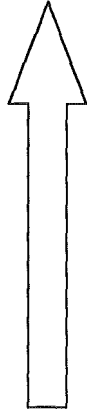
明らかな阻止帯の差の増加が認められた5時間と新しい試験条件とした。

4.3.小

括

光毒性陽性物質8-MOPが確実に陽性となる試験条件を設定した。

従来の試験条件



新しい試験条件

陽性対照
8-MOP 0.01% (0.1
mg/mL)
照射量
8.5 J/cm²
プレインキュベーション

なし

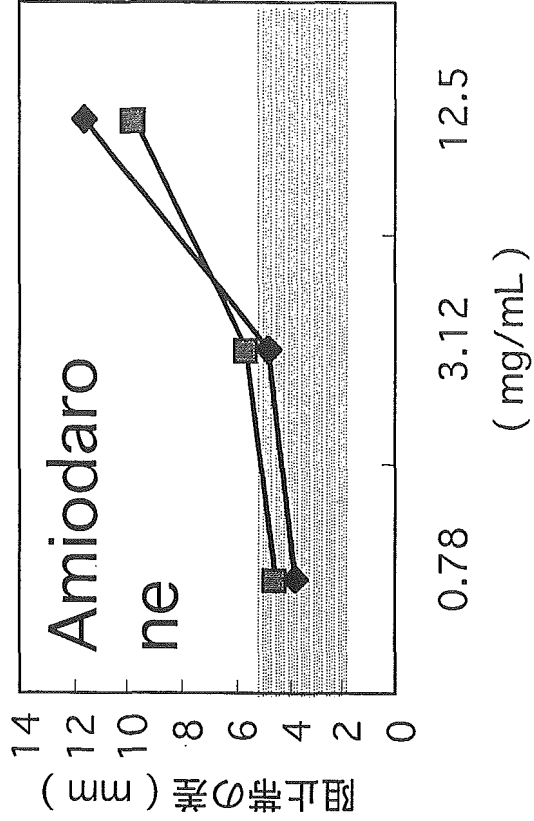
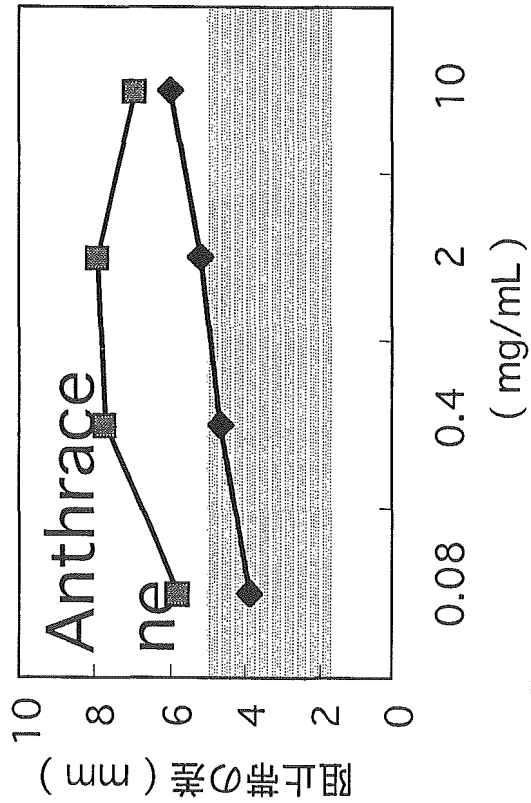
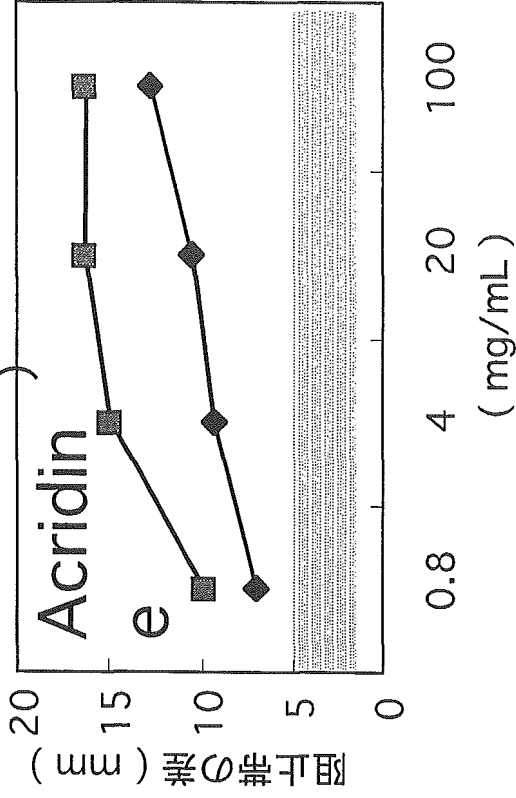
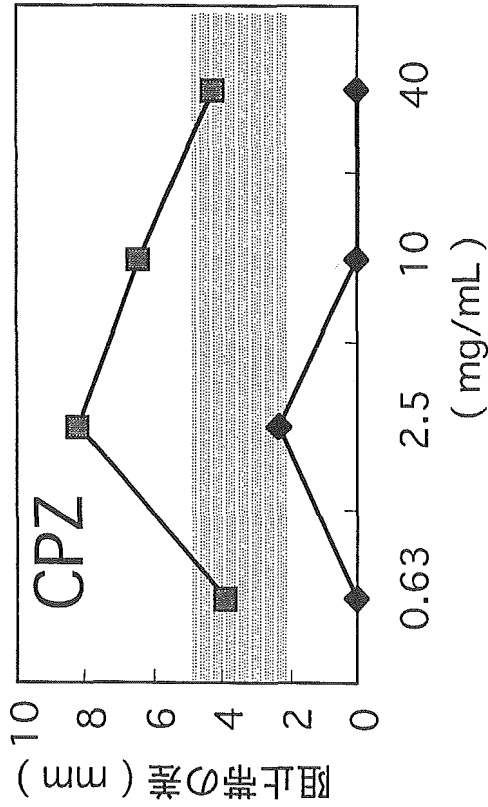
陽性対照
8-MOP 0.1% (1
mg/mL)
照射量
20 J/cm²
プレインキュベーション

5. 試験条件の妥当性の検証

— プレインキュベーションなし

— プレインキュベーション (5時間)

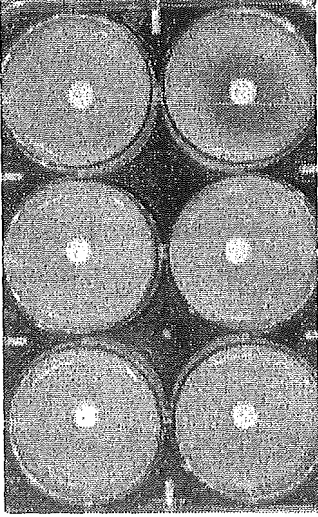

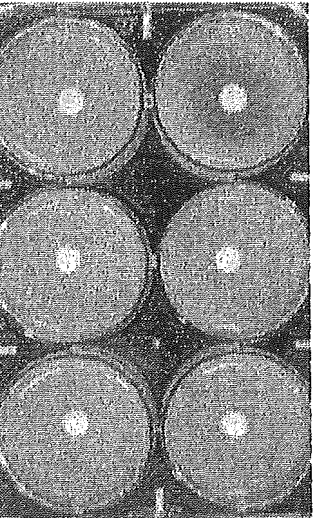
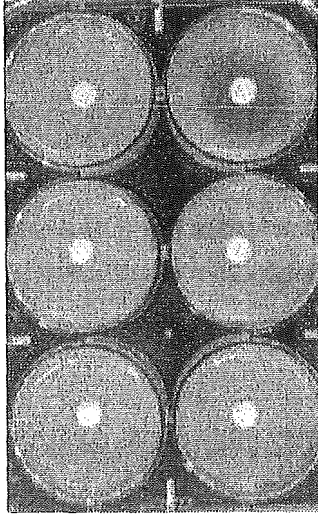
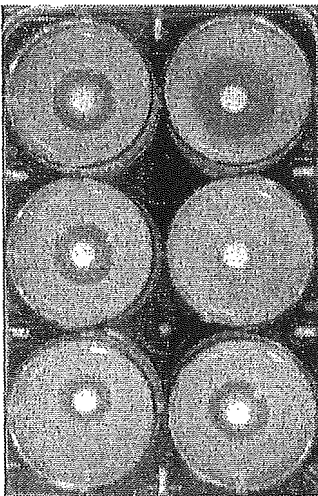
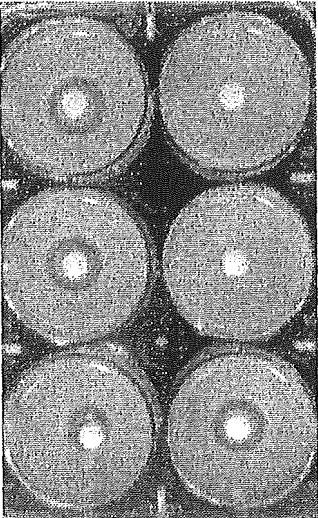
5.1. 光毒性陽性物質における検討



グレーゾーンに落ちる場合のあった陽性物質が陽性となることを確認した。

5.2. 光毒性陰性物質における検

討

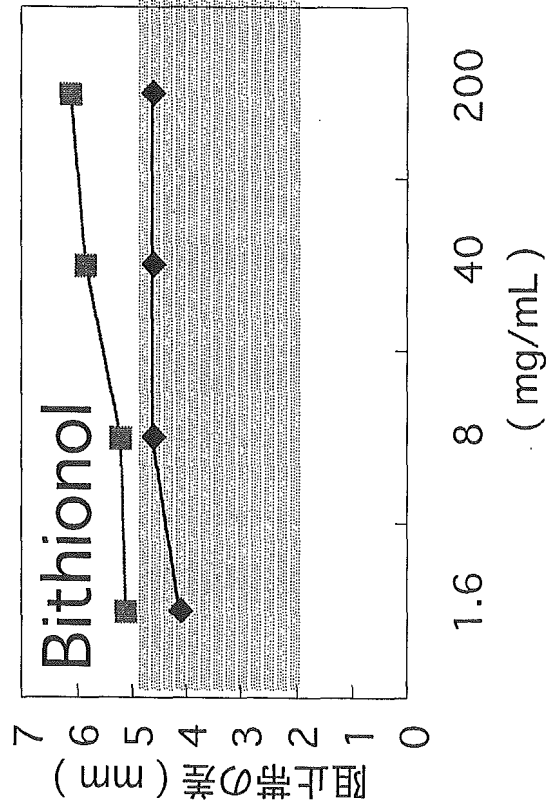
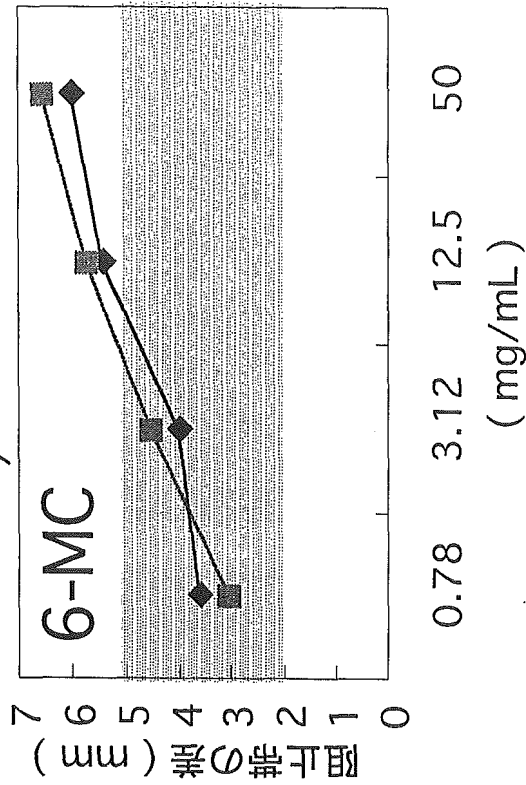
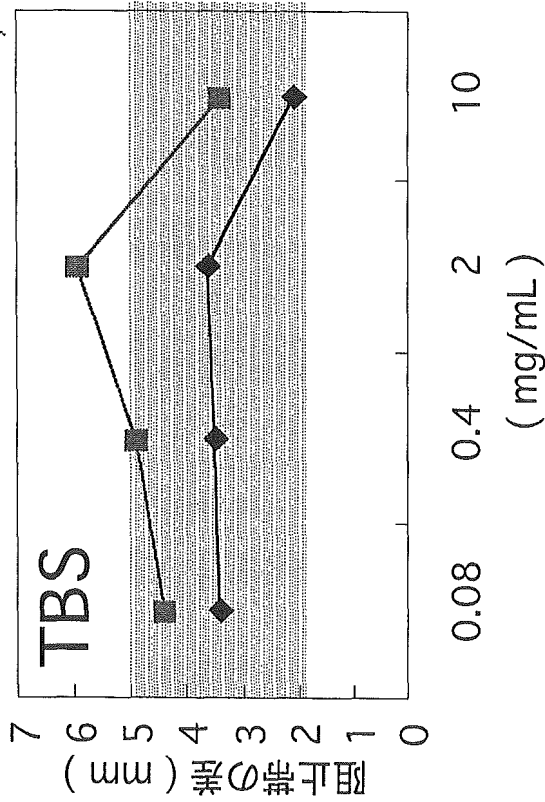
EHMC	Sulfanilamide	BMDM
8 mg/mL 40 mg/mL 200 mg/mL  undiluted EtOH 8-MOP 1 mg/mL	0.4 mg/mL 2 mg/mL 10 mg/mL  50 mg/mL MeOH 8-MOP 1 mg/mL	0.8 mg/mL 4 mg/mL 20 mg/mL  100 mg/mL EtOH 8-MOP 1 mg/mL
Chlorhexidine		
0.08 0.4 mg/mL 2 mg/mL  10 mg/mL EtOH 8-MOP 1 mg/mL	7.81 31.24 124.8  500 mg/mL EtOH 8-MOP 1 mg/mL	非照射 

5種の陰性物質は新しい試験条件下(20J/cm², プリンチペーション5時間)でも陰性を示し、影響は認められなかった。

光毒性陰性物質における検討 (続き)

— プリンキエーションなし

— プリンキエーション (5時間)



光毒性陰性物質の中には、グレーゾンから陽性となる物質が認められた。ただし、この3種はいずれも光感作性物質であり、さらに6-MCとBithionolはin vivo光毒性陽性という報告がある。

5.3. 妥当性の確認のまとめ

Chemical name	in vivo result	Evaluation of each experiment and final assessment												今回の結果			
		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		
BMDM	N				N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
Chlorhexidin	N	E	E	N	N	N	N	N	N	N							N
Bithionol	N	P	P	E	N	E				E	E	E	E	E	E		P
6-MC	N				N	N	N	E	E	E	E	E	E	E	E		P
Acridine	P				P	E	P	E	E	P	E	E	E	E	E		P
Anthracene	P	P	P	E	P	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		P
Amiodarone	P	P	P	N	N	P	E	P	E	E	E	E	E	E	E		P
CPZ	P	P	P	E	N	N				E	E	E	N	N	N		P
8-MOP	P	P		E~P			P	P	P	P	P	P	P	P	P		P

Chemicals	In vivo	Growth inhibition zone (mm)	
		ハリゲーション (従来の条件)	今回の試験条件
Indomethacin	N	4.9	0
TBS	N	4.3	6.0
EHMC	N	0	0
Sulfanilamide	N	0	0

偽陰性は認められなかった。偽陽性はBithionol, 6-MC, TBSの3品であ

6. 総括

括

酵母光生育阻害試験における試験条件として以下を再提案する。

照射量：20J/cm²

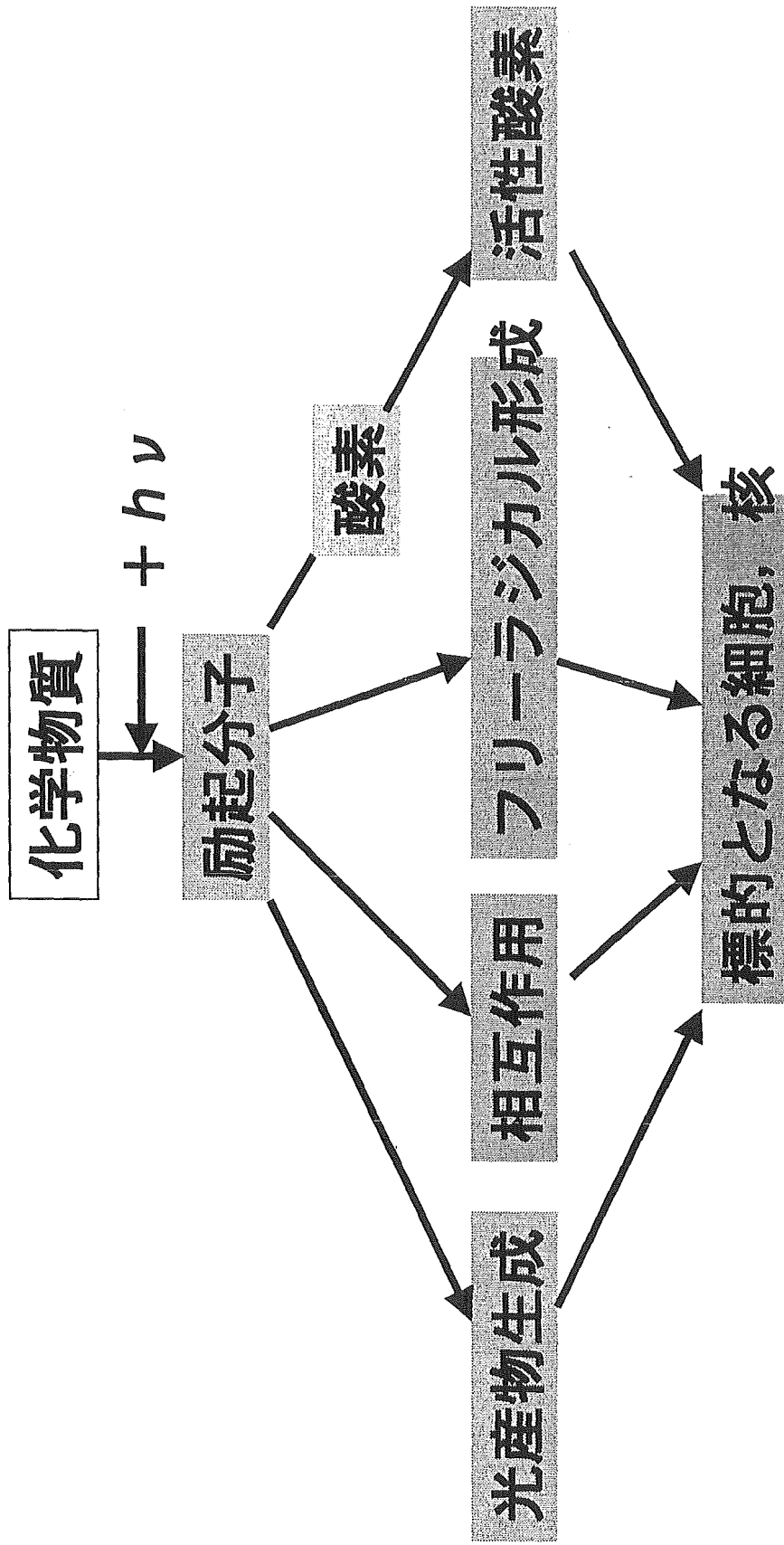
プレインキュベーション：5時間

陽性対照物質8-MOPの濃度：1 mg/mL

終

資料

光毒性発現のメカニズム



- ・ 光細胞毒性試験：細胞毒性 (OECDガイドライン)
- ・ 酵母光生育阻害試験：膜破壊, 細胞小器官への影響
- ・ 赤血球光溶血試験：膜破壊

光毒性試験代替法

厚生科学研究班
に提案した
光毒性評価フロー

UV吸収の確認

配合予定濃度で実施

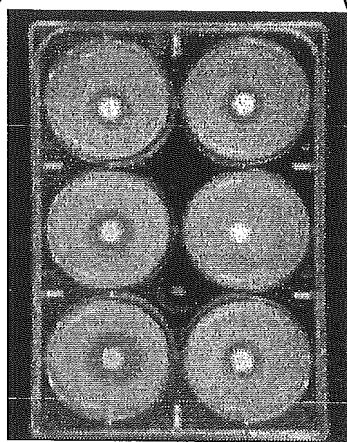
吸収なし

試験省略

光毒性の問題なしとして終了

吸収有り

in vitroでのスクリーニングテスト
・酵母光生育阻害試験



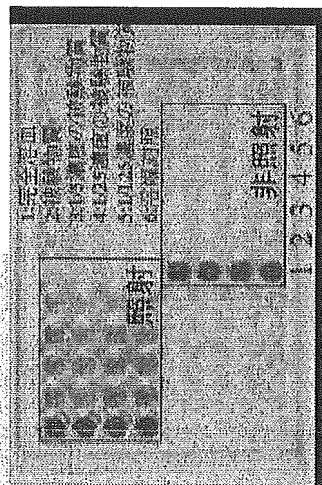
陽性

陰性

光感受性あり
光毒性物質の可能性あり
試験終了

陽性

赤血球光溶血性試験法



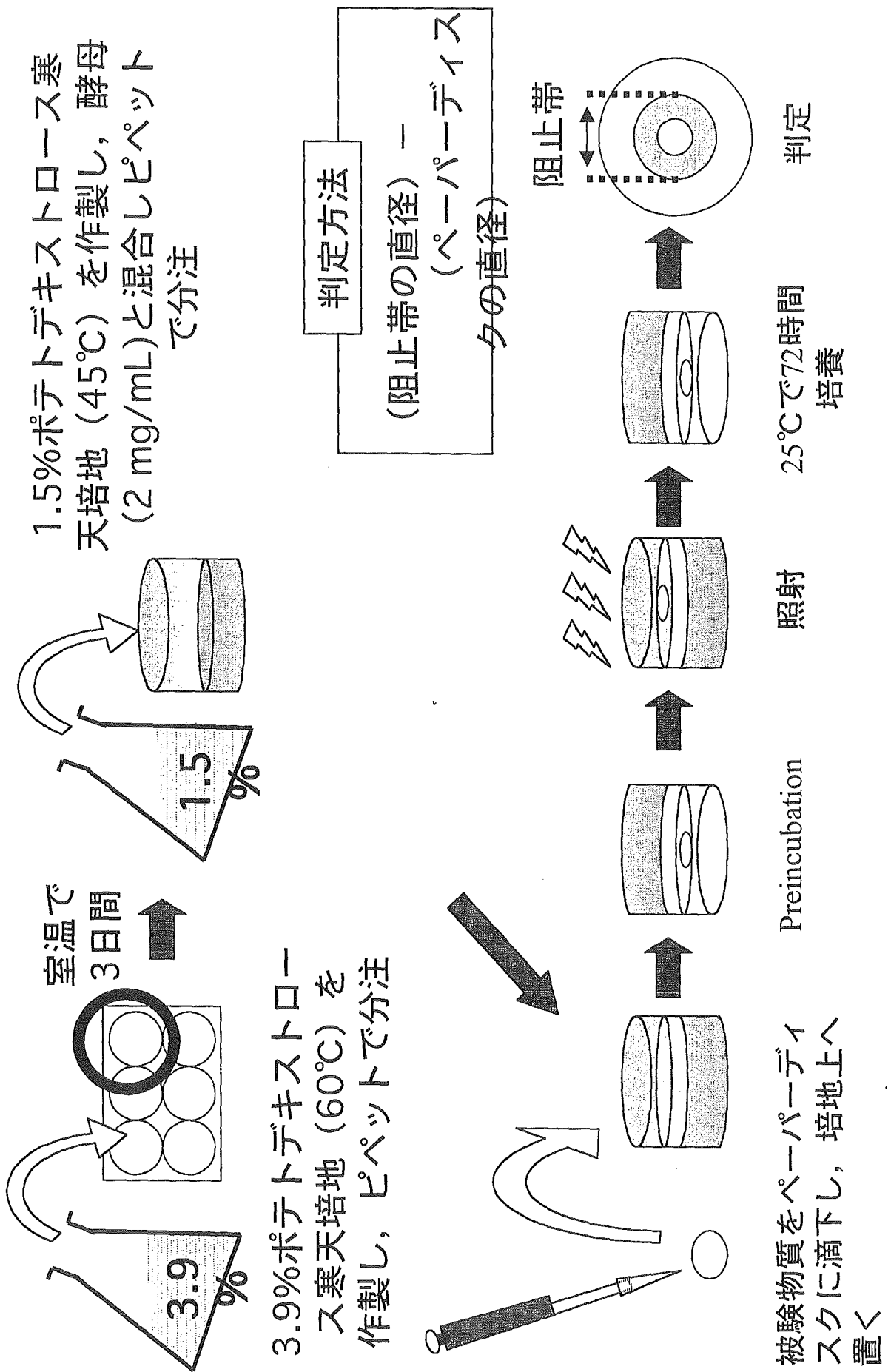
陰性

酵母光生育阻害試験
- : 阻止帯の差 < 5 mm
+ : 5 mm ≤ 阻止帯の差

赤血球光溶血試験
- : 溶血度の差 < 5
- : 5 ≤ 溶血度の差 < 10
+ : 10 ≤ 溶血度の差

光毒性の問題なしとして終了

試験方法



in vitroとin vivo光毒性との対応性

		In vivo (モルモット)	
		+	-
In Vitro	+	8-MOP, 5-MOP, Phantolid, Galaxolide, CPZ, TCOSA, Acridine, Anthracene (8)	Escalol 507 (1)
	-	(0)	(0)
	-	(0)	(0)
			6-MC, TBS, Bithionol, Rose Bengal (4)
			Sulfanilamide, TCC, Piroxicam, Indomethacin, Musk Ambrett, Musk Ketone, Musk Xylene, ASL-24, ASL-24S, Parsol MCX, Parsol 1789 (11)

感度	100%
特異性	73%
予測値(+)	69%
予測値(-)	100%
一致度	81%

光感作物質 : TBS, 6-MC, Bithionol
 光毒性物質 (ウサギ) : Rose Bengal, Bithionol.

酵母及び赤血球を用いる光毒性試験代替法の妥当性

光毒性 (n=70)	In vivo (モルモット)		
	+	-	
In Vitro (Battery)	+	1	1
	-	0	4
	-	0	0
		0	0
		0	9

感度	100%
特異性	70%
予測値(+)	45%
予測値(-)	100%
一致度	74%

結論

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶解試験を組み合わせることに
より、難溶性物質も含め、False
Negativeのない評価系を開発した。

Chemicals	In Vitro										In vivo	
	YGIPT		RBC PH		Battery System		3T3 NRU PT		Guinea pig			
	Solar	UVA	Solar	UVA	Solar	UVA	Solar	UVA	Solar	UVA		
Fragrance materials	Musk ambrette	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	Musk ketone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Musk xylene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Phantolid	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Galaxolide	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8-MOP	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	5-MOP	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	6-MC	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	BMDM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UV filters	EHMC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HMBS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	EDA	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
	Sulfanilamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Drugs	Indomethacin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Piroxicam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CPZ	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	TCC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bithionol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Antimicrobials	TBS	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	TCSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Rose Bengal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Dyes	Acridine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Anthracene	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

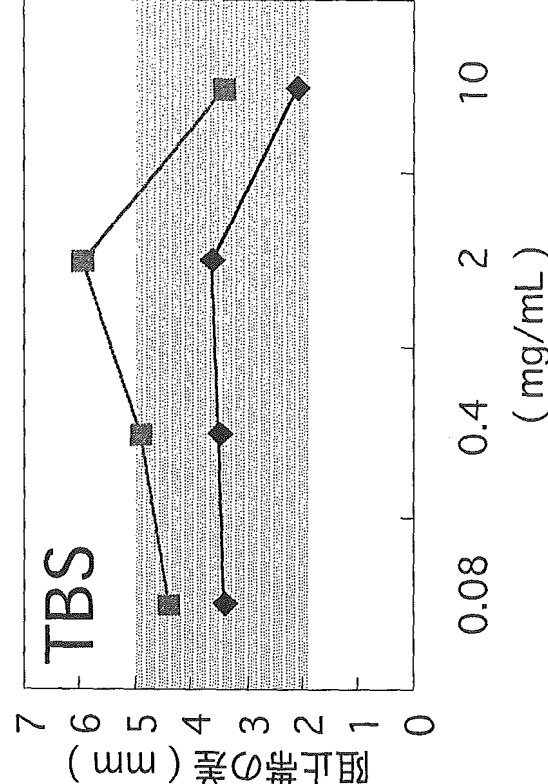
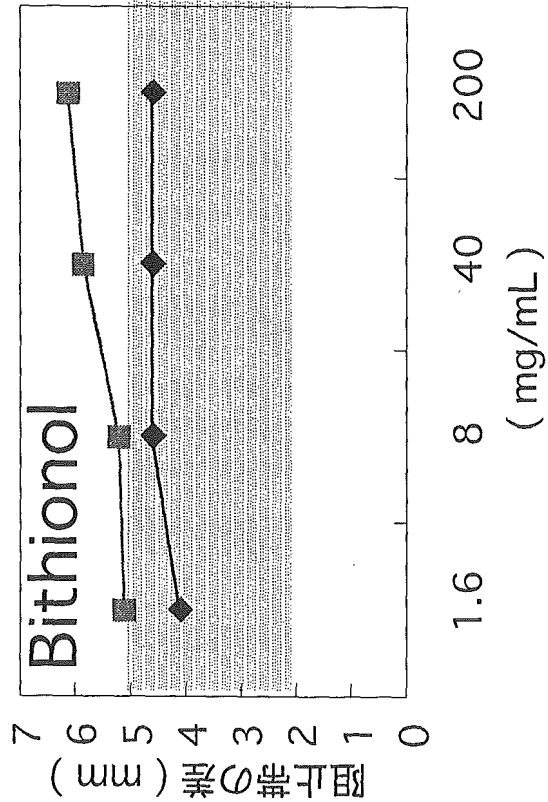
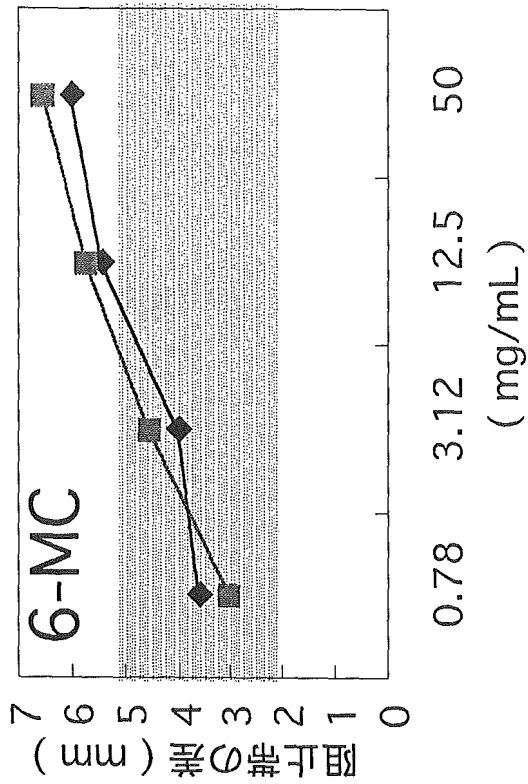
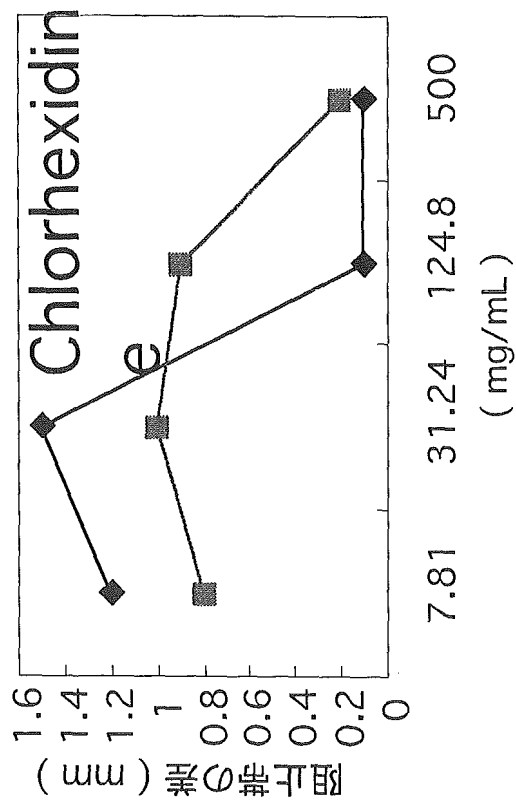
EUおよび資生堂におけるin vivo試験結果

Chemicals	EU		shiseido
	animal	human	
Fragrance materials	Musk ambrette	-	-
	5-MOP	+	+
	8-MOP	+	+
Fragrance material	6-MC	weak +	-
UV filter	HMB	No data	-
Drug	CPZ	+	+
Antimicrobials	Bithionol	-	-
	TCSA	+	+
Dyes	Rose Bengal	-	-
	Acridine	+	+
	Anthracene	+	+

8-MOPの陽性対照としての至適濃度の検討

8 MOP濃度 (mg/mL)	暗幕なしでの阻止帯の差				暗幕ありでの阻止帯の差			
	1回目		2回目		1回目		2回目	
	データ1	データ2	データ1	データ2	データ1	データ2	データ1	データ2
0.1	4.9	4.9	5.3	4.5	8.7	9.3	8.8	8.5
0.5	7.3	7.2	7.1	6.6	12.4	12.0	12.0	11.3
1.0	8.0	7.9	7.8	7.7	13.3	13.0	12.4	12.5
1.5	8.4	8.5	8.0	7.8	14.1	14.0	12.8	12.9
2.0	8.6	8.7	8.2	8.4	14.2	14.1	13.1	13.1
2.5	8.7	8.8	8.1	8.4	14.3	14.2	13.2	13.6
				平均				平均
				4.9				8.8
				7.1				11.3
				7.9				12.5
				8.2				13.5
				8.5				13.6
				8.5				13.8

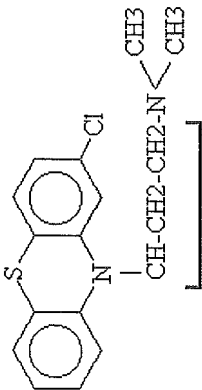
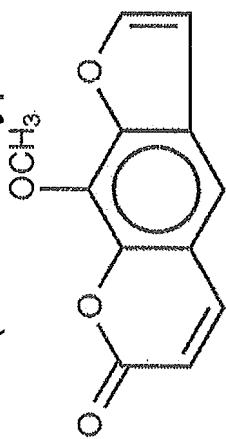
結果



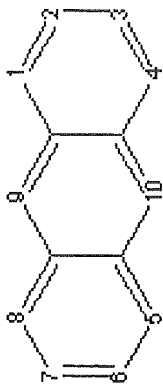
— preincubationなし — 5時間

各被験物質の構造

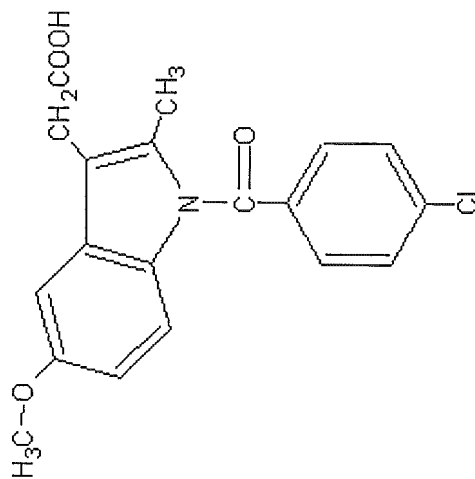
8-MOP(8-methoxypsoralen) CPZ(Chlorpromazine)



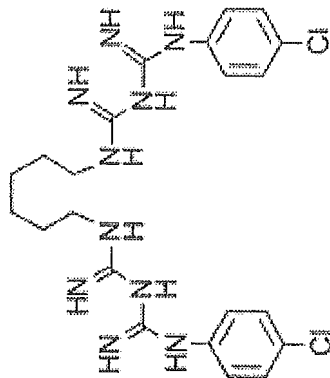
Anthracene



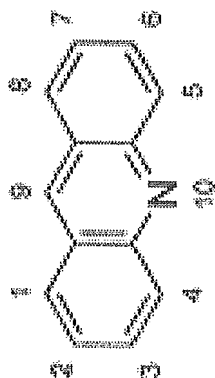
Indomethacin



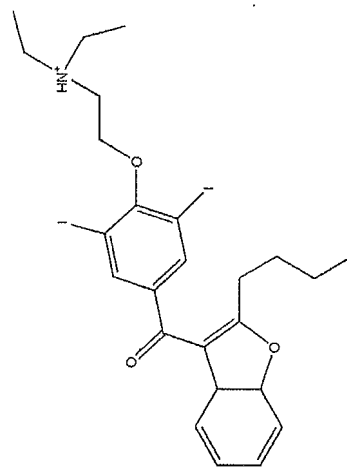
Chlorhexidine



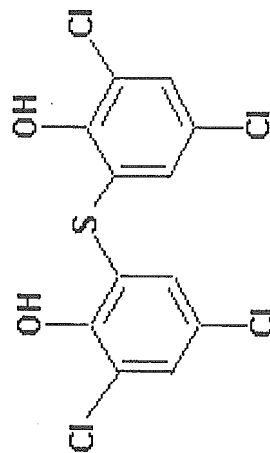
Acridine



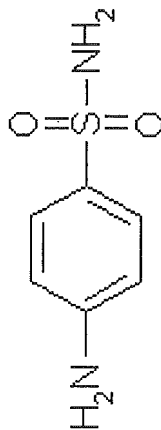
Amiodarone



Bithionol



Sulfanilamide

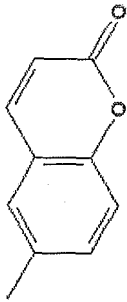


各被験物質の構造

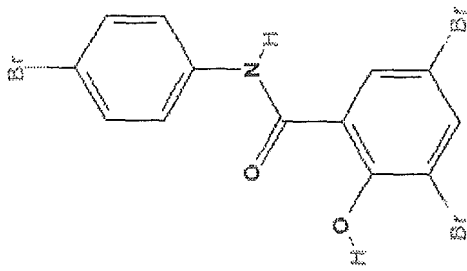
Sodium Laurel Sulfate (SLS)



6-Methylcumarin

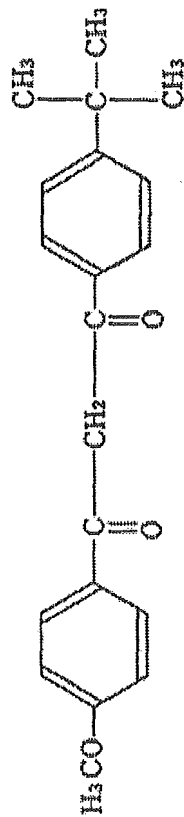


tribromosalicylanilide



BMDM

(Parsol 1789; 4-t-Buthyl-4-methoxydibenzoylmethane)



EHMC

(Parsol MCX; 2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate)

