

#### 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。

#### 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ロガラス遠心管を用意する（計 4 本）。
- 2) スピッツ型ねじロ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 $\mu$ 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①，②，③，⑥，⑦，⑪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。

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

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シン 0.1 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 枚ずつ接地に密着させる (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℃、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。

$$\text{阻止帯の差 (Z ; mm)} = \text{照射プレートの阻止帯} - \text{非照射プレートの阻止帯}$$

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こ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。

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.* (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.

#### 10. 試験法の改定

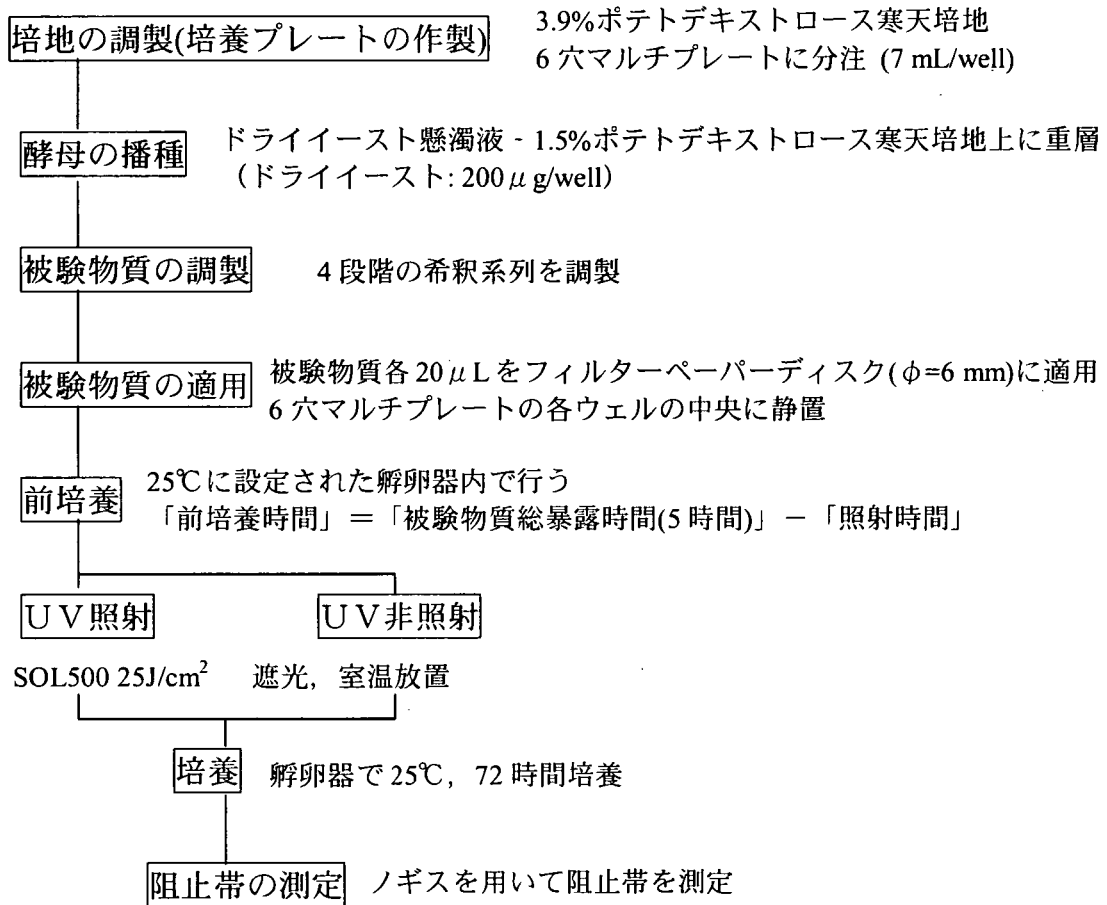
試験法改定の必要が生じた場合は、バリデーション委員会で検討し、その結果を提案者に示し、承認を受ける。

#### 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



#### 4) 酵母光生育阻害試験フローチャート



## 赤血球光溶血試験プロトコール

原案作成者及びその日：穂谷 昌利 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、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、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. 材料及び実験方法

#### 4. 1. 試験項目及びプレート枚数

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 回の実験で最大 3 被験物質を適用できるが、24 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、3 被験物質あたり少なくとも 24 穴マルチウェルプレート 12 枚を必要とする。また、照射・非照射プレート 1 対につき 1 枚の 96 穴マイクロテストプレートを用いるため、

3 被験物質あたり少なくとも 96 穴マイクロテストプレート 6 枚を必要とする。

#### 4. 2. 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. 3. 陽性対照物質

アクリジン（東京化成工業株式会社）を用いる。

#### 4. 4. 赤血球

綿羊無菌保存血を(株)日本生物材料センターより購入する。

株式会社 日本生物材料センター（TEL:03-3811-1960）

採血日から 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. 5. 器具類

##### 4. 5. 1. 24 穴マルチウェルプレート

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. 5. 2. 96 穴マイクロテストプレート

FALCON 社製 No. 3070 を用いる。

##### 4. 5. 3. 漏斗

##### 4. 5. 4. 脱脂綿

##### 4. 5. 5. 分注器

##### 4. 5. 6. ガラス器具

溶液調製用にピペット、ビーカー、メスシリンダー、スピッツ型ねじ口ガラス遠心管等。  
溶血を避けるため、赤血球の取り扱いには使用しない。

#### 4. 5. 7. プラスティック製器具

赤血球懸濁液調製用にピペット、遠沈管、メスシリンダー等。

#### 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) 領域及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 H 1 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。

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. 小型遠心機

50mL 以上の遠沈管を適用できることが必要である。また、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が必要である。赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用できることが望ましい。

##### 4. 6. 4. 高速遠心機

マイクロタイターバケットを適用可能である日立高速遠心機 CR20B2 等を用いる。赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用できることが望ましい。

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. 6. 5. マイクロプレートリーダー

540nm 及び 525nm の吸光度を測定できるマイクロプレートリーダーを使用する (525nm 用のフィルターが無い場合はそれに近いものを使用する)。

#### 4. 6. 6. プレートミキサー

MICRO TUBE MIXER EM-36 (タイテック株式会社) を使用する。ただし、適切に混和可能であればその他のプレートミキサーでも使用可能である。

#### 4. 7. 塩溶液の調製

- ・生理食塩水: 0.9% (w/v) 塩化ナトリウム水溶液.
- ・PBS (-): ダルベッコ PBS (-) (日水製薬株式会社) 9.6g を蒸留水 1L に溶解させる。滅菌操作は必要としない。

#### 4. 8. 溶媒の選択と予備試験における最高溶解濃度の決定 (8 項参照; 試験記録①, ②, ③, ⑥使用)

##### 4. 8. 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。最高溶解濃度及び溶媒の選択は、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 50  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 1g/mL を最高溶解濃度とする。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、さらに溶媒を 50  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 500mg/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、さらに溶媒を 100  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 250mg/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、さらに溶媒を 300  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 100mg/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、さらに溶媒を 500  $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な

溶解が認められたならば 50mg/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、さらに溶媒を 1000 $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 25mg/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、さらに溶媒を 3000 $\mu$ L 添加し攪拌する。完全な溶解が認められたならば 10mg/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。

被験物質を溶解した媒体 10 $\mu$ L を赤血球 990 $\mu$ L に添加するため、最終濃度は投与した濃度の 1/100 となる。

#### 4. 8. 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 $\mu$ L 添加し攪拌する。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、さらに溶媒を 100 $\mu$ L 添加し攪拌する(250mg/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(100mg/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(50mg/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(25mg/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(10mg/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。

被験物質を溶解した媒体 10 $\mu$ L を赤血球 990 $\mu$ L に添加するため、最終濃度は投与した濃度の 1/100 となる。

#### 4. 9. 被験物質溶液の調製 (8 項参照 ; 試験記録①, ②, ③, ⑥, ⑭使用)

#### 4. 9. 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

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。

#### 4. 9. 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、予備試験において溶血度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、予試験において、溶血度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、その最高濃度を含む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。

##### 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、予備試験において溶血度の差が原体より低濃度において最大となった場合には、予試験において、溶血度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、その最高濃度を含む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。

#### 4. 10. 赤血球懸濁液の調製（8項参照；試験記録①，②，⑥，⑭，⑯使用）

綿羊無菌保存血を脱脂綿で濾過し、3倍量の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、もとの綿羊無菌保存血の4倍量のPBS(-)を加えてピペティングを行い、遠心分離を行う(3000rpm, 5min)。このPBS(-)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、PBS(-)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。これらの遠心操作は赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用することが望ましい。

#### 4. 1.1. 完全溶血(100% control)の調製

2.5%(v/v)赤血球懸濁液1mLを1.5mLチューブに分注し、液体窒素中にて1分間凍結させた後、水浴させて溶解させる。4枚のプレートを使用する場合、1mLの完全溶血を9本程度作製しておく。

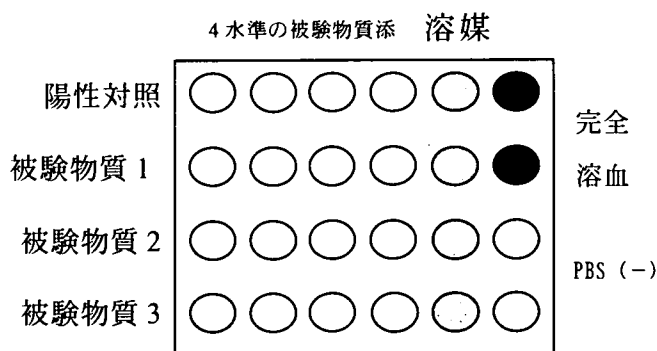
#### 4. 1.2. 被験物質の添加

24穴マルチウェル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 $\mu$ Lを分注器を用いて分注し、被験物質溶液、溶媒またはPBS(-)10 $\mu$ Lを各ウェルに加える。

完全溶血用ウェルには完全溶血を各990 $\mu$ Lずつ分注した後、PBS(-)10 $\mu$ Lを加える。

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枚のプレートを必要とする。

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)、次項に従い、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。





#### 4. 1 3. 光照射（8項参照；試験記録④, ⑤, ⑥, ⑭使用）

光源のスイッチを入れ、約10分放置後、紫外線強度計（UVA-Meter, Dr. Hönle GmbH 社製）を用いて24穴マルチウェル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  $6.2 \text{ J/cm}^2$  を照射する。一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 ( $\text{mW/cm}^2$ )

照射時間 (s) =  $(6.2 \times 1,000 \text{ mJ/cm}^2) / (A \text{ mW/cm}^2)$

(提案施設での通常値：約 6,200 秒)

なお、プレートを置く位置は紫外線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. 1 4. 溶血度の測定（8項参照；試験記録⑥使用）

照射終了後、照射用、非照射用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、未溶血の赤血球を沈殿させる。このとき、赤血球の浮き上がりを防ぐためにブレーキオフ機能を使用することが望ましい。24穴マルチウェルプレートの各ウェルから静かに上清を採取し、96穴マイクロテストプレートの2ウェルに  $100 \mu\text{L}$  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。

#### 4. 15. マイクロプレートリーダーによる測定（8項参照；試験記録⑥，⑭，⑮使用）

マイクロプレートリーダーを用いて、540nm 及び 525nm の波長で 96 穴マイクロテストプレートの各ウェルの吸光度を測定する。

#### 4. 16. 光溶血度の算出

光溶血度は 540nm における吸光度 (OD) を用い、以下の式にしたがい算出する。

溶血度の差 (L;%)

$$\begin{aligned} &= \text{照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血}} - \text{OD}_{\text{PBS (-) 対照}})] \\ &\quad - \text{非照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血}} - \text{OD}_{\text{PBS (-) 対照}})] \end{aligned}$$

なお、525nm における吸光度はタンパク変性の指標とする。また、OD 値は 96 穴マイクロテストプレートにおける duplicate で測定した結果の平均値を用いる。

#### 5. 評価

以下の基準に従い溶血度の差の平均から光毒性の有無を評価する。

溶血度の差 (L;%)	光毒性の評価
$L < 5$	-
$5 \leq L < 10$	±
$10 \leq L$	+

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
- ⑭赤血球光溶血試験条件等記録
- ⑮赤血球光溶血試験測定記録
- ⑯血球管理記録

## 9. 参考文献

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

## 10. 試験法の改定

試験法の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