

2) 皮膚感作性試験代替法の評価

研究要旨

皮膚感作性試験Local Lymph Node Assay (LLNA)の放射性同位元素(RI)標識化合物を用いない代替法(LLNA-DA法およびLLNA-BrdU法)の多施設バリデーションを実施するよう日本動物実験代替法学会バリデーション委員会に依頼した。LLNA-DAバリデーション研究の結果、12の被験物質の濃度範囲で得られた結果はLLNA法と同程度であった。

LLNA-BrdUについては、現在、バリデーションを実施中である。

A. 研究目的

ダイセル株式会社から提案された皮膚感作性試験 Local Lymph Node Assay (LLNA)の放射性同位元素(RI)標識化合物を用いない代替法であり、ATP 含量の変化を指標とする方法(LLNA-DA 法)と(財)化学物質評価研究機構から提案のあった BrdU の取り込みを指標とする方法(LLNA-BrdU 法)の評価を感作性試験評価のための評価委員会にて提案者の提出資料及び文献的考察による一次評価を前年度に行い、1) これらの試験法は原法である LLNA 法とほとんど同じ原理による方法であること、2) ほとんど同一の識別能力を持つこと、3) RI を用いないこと、4) 簡便であるといった利点があると判断した。しかし、行政試験法として評価する為には、更にデータの信頼性や施設間ばらつきについての情報を得る必要があることから、評価委員会からの指摘に対応し、プロトコールなどを修正した後に、多施設バリデーションを実施するよう日本動物実験代替法学会に依頼した。

B. 研究方法

1) 組織

代替法学会では以下の構成からなるバリデーション委員会を組織し、LLNA-DA および LLNA-BrdU のバリデーションを実施した。

(委員長)

大森 崇(京都大学大学院医学研究科医療統計学分野)

(委員)

小島 肇(国立医薬品食品衛生研究所薬理部)

寒水孝司(大阪大学臨床工学融合研究教育センター)

吉村 功(東京理科大学工学部経営工学科)

出原賢治(ダイセル化学工業株式会社 評価・解析センター)

五十嵐良明(国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部)

金澤由基子(財団法人食品薬品安全センター 秦野研究所 医療用具試験室)

武吉正博(財団法人 化学物質評価研究機構 安全性 評価技術研究所 研究第一部)

小坂忠司(財団法人 残留農薬研究所 毒性部)

浦谷 衛(石原産業株式会社 中央研究所 安全科学研究室 安全性グループ)

山中 淳(ピアス株式会社 中央研究所 ARI 評価グループ)

篠田伸介(株式会社 薬物安全性試験センター 埼玉研究所 第二毒性部)

中村洋介(住友化学株式会社 情報電子化学業務室)

青儀 巧(大塚製薬株式会社 徳島研究所 安全性研究センター 第2研究室)

米田知史(トーアエイヨー株式会社 研究開発部 福島研究所)

花田智彦(日本新薬株式会社 創薬研究所 安全性研究部)

猪田健人(中野製薬株式会社 マーケティング本部研究)

田中正志(明治製菓株式会社 医薬開発部門 動態安全性研究所)

有馬和範(大正製薬株式会社 安全性研究所)

宇佐美雅仁(ホーユー株式会社 総合研究所 基礎研究室)

篠田直樹(参天製薬株式会社奈良研究開発センター)

湯浅敦子(富士フイルム株式会社 CSR 推進部 環境・品質マネジメント部

素材試験センター)

牧 栄二(財団法人食品農医薬品安全性評価センター)

表3. LLNA-DAおよびLLNA-BrdUバリデーションに用いた被験物質

No.	Chemical name	溶媒	適用濃度 (%)		
1	Isopropanol (2-Propanol)	A00	10	25	50
2	Hexylcinnamic aldehyde (Hexylcinnamal、 α-Hexylcinnamaldehyde)	A00	10	25	50
3	2, 4-Dinitrochlorobenzene (1-Chloro-2, 4-dinitrobenzene)	A00	0.1	0.3	1
4	Nickel sulfate (Nickel(II) sulfate hexahydrate)	DMSO	1	3	10
5	Dimethyl isophthalate	A00	10	25	50
6	Methyl salicylate	A00	10	25	50
7	Abietic acid	A00	10	25	50
8	3-Aminophenol	A00	1	3	10
9	Isoeugenol (mixture of cis and trans)	A00	1	3	10
10	Glutaraldehyde solution (ab. 25%)	ACE	0.1	0.3	1
11	Formaldehyde solution (36~ 38%)	ACE	1	3	10
12	Cobalt chloride	DMSO	0.3	1	3

プロトコールは添付資料2-3に示した。

2) 被験物質

LLNA-DAおよびLLNA-BrdUのバリデーションに用いた被験物質を表3に示した。

12の被験物質のうち、3物質は全10施設で、残りの9物質は3施設ごとに評価した、各被験物質をコード化し、3用量に調製して各実験施設に送付した。

3) 実験方法

LLNA-DA法のバリデーションのための実験プロトコールは添付資料2-1に示した。

リンパ節懸濁液の溶媒対照群のATP発光量に対する被験物質群のATP発光量の比 (stimulation index、SI値) が3を超えた場合、陽性と判定した。

LLNA-BrdUのバリデーションのための実験

C. 結果および考察

LLNA-DA法のバリデーション結果の詳細は添付資料2-2に記載した。それを以下に要約する。

全施設で評価した3被験物質および3施設で評価したその他の5被験物質については、施設間のばらつきは小さく、すべての施設の判定が一致した。施設間で判定が一致しなかった4物質中2物質は明らかな用量反応関係がみられたが、残りの2物質 (Cobalt chlorideとNickel sulfate) はばらつきが大きかった。この原因にはこれら被験物質の溶媒や被験物

質の物性が影響している可能性がある」と推察された。GPMT/BT 法に対するLLNA-DA 法の感度、特異度、一致割合はそれぞれ87.5% (7/8)、100% (3/3)、90.9% (10/11)であり、この結果は同じ被験物質の文献値で算出したGPMT/MT 法に対するLLNA-DA法の感度、特異度、一致割合と同程度であった。

LLNA-BrdUのバリデーションについては、現在実施中である。

D. 結論

本バリデーション研究で実施した12 の被験物質の濃度範囲で得られた結果はLLNA 法と同程度であると思われる。LLNA-BrdUバリデ

ーション試験については、現在実施中であり、まだ結論は得られていない。

E. 資料

添付資料 2-1 : LLNA-DA 法バリデーション研究計画書

添付資料 2-2 : LLNA-BrdU 法プロトコール

添付資料 2-3 : LLNA-DA 法バリデーション研究の報告

添付資料 2-4 : LLNA-BrdU 法 バリデーション研究計画書

添付資料 2-5 : LLNA-BrdU 法 SOP

3、皮膚腐食性試験代替法のバリデーションと評価

研究要旨

皮膚腐食性試験代替法としての皮膚三次元モデル (VitroLife-Skin™) においては、多施設バリデーションにおいて、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。現在、これの第三者による評価を実施している。

A. 研究目的

皮膚に対する直接的な傷害の有無の判定は化学物質の安全性評価において重要である。即ち、不可逆的な傷害である皮膚腐食性を示すものは劇物と判定され、その取り扱いについて厳しい規制を受ける。また、皮膚腐食性を示す物質を経口投与等で毒性試験することは動物に大きな苦痛を与えるとともに、適正な毒性試験遂行に支障を来す。そこで、従来よりウサギを用いる *in vivo* 皮膚刺激/腐食性試験法 (Draize et al, Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. JPET 82: 377-390, 1944, OECD guideline 404) により皮膚腐食性の有無が評価されてきた。しかし、この方法は動物に激しい苦痛とストレスを与える。そこで、*in vitro* 皮膚腐食性試験代替法が開発されてきた。OECD はガイドライン 430 と 431 でそれぞれ TER 法と EPISKIN™ と EpiDerm™ 法を承認している。一方、我が国では OECD で承認された方法で得られた結果は基本的に受け入れるとの姿勢ではあるが、実際に腐食性試験代替法で得られたデータを基に評価された例は見あたらなかった。また、皮膚刺激性試験代替法としての皮膚モデルは日本でも VitroLife Skin™ を始めとして、いくつか開発されているが、皮膚腐食性試験代替法としてのバリデーションは不十分であった。そこで、わが国発の皮膚モデルが既に OECD 等で承認されたものと同様の能力を有するのかが判定することを主目的とし、わが国で開発された VitroLife Skin™ と国際的に承認されている EpiDerm™ 法との比較バリデーションを行うこととし、三次元培養皮膚モデル VitroLife-Skin™ に関する日本のバリデーションを平成 16 年度に実施した。その結果、VitroLife-Skin™ は腐食性試験代替法として EpiDerm™ と同等の識別能力を有するものと考えられた。平成 17 年度は、このバリデーション結果を組み込んだ評価文書を作成した。今年度は、この結果について、第三者による評

価を実施している。

B. 研究方法

以下のメンバーを 2007-2008 年評価会議委員として要請し、平成 17 年度の報告書内容を資料として用いて第三者評価を依頼した。これらの委員はいずれも今回の評価対象試験である皮膚腐食性試験代替法のバリデーションや評価委員会には関与していないものから選考した。

(委員長)

井上 達 (国立医薬品食品衛生研究所)

(委員)

田中憲法 (日本動物実験代替法学会)

林 真 (国立医薬品食品衛生研究所)

吉田武美 (日本トキシコロジー学会)

吉村 功 (東京理科大学)

溝口昌子 (聖マリアンナ医科大学)

佐神文郎 (日本製薬工業協会)

岡本裕子 (日本化粧品工業連合会)

小野寺博志 (医薬品医療機器総合機構)

五十嵐良明 (国立医薬品食品衛生研究所)

4) 感作性試験代替法の開発

研究要旨

日本において開発された試験法である、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) の施設間再現性の確認および試験法に関する基礎的データの取得を行った。

まず本試験法の施設間再現性を検証するために、国内 7 施設によるプレバリデーションを実施した。その結果、本試験法は基本的に施設間再現性が良好であると考えられた。次に、本試験法の汎用性を向上させることを目的として、細胞と血清のロット差および前培養条件の検討を行った。その結果、試験に供する細胞および血清の選択基準と前培養時の注意事項を定めた。

研究協力者

日本化粧品工業連合会: 足利太可雄、坂口斉、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、菌さき子

A. 研究目的

皮膚に直接塗布する製品である化粧品開発において、感作性の評価は最も重要な安全性評価項目の 1 つである。感作は免疫反応に基づく全身系の反応であり、極めて複雑な免疫反応を *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。一方で、動物愛護の観点等から主に欧州等において化粧品開発に関わる動物実験は法的に実行が制約される方向にある。そのため、これまで感作性に関する代替法の開発が多方面から行われてきた。例えば 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* 試験法として開発されている。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検討されている。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樹状細胞を使用する試験法が報告されているが、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。

足利や坂口らは、そうした血液由来細胞の代わりに THP-1 細胞などヒト由来の樹立細胞株が感作性物質処理により表面抗原である CD86 や CD54 を亢進させることを見出し、さらに試験条件を最適化して本試験法を開発し、ヒト細胞株活性化試験 (human Cell Line

Activation Test: h-CLAT) と名づけた¹⁻³⁾。

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施設間再現性や頑健性に関する有用な知見が得られ、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 細胞を細胞バンクより複数ロット購入して使用した。また、血清についても複数ロットを購入し検討に用いた。CD86 および CD54 の発現は、THP-1 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。施設間再現性の検討では、全施設同一ロットの細胞株、血清、抗体を使用した。さらに、各施設で細胞毒性試験を行い、その結果から被験物質適用濃度を施設ごとに設定した。具体的には、細胞毒性試験を行い、生存率が 75% に相当する濃度 (CV75 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 1/1.2⁶x。CV75 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 と CD54 の発現量の平均値がそれぞれ 1 濃度でも 150、200% (カットオフ値) を両方またはどちらかが超えた場合を陽性とした。ただし、1 回の試験でも生存率が 50% 未満であった場合は、その濃度における結果は陽性/陰性の判断に用いなかった。

まず本試験法の施設間再現性を検証するために、国内7施設によるプレバリデーションを実施した。また試験法に関する基礎的データの取得を目的とした、細胞のロット差、血清のロット差および前培養条件について検討した。

B-1) 試験法の施設間再現性の検討

h-CLAT の施設間再現性を検証する目的で、7施設による5品の評価を行った。予備試験として施設ごとに細胞毒性試験を行い、その結果を基にそれぞれの施設において適用濃度を設定した。以下に被験物質を示す。また、陽性対照として Dinitrochlorobenzene (DNCB) を毎試験評価したが、その濃度は 5 μ g/mL および CV75 とした。

- ・ 感作性物質 4 品 () 内は略号および LLNA 法による強度分類

p-Benzoquinone (pBQ、extreme)、Glutaraldehyde (GA、strong)、Ethylene diamine (ED、moderate)、Eugenol (EU、Weak)

- ・ 非感作性物質 1 品

Lactic acid (LA、non-sensitizer)

B-2) 細胞ロット差の検討

本試験法の最大の特長は、性質の不安定な血液由来の樹状細胞ではなく樹立された細胞株を使用することで試験結果の安定性の向上が期待できる点である。しかしながら、細胞株といえども培養条件によっては亜種株への変化や他の細胞株の混入などにより、性質が本来の樹立株から変化する可能性は避けられない。本共同研究では、施設間再現性の結果に影響を与える要因を最小にする目的で、全ての施設で同一製品・同一ロットの細胞を用いてきた。THP-1 細胞は日本において樹立され、世界中で広く細胞生物学における研究に供されてきた細胞株であるが、本試験法に使用するには購入先やロットによる性質の違いを予め検証し、試験に適した細胞を選択する必要がある。そこで本試験法の汎用性を高めるために、本試験法に適した細胞の選択基準の検討を行った。検討した THP-1 細胞に関する概要は以下の通りである。

・ 日本 (理研セルバンク)、欧州 (???) および米国 (ATCC) を拠点とする 3 つ細胞バンクより THP-1 細胞を購入した。米国の細胞バンクからは、従来研究に用いてきたロットに加えて、新たなロットを購入し、計 2 ロットを検討に用いた。

B-3) 血清ロット差の検討

細胞培養において、血清の品質の違いが増殖性や分化状態に影響を与えうることが知られている。したがって一般に、新しいロットを培養に用いる際はその品質をチェックすることが行われている。本共同研究では、施設間再現性の結果に影響を与える要因を最小にする目的で、全ての施設で同一製品・同一ロットの血清を用いてきた。しかし今後本試験法の汎用性を高めるためには、本試験に適する血清の選択基準を策定することが望ましいと考えられる。

検討した血清に関する概要は以下の通りである。

- ・ 従来研究に用いてきた血清ロットに加えて、3 つのメーカーより血清を購入し、計 4 つの血清ロットを検討に用いた。

B-4) 前培養条件の検討

h-CLAT では、被験物質を THP-1 細胞に適用する前に前培養を行っている。これは、適用前の培養状態により細胞の反応性に違いが生じる可能性があるため³⁾、細胞の状態をある程度一定に保つ目的で行っている。一方で前培養終了時の THP-1 細胞の状態についての詳細なデータがなかったことから、前培養条件による終了時の細胞濃度や CD86/CD54 の発現、さらに被験物質に対する反応性を検討した。

具体的には、前培養条件を播種細胞数 3 条件 (0.1、0.2、0.3x10⁶ cells/mL)、前培養時間 3 条件 (24、48、72 時間) を組み合わせた 9 条件の前培養を実施した。それぞれについて前培養終了時の細胞の状態および反応性の比較を行った。なお、現在のプロトコールにおける前培養の条件は以下の通りである。

- ・ 細胞は約 0.1~0.2x10⁶ cells/mL で播種し、48 時間あるいは 72 時間、前培養する。

(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. 研究結果および考察

C-1) 試験法の施設間再現性の検討

7 施設において被験物質 5 品および陽性対照 (DNCB) の細胞毒性試験を行った。予備試験より算出された CV75 値を表 1 に示す。施設により若干の違いが認められ、こうした違いは培養条件などのわずかな違いにより生じたと

考えられた。ただし CV75 の施設間の違いを変動係数(CV)で評価すると 0.07-0.40 の範囲であり、一般的な細胞毒性試験の変動範囲内にあると考えられた。以上より細胞毒性試験に関する施設間再現性は良好と判断された。h-CLAT においては、設定濃度の範囲が、最高適用濃度/最小適用濃度=3.6 という狭いものであるため、濃度設定に資する細胞毒性試験の精度が重要になると考えられた。

本試験の結果を表 2 にまとめた。被験物質 5 品のうち、pBQ、GA、LA の 3 品は全ての施設で感作性の陽性/陰性が正しく評価された。偽陰性は施設 C、D の Ethylene diamine と施設 B の Eugenol の 3 例のみであった。偽陰性の原因について以下に考察した。Eugenol については CD86 および CD54 の発現亢進が比較的弱く、水に対する溶解性が良くないことがばらつきの原因の 1 つと考えられた。したがって今後 h-CLAT の適用限界を明確にすることが重要な課題と考えられた。また施設 C の Ethylene diamine の場合、現在の予測モデルでは平均値で陰性と判断されるが、3 回の試験実施のうち 2 回は陽性となっていたことから、陰性と判断するのが適切かどうか今後の検討が必要と考えられた。また、偽陽性は 1 例もなかった。以上の結果より、h-CLAT の施設間再現性は 35 試験で偽陰性が 3 例という良好なものであることが示された。

C-2) 細胞ロット差の検討

細胞の増殖性に関して倍加時間の比較を行ったところ、培養 3 週目から 10 週目まで 4 ロットとも大きな違いは認められなかった(データ省略)。しかし日本の細胞バンクより購入したロットについては培養 3 週目において生存率が他のロット(95%以上)に比べて低く 90%未満であった(表 3)。さらに、感作性物質である DNCB と Ni、非感作性物質である SLS に対する反応性を検討した結果、2 施設ともに、日本の細胞バンクより購入したロットについては Ni による CD86 および CD54 の発現亢進が認められなかった(図 1)。本ロットにおける Ni による濃度依存的な細胞生存率の低下は他の細胞ロットと同様に見られたことから、こうした非反応性は Ni による CD86 および CD54 発現亢進に関わる細胞内シグナル伝達系に何らかの異常があることを示唆する結果であると考えられた。なお、Ni に対する反応性が認められなかった本ロットは DNCB による CD86 および CD54 の発現亢進が認められたことから、DNCB と Ni では CD86 および CD54

の発現亢進に関わるシグナル伝達系がそれぞれ独立に制御されている可能性が示唆された。

以上の結果より、h-CLAT に適した細胞ロットの選択基準を以下のように定めた。

- ・ DNCB および Ni の CV75 で CD86、CD54 ともに陽性となり、SLS の CV75 では CD86、CD54 ともに陰性となる。
- ・ 被験物質無処理時の細胞生存率が 90%以上である。

C-3) 血清ロット差の検討

細胞の検討と同様に、増殖性に関して倍加時間の比較を行ったところ、培養 3 週目から 12 週目まで 4 ロットとも大きな違いは認められなかった(図 2)。次に感作性物質である DNCB と Ni、非感作性物質である SLS に対する反応性を検討した。表 4 に示すように、検討した 4 種類の血清ロットは、いずれの施設においても感作性物質と非感作性物質をおおむね正確に評価可能であった。今回検討した血清では増殖性および反応性において殆ど差が認められなかった。

以上の結果より血清の違いによる試験への影響は少ないとも考えられたが、一般的な細胞を用いる試験の場合と同様に、新しい血清ロットを使用する際は、本試験法に適した血清であるかどうかを確認する必要があると考えられた。そこで h-CLAT に適する血清ロットの採用基準を細胞ロットの場合と同等とすることとした。

C-4) 前培養条件の検討

前培養条件の違いによる感作性物質である DNCB を陽性と正しく評価した割合についてまとめた。本結果は、検討を行った 3 施設の合計一致率である。代表的感作性物質である DNCB の場合、前培養の条件による評価に大きな違いは認められなかった。したがって前培養終了時の細胞濃度などを加味した上で、前培養時の条件を緩和できる可能性も示唆されたが、被験物質によっては前培養条件により評価に違いが出る可能性があるため、決定にはさらなる検討が必要と考えられた。また、前培養終了時の細胞濃度と反応性の関係性を図 3 に示した。DNCB に対する CD86 および CD54 の発現亢進は、前培養終了時の細胞濃度がある程度高い場合良好でないことが明らかとなった。この反応性の低下は、前培養時の細胞濃度が高すぎる場合、被験物質無処理細胞の CD86 および CD54 の発現量が増加したこと(データ省略)によると考えられた。このことから、THP-1 細胞は培養時のオーバークロース

によるストレスにより非特異的に CD86 および CD54 の発現量が増加し、そのことが原因で感作性物質に対する反応性が低下した可能性が考えられた。

以上の結果より、本試験法における反応性の低下を避けるために、前培養終了時の細胞濃度は 1×10^6 cells/mL 以上にならないようにするという条件をプロトコールに明記することとした。

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および試験法に関する基礎的データの取得を行った。その結果、本試験法は基本的に施設間再現性が良好であると考えられた。さらに本試験法の汎用性を向上させるために細胞と血清のロット差の確認および前培養条件の検討を行い、試験に供する細胞および血清の選択基準と前培養時の注意事項を定めた。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指し、さらに適用限界などを明らかとする研究も遂行して行きたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 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", *Toxicology. 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" *Toxicology In Vitro*, 17, 221-228, 2003.
- 3) 足利太可雄、坂口奇、"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.

G. 研究発表

- 1) 大野泰雄：日本薬理学会の奨める動物実験-苦痛の評価と軽減-「はじめに」および日本薬理学会の新動物実験指針：日本薬理学雑誌 129, 5-9, 2007.
- 2) ohtakeE, Kakihara F, Matsumoto N, Ozawa S, Ohno Y, Hasegawa S, Suzuki H, Kubota T. (2006) Frequency distribution of phenol sulfotransferase 1A1 activity in platelet cells from healthy Japanese subjects. *Eur. J. Pharm. Sci* in press

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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 眞輝 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
修正案作成者及びその日：石川牧恵 平成 18 年 6 月 1 日
修正案作成者及びその日：石川牧恵 平成 18 年 12 月 5 日
承認者と承認日：吉村功 平成 18 年 12 月 6 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、スピッツ型ねじロガラス遠心管等。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、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%ポテトデキストロ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。但し樹トプコン製の紫外線強度計を用いる場合は、4.16.1項に従い紫外線強度を補正し、光源と紫外線強度計の距離を調節する。

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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 10mL 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 50mg ずつ入れる.
- 3) 溶媒を 100 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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, ⑪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. なお, 陽性対照物質としてキサントトキシン 1 mg/mL エタノール溶液を調製する.

希釈列	原体が固体の場合	原体が液体の場合
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

4. 13. 2. 本試験

1) 原体が固体の場合

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ン 1 mg/mL エタノール溶液を調製する.

2) 原体が液体の場合

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ン 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ン各 20 μ 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. 前培養及び被験物質総暴露時間（8 項参照；試験記録⑦, ⑫使用）

被験物質適用後、25°C に設定した孵卵器内で前培養を行う。

更に前培養時間と 4. 16. 2. 項で求めた照射時間を合わせた時間を被験物質総暴露時間とし、これを 5 時間とする。

よって前培養時間は総暴露時間から照射時間を差し引いた値、すなわち、「前培養時間」＝「総暴露時間（=5 時間）」－「照射時間」とする。

4. 16. 紫外線強度の算出と光照射（8 項参照；試験記録④, ⑤, ⑥, ⑦使用）

4. 16. 1. 補正式による㈱トプコン製紫外線強度計での紫外線強度の算出

UVA 25.0 J/cm²照射は、Dr. Hönle GmbH社製の紫外線強度計での照射量とする。但し、今回のバリデーション研究において、㈱トプコン製の紫外線強度を用いる場合は、以下の補正式より、Dr. Hönle GmbH社製の紫外線強度を算出する。

Dr. Hönle GmbH社製の紫外線強度での値をY、㈱トプコン製の紫外線強度計で測定した値をXとしたとき

酵母光生育阻害試験では、 $Y=0.5645X$

Y の値が 1.7 以上 2.5 以下となるように光源と紫外線強度計の距離を調節する。

更に紫外線強度については、各施設において陽性対照であるキサントトキシン 1 mg/mL を用いて UVA25.0 J/cm²照射下で予備試験を行い、下記の条件を満たしたものを採用する。

- 1) 1.7 以上 2.5 mW/cm² 以下の範囲であること
- 2) 陽性対照であるキサントトキシン 1 mg/mL の阻止帯の差が 10 mm 以上を示すこと
- 3) 酵母に毒性が出ていないこと

4. 16. 2. 光照射

4. 14. 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 25.0 J/cm²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。

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 カ所の紫外線強度計での値の平均値（A）を求める。測定した平均値（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/cm²)

照射時間(S) = $[(25.0 \times 1,000 \text{ mJ/cm}^2) / (A \text{ mW/cm}^2)]$

(提案施設での通常値: 約 10,000 ~ 14,700 秒)

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。

4.17. 培養 (8 項参照; 試験記録⑫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°C, 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。

4.18. 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。円形状の阻止帯の外径を水平方向と垂直方向で測定し, 記録する。その平均値を阻止帯の大きさとして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の大きさ - 非照射プレートの阻止帯の大きさ

上記の値が, 2 組の照射・非照射プレート対ごとに得られるので, その平均値で光毒性の有無を評価する。

阻止帯の測定では以下のことに留意する。

- ① 黒い机など背景の濃く, 阻止帯が見やすいところで測定する。
- ② 阻止帯の外径を測るときは, 表面に着目することとして, プレート裏面まで突き抜けるような十分に深いものでなくてもよいし, 輪郭が不明瞭なものでもよいとする。輪郭が不明瞭な場合は最も外側を測定することとする。
- ③ 必要と考えた場合は, 阻止帯の見やすさ・輪郭の不明瞭さなどを記録に残したり, デジタルカメラ等を活用して映像として残したりしておく。
- ④ 阻止帯が見にくい場合は, 眼を細めてプレートを覗き込む。

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。

阻止帯の差 (Z : mm)	光毒性の評価
$Z < 2$	-
$2 \leq Z < 5$	±
$5 \leq Z$	+

なお, この評価はバリデーション委員会が一括して行うため, 各施設で行う必要はない。

6. 被験物質の保管場所 (8 項参照; 試験記録①使用)

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。

7. 保守・点検

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

以下の試験記録の原本は、記録保管場所に5年間保管する。

- ①試薬・被験物質管理記録
- ②注射用水・生理食塩液管理記録
- ③被験物質溶解性検討記録
- ④太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑤紫外線強度計使用記録
- ⑥使用機器記録
- ⑦酵母光生育阻害試験条件等記録
- ⑧酵母光生育阻害試験プレート培地・上層培地調製記録
- ⑨酵母光生育阻害試験酵母菌液調製記録
- ⑩酵母光生育阻害試験酵母播種記録
- ⑪酵母光生育阻害試験陽性対照溶液調製記録
- ⑫酵母光生育阻害試験孵卵器使用記録
- ⑬酵母光生育阻害試験測定記録

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.* (2004) Effects of Light Sources on the Prediction of Phototoxicity by the Yeast Growth Inhibition Phototoxicity Assay and the Red Blood Cell Photohemolysis Assay. AATEX, 10, 1-17

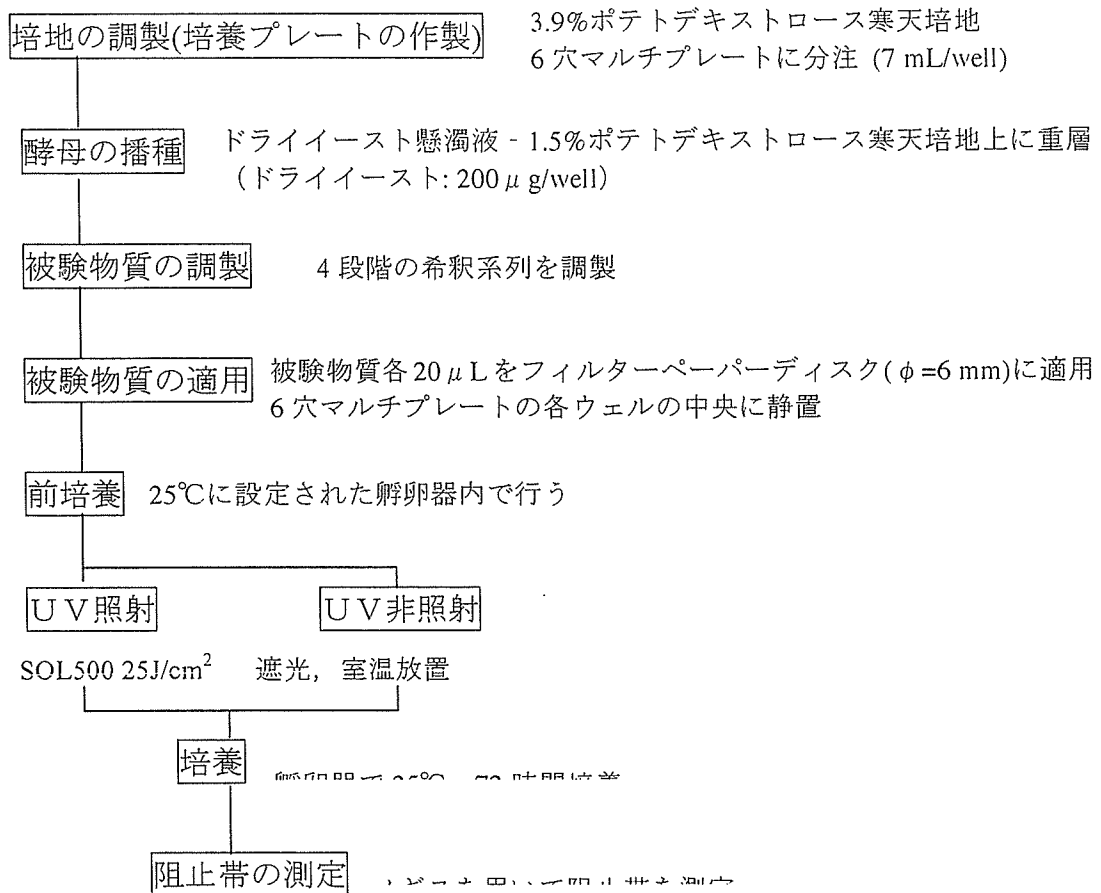
10. 試験法の改定

試験法改定の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。

11. 履歴

- 1) 平成 15 年 11 月 21 日 制定
- 2) 平成 15 年 11 月 23 日 修正
- 3) 平成 18 年 6 月 1 日 修正 修正理由：光毒性評価委員会からの依頼に基づく修正
- 4) 平成 18 年 12 月 5 日 修正 修正内容：4.18 の測定法. 修正理由：測定者の改訂希望を
検討した結果としての修正

5) 酵母光生育阻害試験フローチャート



光毒性試験代替法バリデーション研究 補完実験報告書

2007年2月24日

酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会
委員長 吉村 功

1. はじめに

日本動物実験代替法学会（以下「本学会」）バリデーション委員会（以下「バリデーション委員会」）は、本学会会長より、2006年6月16日に「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（以下「酵母-赤血球試験」）のための酵母光生育阻害試験（以下「酵母試験」）について、改訂 SOP の妥当性検証のためのバリデーション研究を行うことを依頼された（付録1参照）。

これは2004年に報告された酵母-赤血球試験のバリデーション研究（以下「前研究」）の結果に対して、本学会評価委員会（以下「評価委員会」）が SOP に不備があることを指摘してその改訂を求め、結果として2006年6月にその改訂が行われたためである。

バリデーション委員会は、依頼に応じるため、「酵母光生育阻害試験補完実験実行委員会」（以下、「実行委」）を組織し、研究（以下「本研究」）を委託した。実行委員は、板垣宏、石川牧恵、石川公平、大森崇、岡本裕子、小島肇、田中憲徳、土肥孝彰、長谷川靖、穂谷昌利、吉村功（委員長）の11人である。

実行委は、「光毒性試験代替法補完実験計画書」（以下「計画書」）に基づいて2006年7月4日の打合会を出発点とし、石川牧恵、今井教安、米澤理一郎、松永康明、若栗忍の6人を実験担当者として、組織的な研究を開始した（付録2参照）。

実行委は、計画書にそって、強度計の校正、被験物質の選択、試料・機材の配布を行い、実験担当者は改訂 SOP に従って、予備実験と本実験を9月末までに行った。データ解析担当者は、実験担当者から送られたデータを吟味・確認した上で解析を行い、データ解析報告書 ver1.0 を作成した。実行委は、2006年10月30日に中間報告会を開催して内容を検討し、データ解析報告書と SOP の改訂について意見をまとめた。

本報告書は、中間報告会後に補足されたことを含めて、研究全体の内容をまとめたものである。

2. 研究課題

本研究の目的は、今回の SOP 改訂が、酵母-赤血球試験における施設間変動を縮小するという側面、in vivo の結果の予測という側面でも有用であるかどうかを、実験を通して吟味することである。

3. 研究の遂行

研究は概ね計画書にそって遂行された。

3-1) 実験の方針

酵母-赤血球試験は2つの試験を併せて光毒性を評価する試験であるから、本来なら補完実験も前研究と同様な規模で行うべきであった。しかしながら(1) 今回の改訂は酵母試験に限定されていた、(2) 前回の規模で実験を行うことは実験施設の負担が大きすぎて実行不可能であった、という2つの理由から、実行委は、本研究での実験を酵母試験のみで行うことにした。そのため、実験参加施設、被験物質共に前研究の赤血球光溶血試験（以下「赤血球試験」）のデータが存在するものに限定せざるを得なかった。すなわち、赤血球試験に関しては前研究のデータを用いることとなった。

3-2) 実験施設

実験を行った施設は、前研究に参加した 6 施設のうち、前実験の施設代表委員が当該施設を退職した 1 施設を除く、以下の 5 施設である。（括弧内は実験担当者）

(株)コーセー研究本部品質保証センター (今井教安)
 (株)資生堂品質保証センター (石川牧恵)
 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 (若栗忍)
 日本メナード化粧品 (株) 総合研究所 (松永康明)
 マルホ (株) 京都 R&D センター (米澤理一郎)

3-3) 被験物質とその割り当て

実験の方針上の制約から、被験物質とその割り当ては前研究と同じものとした。その内容は表 1 の通りである。試料送付におけるコードは、予測可能性を小さくするように前研究と異なるものとした。

表 1 各施設で実験を行った物質 (○印)
 表中の P は陽性、N は陰性

被験物質名	コード	in vivo 判定	施設コード				
			a	C	d	e	f
アントラセン	A	P	○	○	○	×	×
アミオダロン	B	P	○	○	○	×	×
クロルヘキシジン	C	N	○	○	○	×	×
クロルプロマジン	D	P	○	×	×	○	○
ピチオノール	E	N	○	×	×	○	○
S L S	F	N	○	×	×	○	○
アクリジン	G	P	×	○	○	○	○
6-メチルクマリン	H	N	×	○	○	○	○
Parsol 1789	I	N	×	○	○	○	○

3-4) 光源と強度計の校正

太陽光のシミュレーション光源はすべての施設で Dr. Hönle 社の SOL500 にした。光の強度計の校正を 2006 年 7 月 10 日に行ったところ、標準としている強度計と大きく異なった値を示すものが 2 台あったので、この 2 台の施設には、標準としている強度計を送って自施設の実験の際に再度校正を行って換算係数を定め、実験を行うこととした。その換算係数はデータとして報告されている。

3-5) 吸光度の測定波長と実験条件の記録

前研究と全く同じとした。（資料(9)参照）

3-6) 結果の判定

酵母-赤血球試験の結果の判定規則は前研究と同じとした。すなわち、2 試験のいずれかで陽性と判定された被験物質を「陽性」、擬陽性と陰性の組み合わせになった被験物質を「擬陽性」、両試験とも陰性と判定された被験物質を「陰性」とした。各試験の判定基準値と判定規則を表 2 に示す。

表 2 個々の試験と総合判定の規則