

表6 ECVAM 標準試験物質 (20 物質) における LabCyte EPI-MODEL 24 と EPISKIN、EpiDerm および SkinEthics の刺激物分類の結果比較

No.	Chemical	CAS number	GHS label	In vivo score (PII)	LabCyte							EPISKIN			Modified EpiDerm			SkinEthics		
					1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	1	2	3	4	1	2
01	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	no	0	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
02	diethyl phthalate	84-66-2	no	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
03	naphthalen acetic acid	86-87-3	no	0	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
04	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	no	0.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
05	isopropanol	67-63-0	no	0.3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
06	4-methyl-thio-benzaldehyde	3446-89-7	no	1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
07	methyl stearate	112-61-8	no	1	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
08	heptyl butyrate	5870-93-9	no	1.7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
09	cinnamaldehyde	104-55-2	no	2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
10	hexyl salicylate	6259-76-3	no	2	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
11	cyclamen aldehyde	103-95-7	Category 2	2.3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
12	1-decanol	112-30-1	Category 2	2.3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
13	1-bromohexane	111-25-1	Category 2	2.7	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
14	2-chloromethyl-3,5-dimethyl-4-methoxypyridine HCl	86604-75-3	Category 2	2.7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	P	
15	di-n-propyl disulphide	629-19-6	Category 2	3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
16	potassium hydroxide (5%aq)	168-21815	Category 2	3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	P	
17	benzenethiol, 5-(1,1-dimethylethyl)-2-methyl	7340-90-1	Category 2	3.3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	
18	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine	5271-27-2	Category 2	3.3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	n.d.	
19	heptanal	111-71-7	Category 2	3.4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
20	tetrachloroethylene	127-18-4	Category 2	4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

n.d.: no data

<IC50%

表7 OECD 標準試験物質における LabCyte EPI-MODEL 24、EPI-SKIN、EpiDerm および SkinEthics の予測性能の比較

	N	Mean	N	Mean	Portion	J-TEC LabCyte EPI-MODEL 24	Acceptance criteria	EPI-SKIN	EPI-SKIN	EpiDerm	SkinEthics
Sensitivity(%)	6	77.8	7	72.4	78.0 (49/69)	80 (8/10)	80	90.0(27/30)	91.4	91.4 (32/35)	100(30/30)
Specificity(%)	6	71.6	7	72.5	71.0 (46/59)	70 (7/10)	70	73.3(22/30)	70	69.2 (27/39)	70(21/30)
Accuracy(%)	6	74.6	7	73.1	74.2(95/128)	75 (15/20)	75	81.6(49/60)	74.6	79.7(59/74)	85 (51/60)
Chemical No.	19		19 or 14		19 (7 lab)	20	20	20	58	20	20

## Abstract

An in vitro skin irritation test was conducted using a reconstructed human epidermis model, LabCyte EPI-MODEL24, presented by Japan Tissue Engineering. This epidermal model was reconstructed by human keratinocytes from feeder cells, 3T3-J2, and the model consists of stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum, and stratum basale, as similar to human epidermis.

In vitro skin irritation test using such a human epidermis model has been already validated at the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM), and the non-commission members of the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) regarded the test method using reconstructed human epidermis model as a reliable and applicable stand-alone test for predicting rabbit skin irritation in 2007<sup>1)</sup>. In the same year, “Performance standards on the in vitro skin irritation test using reconstructed human skin models”<sup>2)</sup> was established based on this ECVAM validation studies. Then, the Modified EpiDerm test method and the SkinEthic test method were approved in 2008<sup>3)</sup>.

ESAC judged the test method using reconstructed human skin models to be a reliable, adequate and stand-alone method, which can be used as an alternative to predict rabbit skin irritation for Draize skin irritation test (OECD TG 404 & Method B.4 of Annex V to Directive 67/548/EEC). The EU has adopted UN GHS labeling<sup>4)</sup> system for the dangerous substances directive since 2009 (UN GHS CLP in EU). Since the test methods using the skin model can distinguish between the UN GHS Category 2 (“irritant”: substances with scores greater than or equal to 2.3 to in at least 2 animals) and lower category (no-category in UN GHS in EU CLP regulation; the Regulation on the Classification, Labeling and Packaging of Substances and Mixtures), ESAC determined that the methods can be applied to GHS labeling in EU for two-level classification<sup>5)</sup>. Therefore, “Performance standards of applying human skin models to in vitro skin irritation test” established in 2007 is currently being revised including changes of reference chemicals<sup>6)</sup>.

This test method using LabCyte EPI-MODEL24 is positioned as a me-too method since it has developed as a similar test method to the in vitro skin irritation test using a reconstructed human epidermis model approved by ECVAM. Therefore, it has been validated as a catch-up validation based on “Performance standards of applying human skin models to in vitro skin irritation test” established by ECVAM. This test was conducted to evaluate the intra- and inter-laboratories reproducibility and the predictive performance in multiple facilities.

In the in vitro skin irritation test using LabCyte EPI-MODEL24, the test

substance was exposed to the surface of the skin model for 15 minutes and removed. The tissue viability was measured using MTT assay after 42 h-incubation of the model to classify the test substance by 50% of tissue viability as positive criteria of the skin irritation. Although the release determination of IL-1 $\alpha$  release was added to the skin irritation test protocol in anticipation of improving sensitivity of the test, it did not contribute to the determination of outcome. As a result, only MTT assay was adopted in the test protocol as well as in the method using previously-evaluated skin models.

The committee positioned the present test method as a similar model to the previously-approved in vitro skin irritation test using a reconstructed human epidermis model (a me-too method), and conducted a catch-up validation based on "Performance standards of applying human skin models to in vitro skin irritation test" established by ECVAM to verify and confirm the present method. The results are as follows.

- 1) The present test method was similar to the in vitro skin irritation test using a reconstructed human epidermis model which has been previously approved. The present skin model was an epidermal model reconstructed from human keratinocytes. It would be scientifically valid to use the model for in vitro skin irritation test, since function, cell toxicity mechanism and capability of the skin model were equal to the other models previously approved.
- 2) The test method replaces OECD TG404 as well as the other test methods previously approved. The aim of the application of the test method is to distinguish chemical substances between category 2 and lower category in UN GHS labeling
- 3) The test protocol properly describes the exposure methods of test substances to the skin models and the toxicological assessment, which is practically the same as conventional test methods, suggesting that the test can be performed correctly. The determination of IL-1  $\alpha$  release was eventually deleted from the protocol because the results showed only a slight improvement of the test sensitivity while MTT assay showed a preferable result.
- 4) A positive control (5% SDS solution) and a negative control (distilled water for injection) were employed in the test. Cell viability was used for a prediction model, in which test substances with the cell viability  $\leq 50\%$  are classified into category 2 as well as in the other test methods previously approved.
- 5) Acceptance criteria (OD of the negative control is greater than 0.7 and viability of the positive control is less than 40%) for validation results were clearly described.
- 6) The validation was performed according to the Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for

Hazard Assessment (No.34) of OECD<sup>7)</sup>.

- 7) Quality control of LabCyte EPI-MODEL24 was performed under a guideline of OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring No 5<sup>8)</sup> by confirming cell viability using MTT assay and barrier functions in each lot unit.
- 8) A validation management team was organized, where a biostatistics expert was included as a member.
- 9) The intra- and inter-laboratory variability was evaluated in the data analysis, suggesting that the reproducibility was sufficient
- 10) Twenty five substances were selected based on “Performance standards of applying human skin models to in vitro skin irritation test” established ECVAM. These substances were selected from three existing reliable databases providing in vivo data and including a good balance of test chemicals classified into category 2 and no category of GHS labeling. Therefore, the selection of chemical substances is valid.
- 11) The predictive performance was valid, since the test met the acceptance criteria for consistency, specificity: 70%, sensitivity: 80% and overall accuracy: 75%, which were set in “Performance standards of applying human skin models to in vitro skin irritation test” made by ECVAM.

In conclusion, the in vitro skin irritation test using a reconstructed human epidermis model, LabCyte EPI-MODEL24, shows the same function as those previously approved by ECVAM. Thus, the test method is applicable to GHS labeling for two-level classification into category 2 and lower category based on OECDTG404.

### 3) 酵母生育阻害試験と赤血球光溶血性試験を組み合わせた光毒性試験代替法の専門家による第三者評価

#### 研究要旨

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のバリデーション報告書等をもとに、専門家による第三者評価を進めた。

結果として、本試験法には光毒性物質のスクリーニング法として一定の有用性は認められるものの、十分な信頼性を持って実用化するためにはまだ検討すべき問題点が残っていると考えられた。

#### A. 研究目的

資生堂から提案された「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（酵母-赤血球試験）」においては、平成19年度に提出された補完バリデーション報告書に補足された議論も含めて、最終的なバリデーション報告書がまとまった。これを受け、試験法の公定化のために、専門家による光毒性評価委員会を設立した。

#### B. 研究方法

##### B-1) 光毒性評価委員会委員

委員長

笛木 修（医薬品医療機器総合機構）

委員

戸倉新樹（産業医科大学）

小野寺博志（医薬品医療機器総合機構）

山田 弘（医薬基盤研究所）

今井弘一（大阪歯科大学）

細井一弘（参天製薬）

##### B-2) 方法

本評価法の提案者である（株）資生堂品質評価センター（以下、資生堂）による検討では、香料、紫外線吸収剤、医薬品、抗菌剤、染料といった分類から、既に *in vivo* で光毒性が評価済みの24物質について評価が行われており、十分な感度と *in vivo* 判定との一致率が得られている。この結果の普遍性を示すために、日本動物実験代替法学会により実施された多施設バリデーション試験結果を評価した。

#### C. 結果および考察

一次バリデーション試験では9物質が用いられ、試験実施施設（6施設）に6品目ずつ名称を隠し、コード化して供与された。試験に際しては実施に先立って技術講習会が行われ、GLPの原則に則ってSOP（標準作業手順書）

に従って実施された。施設内再現性を見たところ、1施設（施設b）で、特に再現性が悪く、この理由として他施設を借用して試験を実施したため、実験環境の制御に困難性があったことが挙げられている。施設間再現性についても4物質（Acridine、4-*t*-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane: BMDM、Chlorhexidine: CHDおよびBithionol）を除き、施設間で結果が一致せず、再現性は良好とはいえない結果であった。また、CHDおよびBithionolは *in vivo* で陰性物質と判断されているものの、本試験結果では陽性との判断がなされており、逆に *in vivo* で陽性とされた物質で擬陽性あるいは陰性と判断される場合が存在した。一次バリデーション試験の結果において、施設bの結果を除外し、擬陽性判定を陽性判定と見なした場合には *in vivo* 判定との一致率は70%であった。

以上の一次バリデーション試験の結果では、陽性物質の結果が擬陽性と判定されたり、結果がばらついたことから、この点を改善するために酵母光生育阻害試験の判定基準の変更やブレイクキューベーション時間の設定等のプロトコール整備が行われ、補完試験が実施された。補完試験は一次バリデーション試験と同じ物質を用い、施設bを除いた5施設で実施された。その結果、擬陽性判定が少なくなり、施設内再現性および施設間再現性共に一次バリデーション試験に比して良好な結果が得られており、プロトコール改善の効果が認められたものと判断された。

プロトコール改善後でも、陰性物質を誤って陽性と判断する可能性はあるものの、陽性物質を誤って陰性と判断した事例はなく、安全性上の観点から *in vitro* 光毒性スクリーニングの手法として、利用可能であると考えられる。本試験法のメリットとしては、①水難溶性物質の評価が可能と考えられている。②必ずしも無菌操作が必要でなく、操作が簡便

である。③比較的低コストである一方、デメリットとして、①バッテリー試験法のため、単一試験である 3T3-NRU 法に比べ試験に時間を要する。②擬陽性と判定される物質が存在する等の問題点もある。また、以下に挙げるような問題点については現状で未解決であり、今後の課題と考えられる。①本試験法のメリットの一つと考えられている水難溶性物質の評価が十分に行われていない。②最終的に整備されたプロトコールにおける検討物質数は 9 物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。③3T3-NRU 法との直接比較がなされておらず、同等性あるいは優越性が明確に示されていない。④異なる光源を使用した際の結果の安定性について評価されていない。⑤温度上昇による結果の差異が言及されているが、この点に関する追加検討が実施されていない。⑥代謝活性化系が設定されていないため、経皮投与以外の全身曝露の際の安全性が評価できない。⑦バッテリーの 2 試験の実施順序を規定する必要

性に関する検討がなされていない。⑧酵母光生育阻害試験における陽性判定のカットオフ値について再検討の余地がある。⑨赤血球光溶血試験の吸光度測定波長の選定に再検討の余地がある。

#### D. 結論

本試験法には光毒性物質のスクリーニング法として一定の有用性は認められるものの、十分な信頼性を持って実用化するためにはまだ検討すべき問題点が残っていると考えられる。

#### E. 資料

##### 資料 3-1

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法の第三者評価報告書

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる  
光毒性試験代替法の第三者評価報告書

光毒性試験代替法の第三者評価委員会

評価委員長	笛木 修	(医薬品医療機器総合機構 新薬審査第五部)
評価委員	戸倉 新樹	(産業医科大学 皮膚科学)
評価委員	小野寺 博志	(医薬品医療機器総合機構 新薬審査第一部)
評価委員	今井 弘一	(大阪歯科大学 歯科理工学講座)
評価委員	細井 一弘	(参天製薬株式会社 研究開発センター)
評価委員	山田 弘	(医薬基盤研究所 基盤的研究部)
オブザーバー	小島 肇	(国立医薬品食品衛生研究所 薬理部)

平成 21 年 5 月 13 日



## 要旨及び結論

酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血性試験の組み合わせによる光毒性試験代替法の有用性を評価した。本評価法の提案者である(株)資生堂品質評価センター(以下、資生堂)による検討試験では、香料、紫外線吸収剤、医薬品、抗菌剤、染料といった分類から、既に *in vivo* で光毒性が評価済みの 24 物質の評価が行われており、十分な感度と *in vivo* 判定との一致率が得られている。この結果の普遍性を示すために、日本動物実験代替法学会により多施設バリデーション試験が実施された。一次バリデーション試験では 9 物質が用いられ、試験実施施設(6 施設)に 6 品目ずつ名称を隠し、コード化して供与された。試験に際しては実施に先立って技術講習会が行われ、GLP の原則に則って SOP に従って実施された。施設内再現性を見たところ、1 施設(施設 b)で、特に再現性が悪く、この理由として他施設を借用して試験を実施したため、実験環境の制御に困難性があったことが挙げられている。施設間再現性についても 4 物質(Acridine、BMDM、CHD 及び Bithionol)を除き、施設間で結果が一致せず、再現性は良好とはいえない結果であった。また、CHD 及び Bithionol は *in vivo* で陰性物質と判断されているものの、本試験結果では陽性との判断がなされており、逆に *in vivo* で陽性とされた物質で擬陽性あるいは陰性と判断される場合が存在した。一次バリデーション試験の結果において、施設 b の結果を除外し、擬陽性判定を陽性判定と見なした場合には *in vivo* 判定との一致率は 70%であった。

一次バリデーション試験の結果では、陽性物質の結果が擬陽性と判定されたり、結果がばらついたことから、この点を改善するために酵母光生育阻害試験の陽性結果の判定基準の変更やプレインキュベーション時間の設定等のプロトコル整備が行われ、補完試験が実施された。補完試験は一次バリデーション試験と同じ物質を用い、施設 b を除いた 5 施設で実施された。補完試験では擬陽性判定が少なくなり、施設内再現性及び施設間再現性共に一次バリデーション試験に比して良好な結果が得られており、プロトコル改善の効果が認められているものと判断された。

プロトコル改善後の本試験法では、陰性物質を誤って陽性と判断する可能性はあるものの、陽性物質を誤って陰性と判断した事例はなく、安全性上の観点から *in vitro* 光毒性スクリーニングの手法として、利用可能であると考えられる。本試験法のメリットとしては、①水難溶性物質の評価が可能と考えられている。②必ずしも無菌操作が必要でなく、操作が簡便である。③比較的低コストである。等がある一方、デメリットとして、①バッテリー試験法のため、単一試験である 3T3-NRU 法に比べ試験に時間を要する。②false positive と判定される物質が存在する。等の問題点も存在する。また、以下に挙げるような問題点については現状で未解決であり、今後の課題と考えられる。①本試験法のメリットの一つと考えられている水難溶性物質の評価が十分に行われていない。②最終的に整備されたプロトコルにおける検討物質数は 9 物質のみであり、本法が広範囲の被験物質に適用可能かどうか不明である。③3T3-NRU 法との直接比較がなされておらず、同等性あるいは優越性が明確に示されていない。④異なる光源を使用した際の結果の安定性について評価されてい

ない。⑤温度上昇による結果の差異が言及されているが、この点に関する追加検討が実施されていない。⑥代謝活性化系が設定されていないため、経皮投与以外の全身曝露の際の安全性が評価できない。⑦バッテリーの2試験の実施順序を規定する必要性に関する検討がなされていない。⑧酵母光生育阻害試験における陽性判定のカットオフ値について再検討の余地がある。⑨赤血球光溶血試験の吸光度測定波長の選定に再検討の余地がある。

以上のように、本試験法には光毒性物質のスクリーニング法として一定の有用性は認められるものの、十分な信頼性を持って実用化するためにはまだ検討すべき問題点が残っていると考えられる。

## 評価結果

### 1. 試験法の科学的及び規制面からの妥当性

*In vitro* 光毒性試験法としては、既に 3T3 細胞を用いてニュートラルレッドの取り込みを指標とした光毒性試験法（3T3-NRU 法）が OECD の専門家会議で承認されているが、3T3-NRU 法では水難溶性の薬物において評価結果のばらつきが大きくなる可能性が示唆されている（平成 14 年度厚生労働科学研究報告書）。今回提案された評価手法は、3T3-NRU 法と同等の結果が期待でき、また、水難溶性物質に対しても比較的容易に対応が可能である。また、いずれの試験法も簡便であり、必ずしもクリーンベンチでの操作を必要としない点もメリットの一つと考えられる。

酵母光生育阻害試験は、細胞膜と細胞小器官への作用に対する毒性を通じた細胞死や増殖抑制を指標とする方法であり、赤血球光溶血試験は細胞膜破壊を指標とする方法である。提案されたバッテリー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共に、光毒性のメカニズムに関する情報を得ることが出来ると考えられる。

光毒性につながる光化学反応には、光により励起された化学物質の緩和過程により、いくつかの反応がある。それらは電子伝達に基づく機構（タイプ I）、酸素のエネルギー伝達に基づく機構（タイプ II）及びそれ以外の機構に大別される。これらの機構は水の有無や媒体の種類などの試験系により大きく変化する。例えば、水系ではタイプ II の反応が中心と考えられ、有機溶媒ではタイプ I のラジカル反応が中心と考えられている。反応系が水系の赤血球光溶血試験や培養細胞を用いた光毒性試験では主にタイプ II の光毒性を捉えていると考えられるが、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捉えることができるものと期待される。

単細胞生物である酵母では、基本的に細胞に対する全ての影響を観察できるものと想定されるが、赤血球を用いた系で光毒性を検出できた物質の一部は、酵母を用いた系では捉えられない可能性がある。これは赤血球の膜構造が細胞膜のみから構成されるのに対し、酵母では細胞膜に加え、グルカン等の多糖類から構成される細胞壁が存在するためであり、酵母の膜構造が赤血球より安定であることに起因すると考えられる。すなわち、酵母を用いた系では膜破壊作用の弱い物質の光毒性は捉えにくいものと考えられる。また、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 の結果を導く可能性がある。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赤血球光溶血性試験の方が感度が高いと考えられる。

一方、酵母は有機溶媒に強く、エタノール、メタノール、アセトン及び DMSO を直接濾紙上に滴下しても阻止円の広がりは全く認められていない。この点、赤血球溶血性試験では 1% の DMSO 添加でも溶血が生じる場合がある。

すなわち、酵母は細胞膜に障害を与えるタイプの光毒性に関する検出感度は若干低いが、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ことか

ら、広範囲の被験物質や多くの作用機序による光毒性の検出に適用できると考えられた。これに対し、赤血球光溶血試験の方は細胞膜に障害を与えるタイプの光毒性に関する検出感度が高く、作用機序が明確であることと、弱い作用を感度良く検出できる利点があると考えられた。したがって、これら二つの方法を組み合わせることにより、想定される状況を幅広くカバーできるものと考えた。

## 2. 試験プロトコル構成の妥当性

「酵母光生育阻害試験」および「赤血球光溶血試験」の光毒性検出メカニズムとして、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、あるいは光励起された化学物質自体が生体へ及ぼす作用を、細胞膜破壊や細胞内小器官に対する影響として検出する。Battery system は初めに「酵母光生育阻害試験」を評価し、陰性の場合に「赤血球光溶血試験」を実施し、両試験が陰性の場合に光毒性なしと判定する。なお、バリデーション報告書（2008年1月）では、本 Battery system では両者の組み合わせで評価するところに大きな意味を有することから、施設での作業のしやすさの関係から「赤血球光溶血試験」を先に実施しても差し支えないことを SOP に明記すべきと指摘されており、試験の順序を規定することの可否については検討が必要と考えられた。

「酵母光生育阻害試験」はまず、4%ポテトデキストロース寒天培地に酵母菌を含有させた6ウェルマイクロプレートを作製する。被験物質は最高溶解濃度もしくは投与可能な最高濃度を含む5倍希釈で4系列準備する。溶媒としては精製水、エタノール、アセトン、メタノール及びDMSOを用いることができ、最も高い溶解度を与える溶媒を選択する。滅菌したアルミ箔上に必要枚数の濾紙円板を並べ、溶解被験物質、溶媒、陽性対照を濾紙上に滴下する。用意した6ウェルマイクロプレートに滴下濾紙を密着させる。

照射光源としては資生堂における開発時はUVAを照射するトランスイルミネータ（Vilber Lourmat社製）が用いられたが、バリデーション研究時にはUVBから可視光領域までをカバーするMetal halide lamp（Dr.Honle GmbH社製）、パワーサプライ（Dr.Honle GmbH社製）を装備したSOL500（Dr.Honle GmbH社製）が用いられた。フィルターはUVBをカットするH1を使用し、紫外線強度計（Dr.Honle GmbH社製もしくは（株）トプコン製）でUVAの強度を測定し、（株）トプコン製紫外線強度計を用いる場合には紫外線強度をDr.Honle GmbH社製に補正した上で照射している。

照射終了後、照射、非照射マイクロプレートを反転させ、25℃で72時間培養している。阻止帯の直径の測定はノギスを用いて直交する方向で平均を求め、濾紙円板の直径を差し引いて照射プレートと非照射プレートの差で評価する。阻止帯の明瞭度合いも参考として記録する。

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

各プロトコルの概要は以下のとおりである。

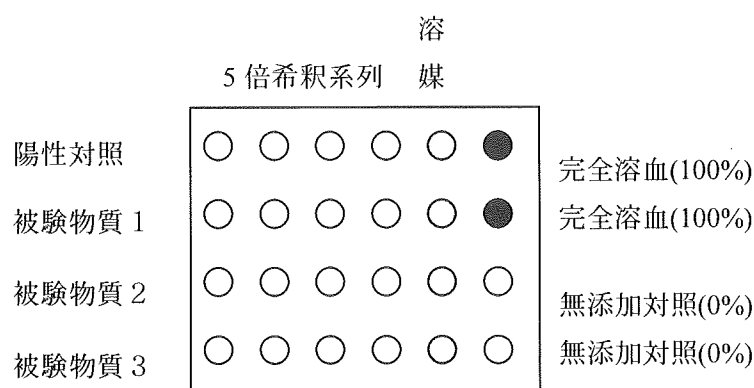
「酵母光生育阻害試験」について一次バリデーション試験結果より陽性対照である8-MOPを含めいくつかの陽性被験物質（阻止帯の差が5mm以上となるべき物質）の阻止帯がグレーゾーン（2mm≦阻止帯の差<5mm）に分類されたことから、陽性対照物質が陽性となる新たな試験条件の設定が必要となり、以下の条件が補完試験に向けて設定された。

	一次バリデーション試験		補完試験
線量	8.5J/cm <sup>2</sup>	→	20J/cm <sup>2</sup>
8-MOP 濃度	0.01% (0.1 mg/mL)	→	0.1% (1 mg/mL)
プレインキュベーション	なし	→	5 時間

以上の条件変更により、陽性物質の偽陰性は認められなくなり、Bithionol,6-MC,SLS の3品だけが偽陽性結果となった。なお、バリデーション報告書中に、「酵母光生育阻害試験」のカットオフ値（5mm）について、3~4mmに変更することで施設間再現性が良くなることから再検討すべきと指摘されており、カットオフ値見直しの可否について、検討が必要と考えられた。

「赤血球光溶血試験」は上清液の吸光をマイクロプレートリーダーを用いて測定、血球膜破壊による溶血度を算出する手法で、プレート中に浮遊している赤血球と反応させるため、膜破壊や蛋白変性を生じない溶媒を選択する必要がある。

被験物質溶液は精製水、アルコール、アセトンおよび DMSO が用いられ、陽性対照としてアクリジン 10%(w/v)アセトン溶液を 5 倍希釈で 4 系列調整している。使用した赤血球はヒトからヒツジに変更されている。赤血球混濁液にジエチルエーテル添加後攪拌、超音波処理を施した完全溶血(100%コントロール)を作成し無添加対照(0%)との基準に用いている。



同じプレートを4枚作成し、2枚は照射用で残りは非照射用とし2度繰り返す。

光源は資生堂における開発時はトランスイルミネータ（Vilber Lourmat 社製）が用いられたが、バリデーション研究時からはソーラーシミュレーター、SOL500, Dr.Honle 社製を用い、短波長紫外線部領域(UVB)をカットする H1 フィルターを用い、光源が安定した時点で紫外線強度計(UVA-Meter, Dr.Honle 社製)で測定し、6.2 J/cm<sup>2</sup>を照射している。「赤血球光溶血試験」では照射後のプレートを攪拌、遠心分離し上清をマイクロプレートリーダーに移して、540nm 領域での吸光度を測定した。光溶血度の算出は非照射（2プレート）の平均を求めた上で照射（2プレート）の平均を基に計算する。なお、バリデーション研究報告書(2004年8月)において、吸光度の測定波長は540nmより525nm前後の波長を用いる方が良かったのでSOPでも波長を変更することを検討すべきと指摘されており、吸光度の測定波長については検討が必要と考えられた。

溶血度の差 (L;%) = 照射プレート[100 X (OD 被験物添加 - OD 溶媒添加) / (OD 完全溶血平均 - OD 無添加対照平均)] - 非照射プレート[100 X (OD 被験物添加 - OD 溶媒添加) / (OD 完全溶血平均 - OD 無添加対照平均)]

L < 5 で光毒性は陰性、5 ≤ L < 10 で擬陽性、10 ≤ L で陽性と評価される。

### 3. バリデーションに用いられた物質の分類

資生堂における検討試験における光毒性評価の対象物質としては、以下のものが用いられている。

#### 1) 香料

Musk ambrette, Musk ketone, Musk xylene, Phantolid, Galaxolide, 8-methoxypsoralen (8-MOP), 5-methoxypsoralen (5-MOP), 6-methylcoumarin

#### 2) 紫外線吸収剤

Parsol 1789, Parsol MCX, ASL-24, ASL-24S, Escalol 507(D)

#### 3) 医薬品

Sulfanilamide, Indomethacin, Piroxicam, Chlorpromazine (CPZ)

#### 4) 抗菌剤

TCC, Bithionol, TBS, TCSA

#### 5) 染料

Rose bengal, Acridine, Anthracene

これらは、いずれも光毒性物質、あるいは光アレルギー物質、または両方の性質をもつものとして知られている。ただし光アレルギー性物質は多かれ少なかれ光毒性を有するため、全ての物質を光毒性評価の対象物質とみなしうる。これらの中で、臨床的あるいは古典的実験系で特に重要とされるのは以下である。

TCSA は強い光毒性と光アレルギー性を有する物質であり、過去に欧州で多くの光アレルギー性接触皮膚炎の患者が発生した。

8-MOP は DNA に光結合する強い光毒性を有するが、光アレルギー性はほとんど生じない。そのため光化学療法に利用されている。5-MOP も同様に強い光毒性を持つ。

Musk ambrette, Bithionol, 6-methylcoumarin は光アレルギー性接触皮膚炎を起こすことが知られている。上記物質より光毒性は弱いと思われる。

医薬品の中では sulfanilamide が UVB を作用波長に持つ物質として知られている。Piroxicam は光アレルギー性光線過敏症を起こす。Chlorpromazine や Indomethacin の光線過敏症の頻度はそれより低い。

バリデーション試験においては、EU/COLIPA あるいは資生堂における *in vivo* での評価結果を基に以下の 9 物質が選択されている。

1) 香料

Anthracene

2) 紫外線吸収剤

4-t-butyl-4-methoxydibenzoylmethane (BMDM)

3) 医薬品

Amiodaron, Chlorpromazine (CPZ)

4) 抗菌剤

Bithionol, Chlorhexidine (CHD)

5) 染料

Acridine, 6-methylcoumarin (6-MC)

6) その他

Sodium lauryl sulfate (SLS)

BMDM は Parsol 1789 と同じ物質であるが、名前を区別化して用いられているため、資生堂の検討試験での Parsol 1789 とは入手先が異なるか、あるいは純度が異なると思われる。

CHD、SLS は陰性コントロールとして検討されたものとする。

#### 4. 試験法の正確性を評価する物質の *in vivo* および参照データ

資生堂における検討試験で用いられた物質について、臨床的頻度を加味し、モルモットの *in vivo* のデータをもとにすると各物質の光毒性の強さは以下のように考えられる。

1) 強い光毒性をもつグループ

TCSA, 8-MOP, 5-MOP, Phantolid, Galaxolide, Acridine, Anthracene

2) 中等度の光毒性をもつグループ

Musk ambrette, Musk ketone, Musk xylene, 6-methylcoumarin, Sulfanilamide, Piroxicam,

Chlorpromazine, TCC, Bithionol, TBS

3) 弱い光毒性をもつグループ

Parsol 1789, Parsol MCX, ASL-24, ASL-24S, Escalol 507(D), Indomethacin, Rose bengal

本 battery system 評価で光毒性(+)とされた物質は、TCSA、8-MOP、5-MOP、Phantolid、Galaxolide、Acridine、Anthracene、Chlorpromazine であり、Chlorpromazine を除いて全て上記 1)のグループに含まれている。また本評価で光毒性(-)とされた物質は、TCC、Sulfanilamide、Indomethacin、Piroxicam、Parsol 1789、Parsol MCX、ASL-24、ASL-24S、Escalol 507(D)、Musk ambrette、Musk ketone、Musk xylene であった。

従って、光毒性の battery system 評価では、Chlorpromazine をやや過大評価し、Sulfanilamide、Piroxicam、Musk をやや過少評価している可能性があるものの、臨床的実態あるいは *in vivo* 試験の結果とほぼ一致していると考えられる。

バリデーション試験において用いられた物質について、臨床的頻度を加味し、モルモットの *in vivo* のデータをもとにすると各物質の光毒性の強さは以下のように考えられる。

1) 強い光毒性をもつグループ

Acridine, Amidaron, Anthracene

2) 中等度の光毒性をもつグループ

Bithionol, CPZ, 6-MC

3) 弱い光毒性をもつグループ

BMDM

4) 光毒性がないまたは極微のグループ

CHD, SLS

本 battery system 評価では、施設 b は他施設と結果が異なり、また被検物質の光毒性を反映した結果ではないために、評価から除外したい。その上で、光毒性(+)と評価された物質は、Acridine、Amidaron、Anthracene、CPZ であった。また光毒性(-)と判定された物質は、Bithionol、6-MC、BMDM、CHD、SLS であった。よって 1)のグループに属する物質はすべて陽性、2)のグループに属する物質の 1 つが陽性で 2 つが陰性、3)および 4)に属する物質はすべて陰性であった。光感受性物質（臨床的には光アレルギー）として知られる Bithionol と 6-MC の光毒性が過小評価されたともいえるが、これらの物質による光線過敏症が光アレルギー性機序で起こっていることを考慮すると、各物質の光毒性を概ね正當に評価していると考えられる。



## 5. すべてのデータおよび結果

1990年に資生堂の社内で光毒性試験代替法の検討が開始され、赤血球光溶血試験法ならびに酵母光生育阻害試験法の導入、Battery法の導入を検討され、1997年に代替法による評価フロー提案がなされた。2003年2月15日に光毒性評価方法の提案がなされ、2004年1月から4月にかけて、(株)コーセー研究本部品質保証センター(以下、コーセー)、(財)食品薬品安全センター秦野研究所(以下、食薬センター秦野研)、東洋ビューティ(株)中央研究所(以下、東洋ビューティ)、日本メナード化粧品(株)総合研究所(以下、日本メナード化粧品)、マルホ(株)京都R&Dセンター(以下、マルホ)、資生堂の計6機関でバリデーションが実施された。同年8月にはバリデーション研究報告書が提出された(第1次バリデーション結果)。しかし、酵母光生育阻害試験において陽性対照が明確に捉えられるように条件の変更が必要であるとの結論から、2006年7月~9月末まで、前記6機関のうち、東洋ビューティを除く5機関で、酵母光生育阻害試験のバリデーション補完実験が実施された(補完試験結果)。これらの経緯から提出された複数の実験データの結果を以下の3つに大きく分類した。

### 5.1 資生堂における検討試験結果

#### 5.2 第1次バリデーション結果

#### 5.3 補完試験結果

2006年末に補完研究報告書が提出され、2008年1月に光毒性試験代替法バリデーション研究報告書が提出された。なお、各機関で実施されたすべての試験結果について、詳細な情報が提出されており、これらを用いて評価した。

### 5.1 資生堂における検討試験結果

資生堂における検討試験結果については、付録として別添する。

### 5.2 第1次バリデーション結果

#### 5.2.1 被検物質

EU/COLIPAでの*in vivo*評価結果、ならびに資生堂の*in vivo*評価結果をもとに下記の陽性(P)ならびに陰性(N)、または光毒性が考えられない化学構造の物質(E)を選択された。なお、各施設には、それぞれ物質名を隠してコード化し、異なった組み合わせの陽性物質3種と陰性物質3種の計6種をそれぞれ供された。

物質名(略名) P(陽性):4 N(陰性):5 の9を選択	In vivo 判定(資生堂の結果を優先)		
	本バージョン 採用の評価	資生堂の評価 (評価点)	EU-COLIPA での評価
Amiodaron	P		P
Anthracene	P	P(1.8)	P
Bithionol	N	N(0)	P
Chlorhexidine (CHD)	N		N
Chlorpromazine (CPZ)	P	P(1.6)	P
5-Methoxypsoralen (5-MOP)	P	P(2.7)	P
Sodium lauryl sulfate (SLS)	N		N
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (EDA)	E	E(1.0)	
4-t-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (BMDM)	N	N(0)	
Musk ambrette	N	N(0.7)	N
Piroxicam	N	N(0)	N
Rose bengal	N	N(0)	E
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	P	P(1.5)	P?
8-Methoxypsoralen (8-MOP)	P	P(4.8)	P
6-Methylcoumarin (6-MC)	N	N(0)	P
Acridine	P	P(2.1)	P

### 5.2.2 酵母光生育阻害試験の結果

総じてバラツキが多く実際の使用には耐えない結果であった。a 施設では *in vivo* で陰性の Bithionol を陽性、同じく *in vivo* 陰性の CHD を擬陽性と判定した。b 施設では誤った判定結果が目立ち、*in vivo* 陽性の Amiodaron、CPZ が陰性あるいは擬陽性と判定された。また、*in vivo* 陽性の Anthracene でも 1 回目は擬陽性と判定された。c 施設、d 施設でも誤判定が目立ち、*in vivo* 陽性の Anthracene で陰性、d 施設では *in vivo* 陽性の Amiodaron、Acridine が陰性と判定された。e 施設、f 施設も誤判定が目立ち、e 施設では *in vivo* 陽性の CPZ、Acridine が擬陽性あるいは陰性と判定され、f 施設では CPZ、Acridine が陰性と判定されるなど多くの間違いが目立った。さらに、各施設 2 回の実験間で結果に差が見られなかったのは a、f 施設のみであり、b、c、e 施設では 2 回の実験データを比べるとバラついた結果が目立った。

表. 酵母光生育阻害試験の結果

施設	a			b			c			d			e			f			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
回数(2回のデータを要求)																			
Anthracene	P	P	P		E	P		E	E		E	E							
Amiodaron	P	P	P		N	N		P	E		E	E							
CHD	N	E	E		N	N		N	N		N	N							
CPZ	P	P	P		E	N								E	E	E	N	N	
Bithionol	N	P	P		E	N								E	E	E	E	E	
SLS	N	N	N		N	N								N	N	N	N	N	
Acridine	P							P	E		E	E		P	E		E	E	
6-MC	N							N	N		E	E		E	E		E	E	
BMDM	N							N	N		N	N		N	N		N	N	

<2mm: Negative, 2mm< diameter < 5mm: Equivocal, >5mm: Positive

### 5.2.3 赤血球光溶血試験の結果

吸光度計の波長を 525nm で測定した結果、酵母光生育阻害試験の場合と同様に陽性物質が明確に特定されず、さらに 2 回あるいは 3 回の試験で異なる結果が、a、b、c 施設で認められた。2 回の試験ですべての結果が一致したのは d、e、f 施設であった。In vivo で陽性の Amiodaron は b 施設で擬陽性だった以外は a、c、d いずれの施設でも陰性判定とされている。また、in vivo で陰性の CHD、Bithionol は実施したいずれの施設でも陽性と誤判定されている。更に、b 施設では SLS を、c 施設では 6-MC をいずれも陽性と誤判定している。

表. 赤血球光溶血試験の結果、(波長 525nm で測定)

施設	a			b			c			d			e			f			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
回数(2回のデータを要求)																			
Anthracene	P	E	P		P	P		E	E		P	P							
Amiodaron	P	N	N		N	E		N	N		N	N							
CHD	N	P	P		P	P		P	P		P	P							
CPZ	P	P	P	P	P	P								P	P	P	P	P	
Bithionol	N	P	P		P	P								P	P	P	P	P	
SLS	N	N	N		N	P								N	N	N	N	N	
Acridine	P							P	P		P	P		P	P	P	P	P	
6-MC	N							P	N	N	N	N		N	N	N	N	N	
BMDM	N							N	N		N	N		N	N	N	N	N	

<5%: Negative, 5%< hemolysis < 10%: Equivocal, >10%: Positive

吸光度計の波長を 540nm で測定した結果、陽性物質が明確に特定されなかった。波長 525nm の結果と類似結果で、さらに Anthracene が a、b 施設で擬陽性判定となり、e 施設で

CPZ が 2 回陰性と判定されている。

表. 赤血球光溶血試験の結果、(波長 540nm で測定)

施設	a			b			c			d			e			f			
	回数(2回のデータを要求)	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Anthracene	P	E	E		E	E		E	N		P	P							
Amiodaron	P	N	N		N	E		N	N		N	N							
CHD	N	P	P		E	P		P	P		P	P							
CPZ	P	P	P	P	N	P								N	N	E	P	P	
Biflithionol	N	P	P		P	P								P	P	P	P	P	
SLS	N	N	N		N	P								N	N	N	N	N	
Acridine	P							P	P		P	P		P	P	P	P	P	
6-MC	N							P	N	N	N	N		N	N	N	N	N	
BMDM	N							N	N		N	N		N	N	N	N	N	

<5%: Negative, 5%<hemolysis<10%: Equivocal, >10%: Positive

酵母光生育阻害試験結果ならびに赤血球光溶血試験結果における一次バリデーションの判定基準は以下の通りである。すなわち、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験結果の両者あるいは一方が陽性的場合には、陽性物質と判定される。また、両者が擬陽性あるいは一方が疑陽性で他方が陰性的場合には疑陽性物質と判定され、両者が陰性的の場合のみ陰性物質と判定される判定基準が採用されている。

表. 一次バリデーションの判定基準

		赤血球光溶血試験		
		陽性	擬陽性	陰性
酵母光生育 阻害試験	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

#### 5.2.4 施設内再現性

b ならびに c 施設における、施設内の実験の繰り返しで結果が異なった施設ならびに被検物質の組合せを示す。とくに b 施設では多くの被検物質で結果が異なった。この理由とし