

酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の組合せによる光毒性評価方法の提案

平成 15 年 2 月 13 日

株式会社 資生堂

安全性・分析センター

安全性研究所

杉山 真理子、森 眞輝、穂谷 昌利、板垣 宏

これまで、化粧品原料の光毒性は、「化粧品・医薬部外品製造ガイドブック」¹⁾や2001年に出版された「化粧品の安全性評価に関する指針2001」²⁾に記述されている白色モルモットや白色ウサギを用いる方法が汎用されてきた。

しかし、近年、動物愛護の観点から代替法の開発が進行し、EUでは、Balb/c 3T3細胞を用いる「*In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test」がECVAMにより承認され、さらにはOECDガイドラインへの採択も間近である。このように*in vitro*光毒性試験の開発が進展した理由としては、光毒性の発現機構が古くから検討されてきたことによるものと思われる。

光毒性の発現機構としては、化学物質が紫外線照射により励起され、基底状態に戻るときに放出されるエネルギーにより生ずる活性酸素やフリーラジカルの作用や、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(DNA)を含めた細胞内小器官を想定して、これまでに幾つかの*in vitro*光毒性試験が検討されてきた。

弊社においては、化粧品原料に対する*in vitro*光毒性試験の開発に向けて積極的な研究を実施してきた。その結果、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験の結果を組み合わせるBattery評価系を開発した。^{3)~11)}

酵母光生育阻害試験は、被験物質の適用により生ずる生育阻止帯の大きさを光照射の有無で比較する評価法である。酵母光生育阻害試験は、核等の細胞小器官への傷害を指標とする方法であり、化粧品原料に多い難水溶性の物質も評価可能であるという特長を有する。一方、赤血球光溶血試験は、細胞膜破壊を指標とする方法とする方法であり、被験物質の媒体として使用する有機溶媒を、培養細胞を用いる試験よりは多量に適用可能という特長を有している。さらに、この2種の試験法の結果を組み合わせるBattery評価系では、化粧品原料等の安全性評価で問題となるFalse negativeは認められないことを見出した。^{4,6)} また限られた被験物質数ではあるが、弊社の結果では、このBattery評価系は、「*In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test」と比較して動物試験結果と同等以上の対応性を有することを確認した。^{10,11)}

そのため、弊社においては、このBattery評価系を化粧品原料の日常試験として活用している。¹⁰⁾ さらに、これまで光源として使用してきたUVAからOECDガイドラインで検討されているソーラーシミュレーターへの切り替えに伴う諸条件についても検討し、ソーラーシミュレーターを用いても光毒性が評価可能であることを確認してきた。^{9,11)}

よって、今回、酵母光生育阻害試験と赤血球光溶血試験の結果を組み合わせるBattery評価系を、光毒性を評価する*in vitro*試験として提案する。

引用文献

- 1) 日本公定書協会編、医薬部外品・化粧品製造申請ガイドブック第2版、薬事日報社、p143-144 (1994).
- 2) 日本化粧品工業連合会編、化粧品の安全性評価に関する指針 2001、薬事日報社、p9-11 (2001).
- 3) 赤血球を用いる光毒性試験法の検討、杉山真理子、板垣宏、加藤忍
日本動物実験代替法学会第5回大会、1991年11月(秦野)。
- 4) 赤血球および酵母を用いる光毒性試験の検討、杉山真理子、板垣宏、加藤忍
日本動物実験代替法学会第6回大会、1992年12月(東京)。
- 5) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cells hemolysis assay, M.Sugiyama, H.Itagaki, T.Hariya, N.Murakami and S.Kato, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 2, 183-191 (1994).
- 6) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and battery system, M.Sugiyama, H.Itagaki and S.Kato, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 2, 193-202 (1994).
- 7) Photohemolysis test and yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of chemicals, M.Sugiyama, H.Itagaki and S.Kato, "*In vitro* skin toxicology: Irritation, phototoxicity and sensitization", Mary Ann Liebert Inc. Publishers, New York, 1994, p.213-221.
- 8) 光毒性試験代替法 試験の実例；その有用性と問題点、杉山真理子
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 5, 268-277 (1998).
- 9) 酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験における光源の影響
穂谷昌利、森真輝、杉山真理子、板垣宏
日本動物実験代替法学会第16回大会 2002年12月(東京)
- 10) A strategic approach for predicting phototoxicity of cosmetic ingredients, M.Sugiyama, M.Mori, M.Hoya, M.Hirota and H.Itagaki, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, *in press*.
- 11) Effects of light source on the prediction of phototoxicity by the yeast growth inhibition phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay, M.Mori, M.Hoya, M.Sugiyama, and H.Itagaki, *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*, 投稿準備中。

以上

提出資料のリスト

- 資料 1-1 : モルモットを用いる光毒性試験プロトコール
- 資料 1-2 : モルモットを用いる光毒性試験の再現性及び予測性など
- 資料 2 : 光毒性のメカニズム、Battery system による光毒性評価フロー、
酵母光生育阻害試験の原理、赤血球光溶血試験の原理
- 資料 3-1 : Battery system プロトコール
- 資料 3-2 : 被験物質の *in vivo* 試験結果プロトコール
- 資料 3-3 : 赤血球光溶血試験プロトコール
- 資料 4 : 被験物質のリスト (規格、特性等)
- 資料 5 : 被験物質の *in vivo* 試験結果
- 資料 6-1 : 被験物質の *in vitro* 試験結果のまとめ
- 資料 6-2 : 被験物質の酵母光生育阻害試験結果のまとめ
- 資料 6-3 : 被験物質の赤血球光溶血試験結果のまとめ
- 資料 7-1 : Battery system における感度、特異性、予測性、一致率及びその他特徴
- 資料 7-2 : 酵母光生育阻害試験における感度、特異性、予測性、一致率及びその他特徴
- 資料 7-3 : 赤血球光溶血試験における感度、特異性、予測性、一致率及びその他特徴
- 資料 8 : 酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の再現性について
- 資料 9-1 : 論文 (引用文献 5)
- In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cells hemolysis assay,
M.Sugiyama, H.Itagaki, T.Hariya, N.Murakami and S.Kato,
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 2, 183-191 (1994).
- 資料 9-2 : 論文 (引用文献 6)
- In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (II) Yeast growth inhibition assay and
battery system, M.Sugiyama, H.Itagaki and S.Kato,
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 2, 193-202 (1994).
- 資料 9-3 : 論文 (引用文献 7)
- Photohemolysis test and yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of
chemicals, M.Sugiyama, H.Itagaki and S.Kato,
"In vitro skin toxicology: Irritation, phototoxicity and sensitization",
Mary Ann Liebert Inc. Publishers, New York, 1994, p.213-221.
- 資料 9-4 : 論文 (引用文献 8)
- 光毒性試験代替法 試験の実例 ; その有用性と問題点、杉山真理子
Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 5, 268-277 (1998).

資料 9-5：学会ポスター発表資料（引用文献 9）

酵母光生育阻害試験および赤血球光溶血試験における光源の影響

穂谷昌利、森眞輝、杉山真理子、板垣宏

日本動物実験代替法学会第 16 回大会 2002 年 12 月（東京）

資料 9-6：論文（引用文献 10）

A strategic approach for predicting phototoxicity of cosmetic ingredients,

M.Sugiyama, M.Mori, M.Hoya, M.Hirota and H.Itagaki,

Alternatives to Animal Testing and Experimentation, *in press*.

資料 9-7：論文（引用文献 11）

Effects of light source on the prediction of phototoxicity by the yeast growth inhibition

phototoxicity assay and the red blood cell photohemolysis assay,

M.Mori, M.Hoya, M.Sugiyama, and H.Itagaki,

Alternatives to Animal Testing and Experimentation, 投稿準備中。

資料 10-1：提案者の研究歴等（板垣宏）

資料 10-2：提案者の研究歴等（杉山真理子）

資料 10-3：提案者の研究歴等（森眞輝）

資料 10-4：提案者の研究歴等（穂谷昌利）

資料 11-1：酵母光生育阻害試験に関する生データ等

資料 11-2：赤血球光溶血試験に関する生データ等

以上

モルモットを用いる光毒性試験プロトコール

1 目的

本試験法は、被験物質の光毒性をモルモットを用いて評価することを目的とする。

2 適用範囲

化学物質の光毒性試験に適用する。

なお、これらに紫外部吸収（280～400 nm）が認められた場合に本法で実施する。

3 被験物質及び対照物質

3.1 被験物質の必要量

約 5 g（mL）の被験物質を必要とする。

3.2 媒体の選択

被験物質の化学的性状により適切な媒体を用い、必要な場合には pH の調整などを行う。

3.3 対照物質

陰性対照物質として媒体を用いる。

3.4 陽性対照物質

キサントトキシン（8-メトキシソラレン、ナカライテスク株式会社）を陽性対照物質とする。媒体としてエチルアルコールを用いる。

4 使用動物

4.1 種、系統、性

モルモット・Std:Hartley 系・雌を用いる。

4.2 週齢

4～5 週齢で購入し、約 1 週間の検疫・馴化飼育後、試験に供する。

4.3 環境条件

飼育室の環境条件は、温度 21～25℃、湿度 40～70%、換気回数 10～15 回/時間（オールフレッシュエアー）、照明時間 12 時間（7～19 時）とする。

4.4 飼育密度

1 匹/ケージとする。

4.5 飼育器材

ケージは金属製網底ケージ（260 × 380 × 180 mm, 日本クレア株式会社製）を用いる。識別はケージ識別カードを用いて行う。

4.6 飼料

固型飼料（ウサギ・モルモット用固型飼料 RC-4, オリエンタル酵母工業株式会社製）を用いる。

4.7 飲料水

紫外線及びマイクロフィルター処理した水道水を用いる。

4.8 個体識別

入荷時に装着する耳標により行う。

4.9 検疫・馴化飼育

原則として 11 日間とする。

4.10 使用動物数

使用数は原則として 5 匹とする。

5 投与経路, 投与量及び投与方法

5.1 試験濃度の設定

基本的に、濃度及び媒体は被験物質ごとに設定する。

5.2 投与方法

投与前日にモルモットの背部を電気バリカンで剪毛した後、ヘアリムーバー（株式会社資生堂）にて除毛処理し、約 24 時間後にモルモット専用固定器を用いて腹位に固定する。

布製絆創膏（ニチバン No. 25, ニチバン株式会社）を用いて、モルモットの背部正中線を中心とした左右両側の皮膚に、約 1.5 × 1.5 cm の区画を 4 ヶ所ずつ左右対称に設け、左右一対ずつ被験物質 0.02 ml もしくは 0.02 g を均一に開放塗布する。5 水準の被験物質を投与する必要がある場合は、区画を約 1.0 × 1.0 cm の範囲とし、投与量を 0.01 ml もしくは 0.01 g とする。また、皮膚反応の部位差を小さくするために投与の際、動物ごとに塗布部位を 1 つずつ下方にずらしてローテーションを行う。

なお、被験物質が液状の場合マイクロピペット（エクセルトリペット：稲垣薬品）を用い、マイクロピペットにて分取不可能である場合にはスパチュラを用いる。なお、粘度の高い被験物質や製剤（クリーム、乳液など）の分取では専用のマイクロピペット（マイクロマン M

— 25 : GILSON) を用いる。

投与後 30 分に、片側をアルミホイルで被覆して対照部とした後、光源から動物までの距離を 10 cm に定めて 14.0 J/cm² のエネルギー量の光照射を行う。

5.3 光照射

光源として Black Light (東芝 FL40S・BLB, $\lambda = 300 \sim 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} = 360 \text{ nm}$) ランプ 6 灯を並列に設置し、ガラスフィルター (厚さ 3 mm) にて 320 nm 以下の波長をカットして照射する。

なお、照射開始 10 分前に光源のスイッチを入れ、光源が安定するまで約 10 分放置後、紫外線強度計 (UVR-305/365・(II), 關トプコン製) を用いて光源から 10 cm の距離で紫外線強度を測定する。照射時間は以下の式に従って求め、タイマーを設定する。

照射終了後、アルミホイル、布製絆創膏及び保定を取り除き、1 匹ずつケージに收容する。

紫外線強度 : A (mW/cm²)

$$\text{照射時間 (m)} = \frac{14.0 \times 1000 \text{ mW/cm}^2}{A \text{ mW/cm}^2} \times \frac{1}{60}$$

6 皮膚反応の判定

照射後 24, 48 及び 72 時間目に、皮膚反応の判定を飼育室照明下で肉眼観察し、紅斑及び浮腫について以下の判定基準に従い、判定記録 (光毒性試験) に記載する。判定に際し、必要に応じて皮膚上に残存している被験物質を脱脂綿に水道水あるいはエチルアルコールを含ませて拭き取る。

判定基準

	判定基準	評点
紅斑	紅斑が全く認められないもの	0
	わずかな紅斑が認められるもの	1
	明らかな紅斑が認められるもの	2
	強い紅斑または壊死が認められるもの	3
浮腫	浮腫が全く認められないもの	0
	わずかな浮腫が認められるもの	1
	明らかもしくは強い浮腫が認められるもの	2

7 光毒性の評価

照射後 24, 48 及び 72 時間目に、照射部位と非照射部位のそれぞれの評点の和を動物数で割って、各時間毎の平均評点を算出し、照射部位と非照射部位の差を求める。この差の最大値を光毒性最終評価点とし、以下の評価基準に従って評価する。

計算はフルスケールで行い、評点等は小数点以下第 2 位を四捨五入し、小数点以下第 1 位まで求める。

評価基準

光毒性最終評価点	評 価	評価略号
0.0 ~ 0.5	ほとんど光毒性なし	—
0.6 ~ 1.2	軽度の光毒性あり	±
1.3 ~ 2.5	中程度の光毒性あり	+
2.6 ~ 5.0	強い光毒性あり	++

8 その他の検査

8.1 一般状態観察

投与日は投与前後の2回、投与日以降、判定終了後まで1日1回観察する。

8.2 体重測定

投与日及び投与後3日に測定する。

9 統計学的解析

統計学的解析は用いない。

10 参考文献

- 1) Morikawa, F., Nakayama, Y., Fukuda, M., Yokoyama, Y., Nagura, T., Ishihara, M. and Toda, K., Evaluation of Phototoxicity and Photoallergy in Laboratory Animals : *Sunlight and Man*. Fitzpatrick, T. B. et. Al. Ed. University of Tokyo Press, pp. 529-557 (1974) .
- 2) 森川 藤鳳, 新しい毒性試験と安全性の評価, 白須 泰彦・松岡 理 編, ソフトサイエンス社, pp. 433-465 (1975) .
- 3) 小林 敏明 他, 毒性試験講座7 機能毒性学, 福原 武彦・小野 宏 編, 地人書館, pp. 287-288 (1990) .

以 上

モルモットを用いる光毒性試験の再現性及び予測性など

今回使用したモルモットを用いる光毒性試験は、ガイドラインとして正式に認められたものではないが、化粧品企業などにおいて古くから種々検討されており、その結果、現在では光毒性を評価する安全性試験として、かなりの実績があるものと考えられる。

このモルモットを用いる光毒性試験の詳細については、1975年に出版された「新しい毒性試験と安全性の評価」に森川(1975)が記述したものがあ¹⁾る。また、このモルモットを用いる光毒性試験は、昭和63年～平成元年度の「新化粧品等安全性評価指針」の検討班(黒川雄二班長)により作成された「化粧品毒性試験法ガイドライン案」になかにも採り上げられ²⁾、さらには「化粧品・医薬部外品製造ガイドブック」³⁾、や2001年に出版された「化粧品の安全性評価に関する指針2001」⁴⁾にも記載されている。

このモルモットを用いる光毒性試験の施設内の再現性については、開発時からの時間経過を考えるとかなり高いものと予想される。以下の表は、弊社における陽性対照物質(0.02%の8-methoxypsolaren)のエタノール溶液の光照射部位における皮膚反応について、過去の試験結果をまとめたものである。各観察時間における評価点の変動係数は0.16～0.26であり、通常の生物試験結果の変動係数が0.2前後であることを考慮すると、本試験の再現性の高さを示すものと考えられる。

試験実施時期	24時間		48時間		72時間	
	陽性率	評価点	陽性率	評価点	陽性率	評価点
1985/7/8-1985/7/12	10/10	2.4	10/10	2.8	10/10	2.4
1985/7/22-1985/7/26	5/5	4.6	5/5	3.6	5/5	3.4
1986/5/26-1986/5/30	5/5	4.0	5/5	3.4	5/5	2.0
1986/10/20-1986/10/24	5/5	4.6	5/5	3.2	5/5	3.0
1988/5/30-1988/6/3	10/10	5.0	10/10	4.5	10/10	4.3
1989/5/22-1989/5/26	5/5	4.2	5/5	3.8	5/5	3.4
平均評価点		4.1		3.6		3.1
標準偏差		0.9		0.6		0.8
変動係数		0.22		0.16		0.26

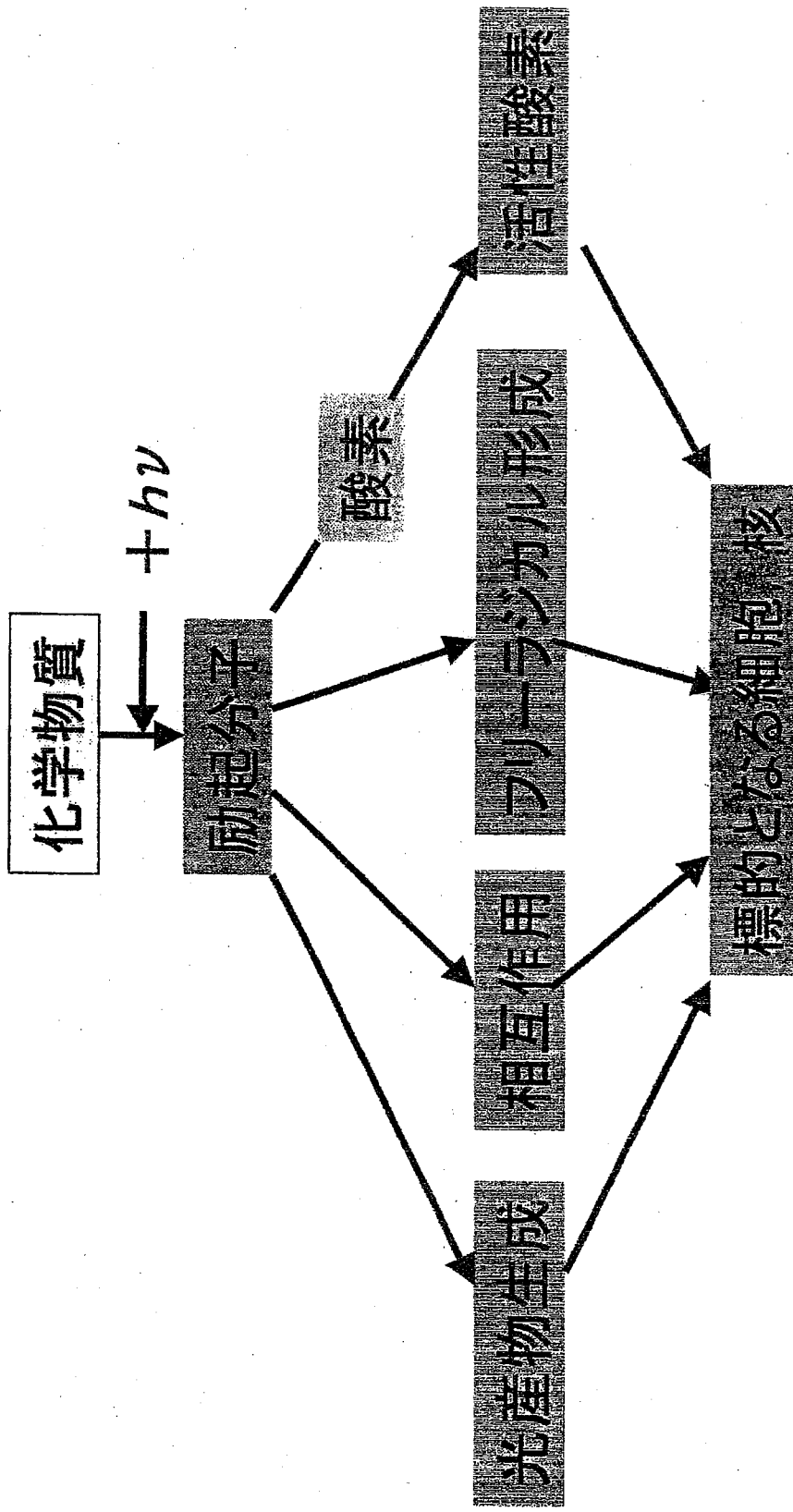
施設間の再現性については、試験法の施設間 validation は実施されていないため厳密な意味では議論することはできない。しかし、この試験法が開発されてきてからの時間経過並びに本試験法の種々のガイドライン案への採用を考えると施設間再現性は低くないものと考えられる。

次にヒトにおける光毒性との対応性であるが、試験法の施設間 validation が実施されていないことおよびヒトのデータが光毒性と光感作性(光アレルギー性)を正確に区別できないことから、厳密な意味での対応性を議論することは不可能である。しかし、このモルモットを用いる光毒性試験が既知の光毒性物質を捉えていること、並びに企業がこの試験を導入したことにより、過去に問題となった光毒性に基づく市場での皮膚トラブルが、現在、ほとんど報告されていないことから、このモルモットを用いる光毒性試験は、ヒトにおける光毒性を的確に捉えているものと考えられる。

引用文献

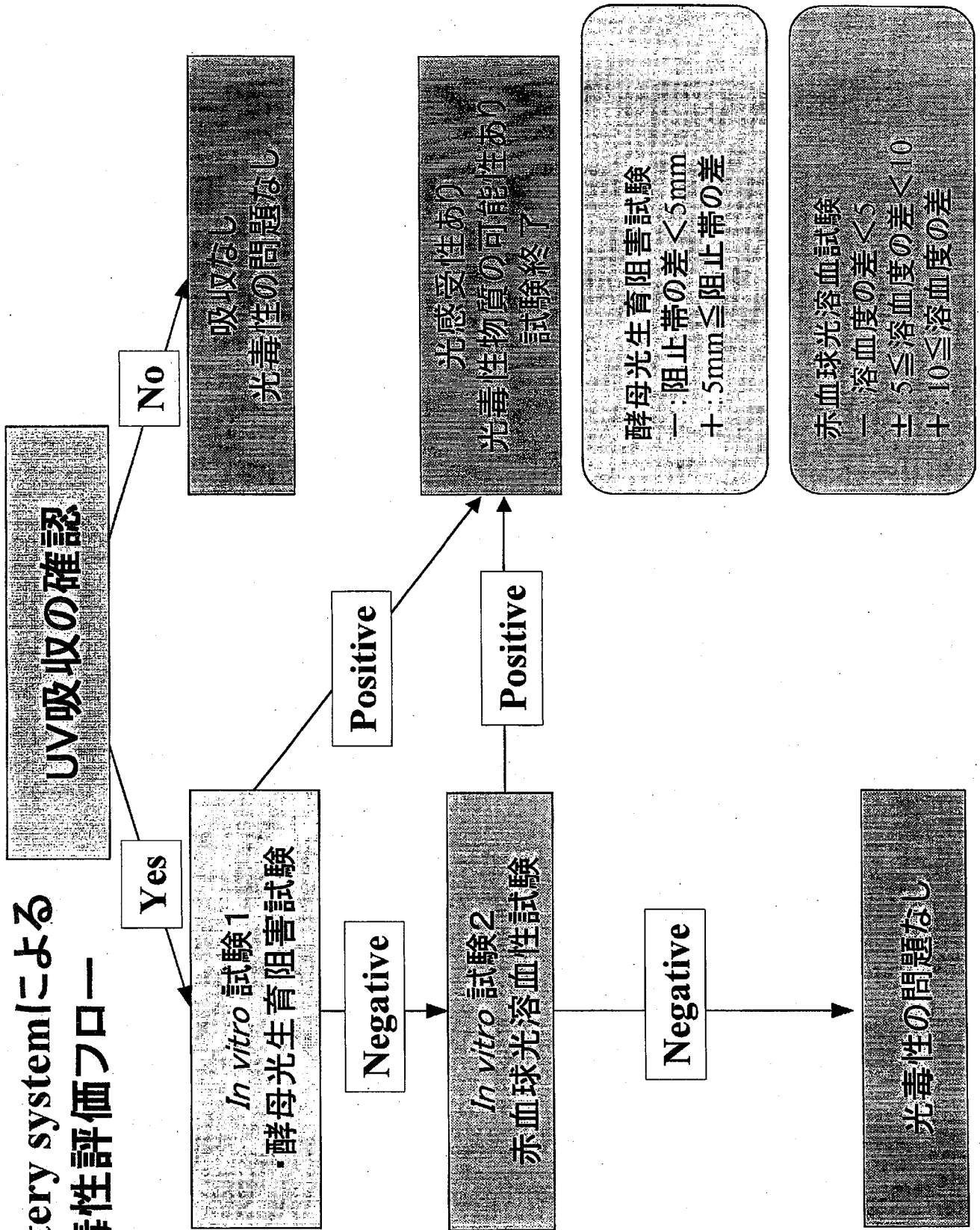
1. 森川藤鳳、新しい毒性試験と安全性の評価、白須泰彦・松岡理編、ソフトサイエンス社、p433-465 (1975).
2. 黒川雄二他、新化粧品等安全性評価指針班報告書、1990年.
3. 日本公定書協会編、医薬部外品・化粧品製造申請ガイドブック第2版、薬事日報社、p143-144 (1994).
4. 日本化粧品工業連合会編、化粧品の安全性評価に関する指針2001、薬事日報社、p9-11 (2001).

光毒性のメカニズム

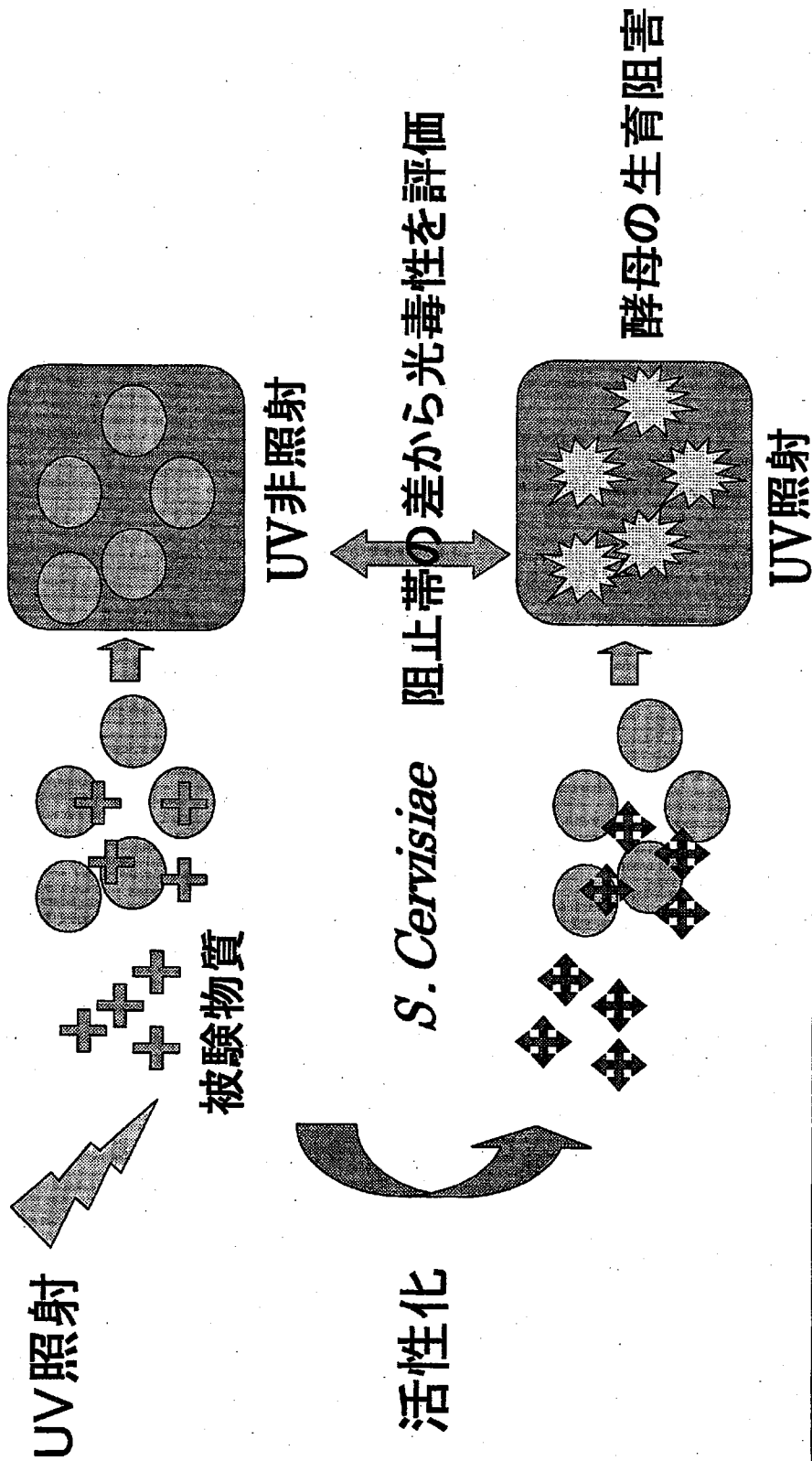


- ・酵母光生育阻害試験：生育阻害(膜破壊, 細胞小器官)
- ・赤血球光溶血試験：光溶血(膜破壊)
- ・光細胞毒性試験：細胞毒性(サイトカインおよびケミカルメデイエーターの放出)

Battery systemによる 光毒性評価フロー

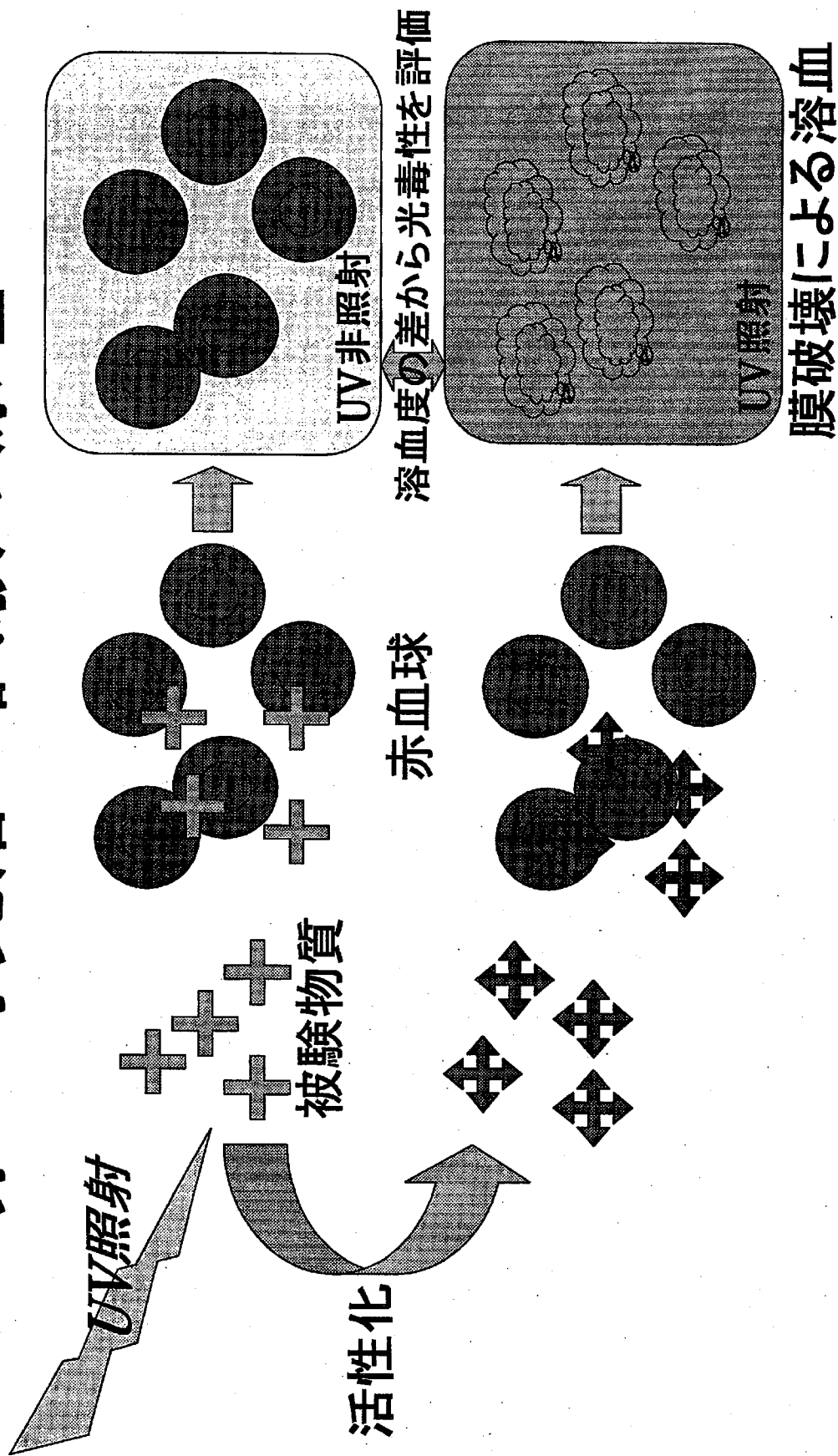


酵母光生育阻害試験の原理



化学物質の細胞膜および細胞内小器官に対する障害に基づく試験法であり、UV照射によって生じる酵母の生育阻害から化学物質の光毒性を評価する。

赤血球光溶血試験の原理



化学物質の細胞膜破壊機構に基づく試験法であり、UV照射時の溶血性から化学物質の光毒性を評価する。

Battery system プロトコール

1 適用範囲

化粧品、医薬部外品に用いられる基材、薬剤、色剤及び香料のうち、化学構造から可視部・紫外部(280~780nm)に吸収を持つと予想される被験物質、植物抽出物(液)及び外観上着色のある被験物質に関して適用する。

2 光毒性試験の進め方

被験物質は、最初に「酵母光生育阻害試験」にて評価を行い、陰性の場合には更に「赤血球光溶血試験」を行う。

どちらの試験においても陰性の場合には光毒性に関する問題はないと判断する。

いずれかの試験法で陰性と判断されなかった場合は光毒性があるものと判断する。

3 試験法の改訂

試験法に改訂の必要が生じたときは、定められた手順に従い改訂する。

4 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.* (1994) In Vitro Assays to Predict Phototoxicity of Chemicals:(II) Yeast Growth Inhibition Assay and Battery System with Photohemolysis Assay. AATEX 2, 193-202.
- 5) 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) p104-105(1992).

以上

酵母光生育阻害試験プロトコール

1. 目的

本試験法は、酵母を用いて被験物質の光生育阻害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. 対照物質

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。

2) 陽性対照物質

キサントトキシシン(8-methoxypsoralen, ナカライテスク(株))を用いる。

4.2. 器具類

1) 6 ウェルマイクロプレート

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。

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, びん等。

3) 滅菌済み使い捨て器具

ピペット, 遠沈管等

4) 濾紙円板

ペーパーディスク抗生物質検定用, 厚手, 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。

5) ピンセット

6) ノギス

デジタル・キャリパー DC-150P ((株) ミットヨ)を用いる。

7) アルミ箔

8) ビニル袋

4.3. 滅菌

ガラスびん、濾紙円板、ピンセット、アルミ箔および 4.8.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する。

4.4. 機器

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. Honle GmbH 社製, Bulb, 型番 0175), パワーサプライ (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 0298) を装備した SOL500 (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 5468) を用いる。フィルターは H1 フィルター (Dr. Honle 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。

2) 紫外線強度計

UVA の強度測定として、(株) トプコン製の紫外線強度計 (UV-RADIOMETER UVR-3036/S, 表示部型番: UVR-1S, 受光部 (UVA 領域) 型番: UVR-36) を用いる。

3) 孵卵器

25℃に設定できるものを用意する。

4.5. 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。

4.6. 酵母懸濁液の調製

ドライイースト (オリエンタル酵母工業 (株)) に生理食塩液を加えて 2mg/mL の懸濁液を調製する。

4.7. 4%ポテトデキストロース寒天培地含有 6 ウエルマイクロプレートの準備

ポテトデキストロース寒天培地 (極東製菓工業 (株)) 40 g に精製水 1L を加えて溶解する。高圧蒸気滅菌 (121 °C, 20.min) 後、室温にて約 60 °C 位になるまで放置し、固化しないうちに 6 ウエルマイクロプレートの各ウエルに 7mL ずつ分注する。固化したら、転倒して室温下で水蒸気を飛ばし、ビニル袋に入れて室温保存する。

4.8. 1.5%ポテトデキストロース寒天培地の調製

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。

4.9. トップアガーの調製および酵母の播種

保温中の 1.5%ポテトデキストロース寒天培地 1.9 mL に、調製した酵母菌液を 0.1 mL の割合で加え、良く混和する。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 4%ポテトデキストロース寒天培地が添加されている 6 ウエルマイクロプレートに 2mL/well ずつ重層する (落下菌を防ぐためガスバーナーの炎から半径約 30 cm 以内で行う)。この時、プレートをゆすって均一に重層する。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。

4.10. 被験物質溶液の調製

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 倍希釈系列を 4 水準作製する。被験物質の溶媒には、精製水を用いる。被験物質が精製水に溶解しない場合には、エタノール、アセトン、メタノール、DMSO の中から最も高い溶解度を与える溶媒を選択する。

陽性対照物質としてキサントトキシシン (8-methoxypsoralen, ナカライテスク (株)) 0.01% エタノール溶液を調製する。

4.11. 被験物質の添加

6 ウェルマイクロプレート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濾紙円板を必要数並べ、被験物質溶液、被験物質媒体およびキサントトキシシン各 0.02 mL を濾紙円板に滴下する。ピンセットを用いて菌を播種したマイクロプレートの各ウェルの中央に濾紙円板を 1 枚ずつ密着させる (被験物質の濾紙円板への滴下およびウェルへの移動は、落下菌を防ぐためガスバーナーの炎の近くで行う)。

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、1 被験物質あたり 4 枚のマイクロプレートを必要とする。

4.12. 紫外線照射

測定 10 分前に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 ウェルマイクロ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。照射用のマイクロプレートのみ UVA 15.0 J/cm² を照射し、非照射用プレートはアルミホイルで遮光して照射用マイクロプレートの照射が終了するまで室温で放置する。

紫外線強度: A(mW/cm²)

照射時間(S) = [(15.0 × 1000 mJ/cm²)/(A mW/cm²)]

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。

4.13. 培養

照射終了後、照射用および非照射用マイクロプレートを反転させ、孵卵器中で約 72 時間培養する。なお、マイクロ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。

4.14. 阻止帯の測定

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、その平均値から濾紙円板の直径 6 mm を差し引いて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。

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

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。何となく境界が見えてくることがある。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、評価を行う。

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

6. 被験物質の保管場所

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、試薬保管用冷凍庫内デシケーターのいずれかに保管する。

7. 保守・点検

- 1) 紫外線強度計は、1年に1度校正を行う。校正は、(株)トプコン (TEL: 03-5684-2311) に依頼する。
- 2) 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

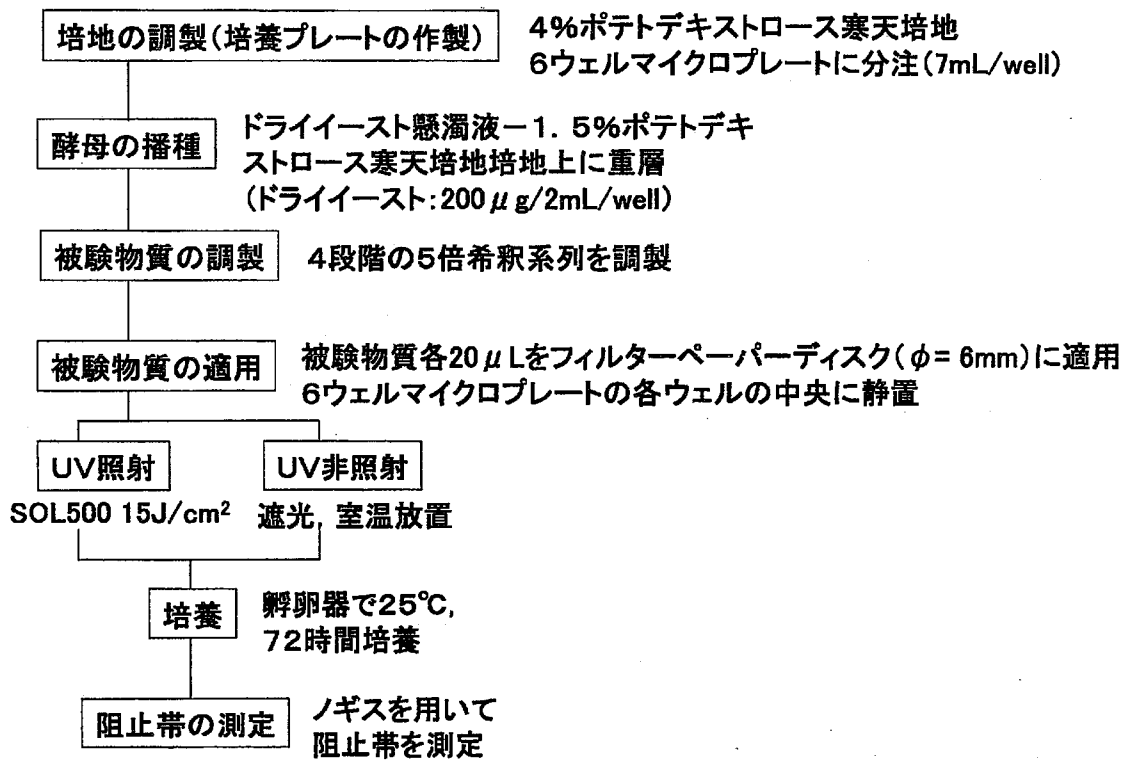
以下の試験記録は、記録保管場所に保管する。

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

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.

酵母光生育阻害試験フローチャート



以上

赤血球光溶血試験プロトコール

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、基底状態に戻る時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、香料の光毒性は感度良く検出される。

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、緩衝液を含む赤血球懸濁液に溶解もしくは均一に分散するものに適用する。

4 材料および実験方法

4. 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 陽性対照物質

アクリジン(SIGMA CHEMICAL CO.)を用いる。

4. 3 赤血球

緬羊無菌保存血を(株)日本生物材料センターより購入

(株)日本生物材料センター(TEL:03-3811-1960)

採血から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. 4 器具類

4. 4. 1 24 ウェルマイクロプレート

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. 4. 2 96 ウェルマイクロプレート

FALCON 社製 No. 3070 を用いる。

4. 4. 3 漏斗

4. 4. 4 脱脂綿

4. 4. 5 ガラス器具

溶液調製用にピペット、三角フラスコ、メスフラスコ、メスシリンダー等。

4. 4. 6 ガラス遠沈管

ジエチルエーテルを使用して完全溶血の調製する場合に必要である。しかし、その他の方法により調製する場合は使用しない。

4. 4. 7 分注器

4. 4. 8 使い捨て器具

ピペット、遠沈管等。

4. 5 機器

4. 5. 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. Honle GmbH 社製, Bulb, 型番 0175), パワーサプライ (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 0298) を装備した SOL500 (Dr. Honle GmbH 社製, 型番 5468) を用いる。フィルターは H1 フィルター (Dr. Honle 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。

4. 5. 2 紫外線強度計

UVA の強度測定として、(株)トプコン製の紫外線強度計 (UV-RADIOMETER UVR-3036/S, 表示部型番: UVR-1S, 受光部 (UVA 領域) 型番: UVR-36) を用いる。

4. 5. 3 冷却高速遠心機

日立高速遠心機 CR20B2 において、マイクロタイターバケットを用いて行う。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. 5. 4 冷却小型遠心機

50mL 遠沈管を適用できることが必要である。さらに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も必要である。

4. 5. 5 遠心エバポレーター

ジエチルエーテルを使用して完全溶血の調製する場合に必要である。しかし、その他の方法により調製する場合は使用しない。

4. 5. 6 マイクロプレートリーダー

BioRad Model 3550 において 540nm のフィルターを使用する。ただし、540nm のフィルターを使用できるものであれば、その他のマイクロプレートリーダーでも使用可能である。

5. 4 塩溶液の調製

- ・生理食塩液: 0.9%(w/v)塩化ナトリウム水溶液
- ・Veronal Buffer: 5,5-ジエチルバルビタール酸 2.88g を約 900mL の精製水に溶解させ、塩化ナトリウム 42.5g と 5,5-ジエチルバルビタール酸ナトリウム 1.88g を加え、さらに精製水を加えて 1L とする。これを保存液として pH7.4 に調製されていることを確認した上で、使用時に 5 倍に精製水にて希釈して用いる。

5. 5 被験物質用液の調製

被験物質は投与可能な最高濃度、もしくは最高溶解濃度を含む 5 倍希釈系列を 4 水準作製する。被験物質の溶媒には、精製水を用いる。被験物質が精製水に溶解しない場合には、エタノール、アセトン、メタノール、DMSO の中から最も高い溶解度を与える溶媒を選択する。

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。

5. 6 赤血球懸濁液の調製

緬羊無菌保存血を脱脂綿で濾過し、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、Veronal Buffer を加えてピペッティングを行い、遠心分離を行う (3000rpm, 5min)。この Veronal Buffer 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、Veronal Buffer 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。

5. 7 完全溶血(100%control)の調製

2.5%(v/v)赤血球懸濁液に等量のジエチルエーテルを加えて混合し、ミキサーにて攪拌後、約 5 分間超音波処理を行う。ほぼ完全に溶血したことを確認し、遠心後 (3000rpm, 5min)、上層のジエチルエーテルをアスピレーターを用いて吸引除去する。完全溶血層は、試験管に分注して遠心エバポレーターを用いて残存したジエチルエーテルを蒸発させる。

あるいは SLS や Triton X-100 などの活性剤添加、凍結融解、過剰精製水添加による溶血などにより調製することもできる。ただし、あらかじめ条件設定が必要である。

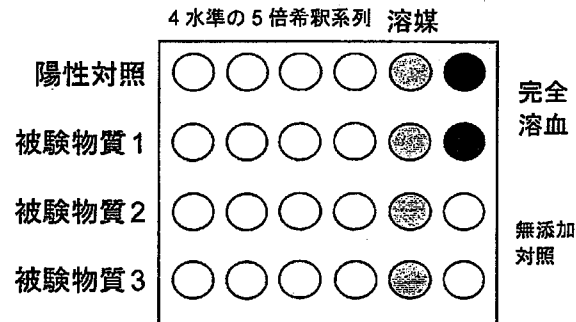
5. 8 被験物質の添加

24 ウェルマイクロ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 μ L を分注器を用いて分注し、被験物質溶液、溶媒または Veronal Buffer 0.01mL を各ウェルに加える。

完全溶血用ウェルには完全溶血各 1mL を分注する。

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)、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。



5. 9 光照射

照射 10 分前に光源のスイッチを入れ、約 10 分放置後、紫外線強度計 (UV-RADIOMETER UVR-3036/S, 楢トプコン製) を用いて 24 ウェルマイクロ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、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 UVA10.0J/cm² を照射する。

紫外線強度: A (mW/cm²)

照射時間 (s) = (10.0 × 1000 mJ/cm²) / (A mW/cm²)

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。

5. 10 溶血度の測定

照射終了後、照射用、非照射用マイクロ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、未溶血の赤血球を取り除く。24 ウェルマイクロプレートの各ウェルから静かに上清を採取し、96 ウェルマイクロプレートの 2 ウェルに 0.1mL 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。

5. 1 1 マイクロプレートリーダーによる測定

マイクロプレートリーダーを用いて、540nm 付近の波長で 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルの吸光度を測定する。光溶血度の算出は、非照射 2 プレートにおける各ウェルの平均を求めたうえで、照射 2 プレートそれぞれについて行いその平均で評価する。

5. 1 2 光溶血度の算出

溶血度の差(L;%)

$$= \text{照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血平均}} - \text{OD}_{\text{無添加対照平均}})] \\ - \text{非照射プレート} [100 \times (\text{OD}_{\text{被験物質添加}} - \text{OD}_{\text{溶媒添加}}) / (\text{OD}_{\text{完全溶血平均}} - \text{OD}_{\text{無添加対照平均}})]$$

6 評価

以下の評価基準に従い、評価を行う。

溶血度の差(L;%)	光毒性の評価	
L < 5	-	光毒性なしと評価
5 ≤ L < 10	±	更なる評価が必要
10 ≤ L	+	光毒性ありと評価

ただし、540nm に吸収を持つ検体の場合の評価には補正を行った上での評価が必要と考えられる。

7 被験物質の保管場所

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。

8 保守・点検

紫外線強度計は、1年に1度校正を行う。校正は、㈱トプコン(TEL:03-5684-2311)に依頼する。

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。

9 記録の保管

以下の試験記録は、記録保管場所に保管する。

①赤血球光溶血試験条件等記録

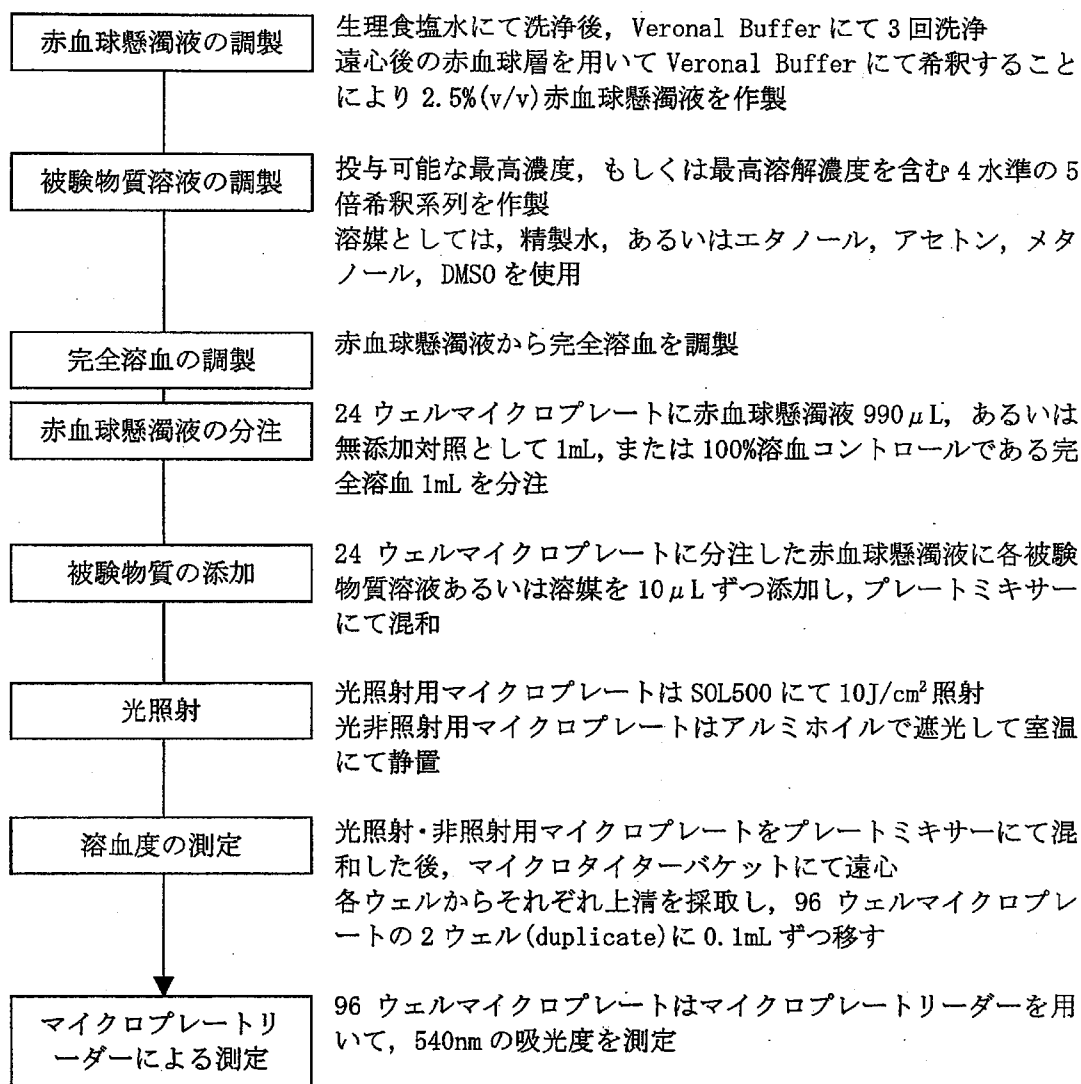
- ②試薬・被験物質管理記録
- ③注射用水・生理食塩液管理記録
- ④赤血球光溶血試験判定記録
- ⑤Veronal Buffer 作製・使用記録
- ⑥血液管理記録
- ⑦太陽光シミュレーション装置使用記録
- ⑧紫外線強度計使用記録

10 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.

以上

赤血球光溶血試験フローチャート



被験物質リスト

1:規格等

名称	供給者*1	Lot. No	純度・規格*2
香料(8)			
Musk Ambrette	8	LG85	-
Musk Ketone	8	JAN0102	99%≦
Musk Xylene	8	JAN0102	-
Phantolid	9	9162	95%≦
Galaxolide(50% in diethyl phthalate)	10	MMF3139	50%
8-Methoxy Psoralen(8-MOP)	1	MOB1369	99%(GC)
5-Methoxy Psoralen(5-MOP)	3	16212DU	99%
6-Methyl Coumarin(6-MC)	4	TCR3659	97%≦(GC)
紫外線吸収剤(5)			
4-5-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane(Parsol 1789)	11	9000430543	99%≦
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate(Parsol MCX)	11	900043609	98%≦
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone(ASL-24)	12	1981	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid(ASL-24S)	12	1955	-
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate(Escalol 507)	13	802192	98%≦
薬剤(4)			
Sulfanilamide	1	M1R9306	99.7%(T)
Indomethacin	2	61K1368	99%≦(TLC)
Piroxicam	2	126H0820	-
Chlorpromazine HCl(CPZ)	1	M9M3389	特級
抗生物質(4)			
3,4,4'-Trichlorocarbanilide(TCC)	3	04114LZ	99%
Bithionol	2	119H1503	99%≦
3,5,4'-Tribromosalicylanilide(TBS)	5	AP01	98%<(T)
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	6	A009656801	98.5%<(UV-VIS)
染料(3)			
Rose Bengal	7	SEPT2001	-
Acridine	2	124H2511	-
Anthracene	1	M1E6969	99%(GC)

*1

- 1: ナカライテスク株式会社
- 2: Sigma Chemical Co.
- 3: Aldrich Chemical Company, Inc.
- 4: 和光純薬工業株式会社
- 5: 東京化成工業株式会社
- 6: Acros Organics N.V.
- 7: Chroma-Gesellschaft mbH & Co.
- 8: GIVAUDAN S. A.
- 9: PFW Aromachemicals B.V.
- 10: International Flavors&Fragrances
- 11: ロシュ・ビタミン・ジャパン株式会社
- 12: 湘南化学工業株式会社
- 13: 太陽化学株式会社

*2

- TLC: 薄層クロマトグラフィー
T: 容量分析
GC: ガスクロマトグラフィー

被験物質リスト
2: 特性等

名称	CAS number	分子量	組成式	融点	性状	溶解性
香料 (8)						
Musk Ambrette	83-66-9	268.3	C13H16N2O5	84-86	黄色粉末状結晶	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
Musk Ketone	81-14-1	294.3	C14H18N2O5	134.5-136.5	白色微細結晶	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
Musk Xylene	81-15-2	297.3	C12H15N3O6	114	白色微細結晶	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
Phantolid	15323-35-0	244.4	C17H24O	35-40	白色微細結晶	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
Galaxolide (50% in diethyl phthalate)	1222-05-5	258.4	C18H26O	148	無色透明液体	水に難溶, DEP などエタノール類に可溶
8-Methoxy Psoralen (8-MOP)	298-81-7	216.2	C12H8O4	191-193	微黄白色微細針状結晶	エタノールに可溶
5-Methoxy Psoralen (5-MOP)	484-20-8	216.2	C12H8O4	74-77	白色針状結晶	エタノールに可溶
6-Methyl Coumarin (6-MC)	92-48-8	160.2	C10H8O2		白色微細結晶	水に難溶, エタノールに可溶
紫外線吸収剤 (5)						
4-5-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (Parsol 1789)	70356-09-1	310.4	C20H22O3	81-84	薄褐色粉末	水に難溶, 油に可溶
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	5466-77-3	290.4	C18H26O3	<-25	無色透明液体	エタノールに可溶
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (ASL-24)	131-57-5	228.2	C14H12O3	60-66	薄黄色微細結晶	有機溶媒に可溶
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (ASL-24S)	4065-45-6	308.4	C14H12O6S	108	薄黄色粉末	水・エタノールに可溶
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (Escalol 507 (D))	21245-02-3	277.4	C17H27N02		薄黄色液体	水に難溶, 有機溶媒に可溶
薬剤 (4)						
Sulfanilamide	63-74-1	172.2	C6H8N2O2S	165-166	白色粉末	エタノールに可溶
Indomethacin	53-86-1	357.8	C19H16ClN04	155	白色微細結晶	エタノールに可溶
Piroxicam	36322-90-4	331.3	C15H13N3O4S	201	白色微細粉末	エタノールに可溶
Chlorpromazine HCl (CPZ)	69-09-0	355.3	C17H19ClN2S·HCl	194-198	白色粉末	水・エタノールに可溶
抗生物質 (4)						
3, 4, 4'-Trichlorocarbanilide (TCC)	101-20-2	315.6	C13H9Cl3N2O	254-256	白色粉末	水に難溶, 有機溶媒に可溶
Bithionol	97-18-7	356.1	C12H6Cl4O2S	185.5-186.5	白色粉末	水に難溶, 有機溶媒に可溶
3, 5, 4'-Tribromosalicylanilide (TBS)	87-10-5	449.9	C13H8Br3NO2	227-228	薄褐色粉末	水に難溶, 有機溶媒に可溶
3, 3', 4', 5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	1154-59-2	351.0	C13H7Cl4NO2	162	白色粉末	水に難溶, 有機溶媒に可溶
染料 (3)						
Rose Bengal	632-69-9	1017.6	C20H2Cl4I4Na2O5	300<	赤色粉末	水・エタノールに可溶
Acridine	260-94-6	179.2	C13H9N	107-110	薄黄色微細結晶	水に難溶, 有機溶媒に可溶
Anthracene	120-12-7	178.2	C14H10	216-218	白色薄片	水に難溶, 有機溶媒に可溶

被験物質の *in vivo* 試験結果

被験物質	溶媒	<i>in vivo</i> 誘発濃度 (%)	評価点	判定*
Musk Ambrette	Diethyl phthalate	20	0.0	-
Musk Ketone	Diethyl phthalate	20	0.0	-
Musk Xylene	Diethyl phthalate	20	0.0	-
Phantolid	Diethyl phthalate	20	2.0	+
Galaxolide (50% in diethyl phthalate)	Ethanol	70	1.4	+
8-Methoxy psoralen (8-MOP)	Ethanol	0.02	4.8	+
5-Methoxy psoralen (5-MOP)	Ethanol	0.025	2.7	+
6-Methylcoumarin (6-MC)	Ethanol	1	0.0	-
4-t-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (Parsol 1789)	castor oil	10	0.0	-
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	Ethanol	20	0.0	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (ASL-24)	Acetone	10	0.0	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (ASL-24S)	Water	10	0.0	-
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (Escalol 507 (D))	Ethanol	20	1.0	±
Sulfanilamide	Methanol	20	0.0	-
Indomethacin	Ethanol	1	0.0	-
Piroxicam	Ethanol	5	0.0	-
Chlorpromazine HCl (CPZ)	Water	50	1.6	+
3,4,4'-Trichlorocarbaniilide (TCC)	DPG	5	0.0	-
Bithionol	Acetone	1	0.0	-
3,4',5-Tribromosalicylanilide (TBS)	Acetone	1	0.0	-
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	Acetone	1	1.5	+
Rose Bengal	Water	1	0.0	-
Acridine	Acetone	1	2.1	+
Anthracene	Acetone	0.5	1.8	+

*: 判定; 評価点 0.0~0.5:-, 0.6~1.2:±, 1.3≤:+

被験物質の *in vitro* 試験結果

被験物質	<i>in vitro</i>			<i>in vivo</i> モルモット
	酵母光生育阻害試験	赤血球光溶解試験	Battery system	
Musk Ambrette	-	-	-	-
Musk Ketone	-	-	-	-
Musk Xylene	-	-	-	-
Phantolid	+	+	+	+
Galaxolide(50% in diethyl phthalate)	-	+	+	+
8-Methoxypsoralen(8-MOP)	+	-	+	+
5-Methoxypsoralen(5-MOP)	+	-	+	+
6-Methylcoumarin(6-MC)	+	+	+	+
4-t-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (Parsol 1789)	-	-	-	-
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	-	-	-	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (ASL-24)	-	-	-	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid. (ASL-24S)	-	-	-	-
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate(Escalol 507(D))	+	-	+	+
Sulfanilamide	-	-	-	-
Indomethacin	-	-	-	-
Piroxicam	-	-	-	-
Chlorpromazine HCl (CPZ)	-	+	+	+
3, 4, 4'-Trichlorocarbaniilide (TCC)	-	-	-	-
Bithionol	-	+	+	-
3, 4', 5-Tribromosalicylanilide (TBS)	-	+	+	-
3, 3', 4', 5-Tetrachlorosalicylanilide (TCSA)	+	+	+	+
Rose Bengal	+	+	+	-
Acridine	+	+	+	+
Anthracene	+	±	+	+
<i>in vivo</i> 試験との一致率 (%)				81
<i>in vitro</i>				71
81				81

酵母光生育阻害試験結果のまとめ

被験物質名	濃度 (mg/mL)	1回目		2回目		3回目		4回目		平均	今回 総合評価
		阻止帯の 差(mm)	評価	阻止帯の 差(mm)	評価	阻止帯の 差(mm)	評価	阻止帯の 差(mm)	評価	阻止帯の 差(mm)	
Musk Ambrette	500	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.6	+	9.0	+	6.4	+	6.3	+	7.6	
Musk Ketone	300	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	60	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	12	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	2.4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.8	+	8.5	+	6.4	+	6.6	+	7.6	
Musk Xylene	300	2.4	-	2.9	-	1.9	-	2.0	-	2.3	-
	60	2.9	-	3.1	-	2.5	-	2.4	-	2.7	
	12	3.7	-	3.2	-	3.1	-	2.8	-	3.2	
	2.4	4.5	-	3.1	-	3.1	-	3.4	-	3.5	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	7.9	+	7.4	+	5.3	+	5.3	+	6.5	
Phantolid	500	4.5	-	4.0	-	4.6	-	5.2	+	4.6	+
	100	6.0	+	6.4	+	6.3	+	6.5	+	6.3	
	20	6.6	+	7.4	+	7.1	+	6.3	+	6.9	
	4	6.9	+	6.8	+	0	-	7.1	+	5.2	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	9.8	+	7.8	+	8.4	+	8.0	+	8.5	
Galaxolide	原体	5.1	+	4.7	-	2.9	-	4.9	-	4.4	-
	200	4.7	-	4.5	-	2.9	-	2.9	-	3.8	
	40	4.1	-	4.0	-	2.5	-	2.1	-	3.2	
	8	3.8	-	3.0	-	2.6	-	3.1	-	3.1	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	9.5	+	8.9	+	8.2	+	7.3	+	8.5	
8-MOP	10	14.1	+	14.3	+	12.8	+	13.5	+	13.7	+
	2	13.2	+	13.4	+	15.6	+	15.6	+	14.5	
	0.4	11.2	+	10.9	+	10.2	+	9.9	+	10.6	
	0.08	8.4	+	8.6	+	7.6	+	8.3	+	8.2	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.9	+	9.2	+	7.4	+	7.3	+	8.2	
5-MOP	10	12.4	+	11.8	+	9.3	+	11.1	+	11.2	+
	2	12.2	+	11.8	+	10.1	+	10.3	+	11.1	
	0.4	12.0	+	11.8	+	9.3	+	9.8	+	10.7	
	0.08	9.1	+	9.2	+	7.9	+	8.8	+	8.8	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.5	+	8.4	+	7.7	+	6.6	+	7.8	
6-MC	100	5.7	+	5.0	+	4.7	-	6.6	+	5.5	+
	20	5.1	+	4.9	-	5.6	+	5.1	+	5.2	
	4	4.5	-	4.5	-	5.4	+	3.1	-	4.4	
	0.8	1.1	-	0.9	-	0	-	0	-	0.5	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	8.1	+	8.4	+	8.2	+	6.8	+	7.9	
Parsol 1789	100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	0.8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	9.4	+	9.4	+	7.9	+	8.2	+	8.7	
Parsol MCX	原体	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	200	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	40	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	10.9	+	10.9	+	7.1	+	6.8	+	8.9	
ASL-24	50	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	0.4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	9.7	+	9.3	+	7.6	+	6.9	+	8.4	
ASL-24S	50	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	10	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	0.4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	注射用水	0	-	0	-	0	-	0	-	0	
	陽性対照	6.7	+	6.9	+	7.0	+	7.0	+	6.9	

Escalol 507	原体	5.6	+	5.0	+	5.7	+	6.6	+	5.7	+	+
	200	4.3	-	4.2	-	2.9	-	4.3	-	3.9	-	
	40	3.7	-	3.8	-	2.5	-	3.0	-	3.3	-	
	8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	6.3	+	6.4	+	6.1	+	6.2	+	6.3	+	
Sulfanilamide	50	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
	10	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Methanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.1	+	7.2	+	7.0	+	6.4	+	7.2	+	
Indomethacin	10	4.8	-	5.3	+	4.6	-	4.9	-	4.9	-	-
	2	4.7	-	4.6	-	4.5	-	4.3	-	4.5	-	
	0.4	4.4	-	3.7	-	3.7	-	2.2	-	3.5	-	
	0.08	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Ethanol	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	9.6	+	10.0	+	7.6	+	6.4	+	8.4	+	
Piroxicam	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.16	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.8	+	9.1	+	6.6	+	5.7	+	7.6	+	
CPZ	50	0.5	-	0.4	-	0.3	-	0.9	-	0.5	-	-
	10	3.2	-	2.9	-	2.5	-	2.8	-	2.9	-	
	2	5.3	+	5.3	+	4.2	-	3.6	-	4.6	-	
	0.4	3.1	-	3.5	-	1.7	-	2.6	-	2.7	-	
	注射用水	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	9.1	+	8.1	+	6.4	+	6.0	+	7.4	+	
TOC	20	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
	4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	0.16	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	5.1	+	6.0	+	5.6	+	5.2	+	5.5	+	
Bithionol	200	3.6	-	3.5	-	2.5	-	2.2	-	3.0	-	-
	40	3.9	-	3.6	-	2.5	-	3.0	-	3.3	-	
	8	4.3	-	3.3	-	2.6	-	2.1	-	3.1	-	
	1.6	4.7	-	3.9	-	2.3	-	3.6	-	3.6	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.0	+	8.1	+	9.0	+	7.5	+	8.2	+	
TBS	50	5.1	+	4.9	-	3.2	-	3.9	-	4.3	-	-
	10	4.6	-	3.9	-	3.6	-	3.7	-	4.0	-	
	2	4.3	-	3.2	-	4.0	-	3.4	-	3.7	-	
	0.4	3.7	-	3.4	-	2.7	-	3.5	-	3.3	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.5	+	7.2	+	7.2	+	7.1	+	7.5	+	
TCSA	50	6.7	+	7.0	+	4.9	-	5.7	+	6.1	+	+
	10	6.2	+	6.3	+	5.7	+	5.2	+	5.9	+	
	2	5.8	+	5.4	+	5.9	+	4.4	-	5.4	+	
	0.4	5.1	+	5.3	+	3.8	-	4.6	-	4.7	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	8.2	+	8.1	+	8.8	+	6.3	+	7.9	+	
Rose Bengale	10	11.3	+	11.2	+	12.2	+	12.5	+	11.8	+	+
	2	8.6	+	9.0	+	9.9	+	10.5	+	9.5	+	
	0.4	5.2	+	5.9	+	6.7	+	4.9	-	5.7	+	
	0.08	4.7	-	4.8	-	3.4	-	5.1	+	4.5	-	
	DMSO	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	6.8	+	7.8	+	6.2	+	6.3	+	6.8	+	
Acridine	100	5.7	+	5.4	+	4.0	-	5.9	+	5.3	+	+
	20	4.4	-	6.5	+	5.4	+	5.2	+	5.4	+	
	4	6.1	+	7.3	+	6.9	+	6.2	+	6.6	+	
	0.8	6.3	+	6.0	+	5.1	+	5.7	+	5.8	+	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	6.0	+	6.3	+	7.0	+	6.8	+	6.5	+	
Anthracene	10	5.5	+	4.8	-	3.2	-	6.2	+	4.9	-	+
	2	5.4	+	5.5	+	4.6	-	4.5	-	5.0	+	
	0.4	4.7	-	4.5	-	5.3	+	4.3	-	4.7	-	
	0.08	4.9	-	5.2	+	4.4	-	5.0	+	4.9	-	
	Acetone	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	
	陽性対照	5.5	+	5.5	+	6.1	+	5.9	+	5.8	+	

陽性対照には、0.1mg/mL 8-MOPを用いた。阻止帯5 mm以上で陽性(+)とした。

赤血球光溶血試験結果のまとめ

各被験物質における生データ

香料(8)	最終濃度	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
Musk Ambrette	5000 μ g/mL	-1.5	-0.2	-0.2	-0.6	0.8
	1000 μ g/mL	-0.3	1.0	1.9	0.9	1.1
	200 μ g/mL	0.5	1.1	2.7	1.4	1.2
	40 μ g/mL	0.7	1.9	3.1	1.9	1.2
Musk Ketone	5000 μ g/mL	-0.4	-0.9	-0.5	-0.6	0.3
	1000 μ g/mL	-0.4	-2.6	-1.1	-1.4	1.2
	200 μ g/mL	-0.2	-0.3	-0.1	-0.2	0.1
	40 μ g/mL	0.2	-0.2	0.1	0.0	0.2
Musk Xylene	3000 μ g/mL	-0.3	-2.8	-4.4	-2.5	2.0
	600 μ g/mL	-0.1	0.0	0.2	0.1	0.1
	120 μ g/mL	0.4	-0.2	0.3	0.2	0.3
	24 μ g/mL	0.4	0.3	-0.1	0.2	0.3
Phantolid	5000 μ g/mL	6.2	2.6	2.2	3.7	2.2
	1000 μ g/mL	93.9	75.8	95.2	88.3	10.8
	200 μ g/mL	96.4	85.4	99.3	93.7	7.4
	40 μ g/mL	96.6	29.3	96.6	74.2	38.9
Galaxolide(50% in diethyl phthalate)	1%	-0.8	1.0	1.9	0.7	1.4
	20000 μ g/mL	13.5	5.7	3.7	7.6	5.2
	4000 μ g/mL	95.4	25.3	45.5	55.4	36.1
	800 μ g/mL	96.2	11.3	43.5	50.3	42.8
8-Methoxypsoralen(8-MOP)	100 μ g/mL	0.0	-0.5	-0.5	-0.3	0.3
	20 μ g/mL	-0.4	-0.1	-0.1	-0.2	0.2
	4 μ g/mL	0.0	-0.3	-0.2	-0.2	0.1
	0.8 μ g/mL	0.1	-0.3	-0.9	-0.4	0.5
5-Methoxypsoralen(5-MOP)	100 μ g/mL	0.1	-0.1	-0.5	-0.2	0.3
	20 μ g/mL	-0.3	-0.3	-0.1	-0.2	0.1
	4 μ g/mL	0.0	-0.2	-0.2	-0.1	0.1
	0.8 μ g/mL	0.1	-0.6	-0.1	-0.2	0.4
6-Methylcoumarin(6-MC)	1000 μ g/mL	18.1	24.5	17.1	19.9	4.0
	200 μ g/mL	-1.0	-0.9	-0.5	-0.8	0.3
	40 μ g/mL	-0.4	-0.6	-0.3	-0.4	0.1
	8 μ g/mL	-0.1	-0.2	0.0	-0.1	0.1
紫外線吸収剤(5)		1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
4-5-Butyl-4-methoxydibenzoylmethane (Parsol 1789)	200 μ g/mL	-0.1	0.2	-0.8	-0.2	0.5
	40 μ g/mL	0.0	0.2	-0.8	-0.2	0.5
	8 μ g/mL	0.0	0.3	-1.0	-0.3	0.7
	1.6 μ g/mL	0.3	0.2	-1.1	-0.2	0.8
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	1%	0.0	0.2	-0.1	0.0	0.2
	20000 μ g/mL	-0.2	0.3	0.1	0.0	0.2
	4000 μ g/mL	1.3	0.7	-0.2	0.6	0.8
	800 μ g/mL	-1.1	0.6	0.6	0.0	1.0
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (ASL-24)	500 μ g/mL	3.9	3.0	2.7	3.2	0.6
	100 μ g/mL	2.8	3.5	3.7	3.3	0.5
	20 μ g/mL	-0.1	-0.7	0.2	-0.2	0.5
	4 μ g/mL	0.0	0.0	-0.1	0.0	0.0
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (ASL-24S)	500 μ g/mL	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1
	100 μ g/mL	0.0	0.1	-0.2	0.0	0.1
	20 μ g/mL	0.2	-0.4	0.0	-0.1	0.3
	4 μ g/mL	0.1	0.1	-0.4	-0.1	0.2
2-Ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate (Escalol 507 (D))	1%	0.1	-0.1	-0.3	-0.1	0.2
	20000 μ g/mL	-0.3	-0.3	-0.2	-0.3	0.1
	4000 μ g/mL	3.0	3.5	1.7	2.7	0.9
	800 μ g/mL	2.4	3.7	1.2	2.4	1.3
薬剤(4)		1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
Sulfanilamide	500 μ g/mL	-0.2	-0.6	-0.3	-0.4	0.2
	100 μ g/mL	-0.1	-0.3	-0.3	-0.2	0.1
	20 μ g/mL	0.0	-0.3	-0.2	-0.2	0.1
	4 μ g/mL	0.1	-0.3	-0.2	-0.1	0.2
Indomethacin	100 μ g/mL	-0.3	1.2	0.0	0.3	0.8
	20 μ g/mL	-0.1	1.1	-0.1	0.3	0.7
	4 μ g/mL	0.2	1.3	-0.1	0.5	0.8
	0.8 μ g/mL	0.0	1.1	-0.1	0.3	0.6
Piroxicam	200 μ g/mL	-0.6	-0.9	-0.9	-0.8	0.2
	40 μ g/mL	-0.3	-0.4	-0.7	-0.4	0.2
	8 μ g/mL	-0.3	-0.1	-0.5	-0.3	0.2
	1.6 μ g/mL	-0.1	0.0	-0.4	-0.2	0.2
Chlorpromazine HCl (CPZ)	500 μ g/mL	-37.3	-30.0	-22.6	-30.0	7.4
	100 μ g/mL	11.6	20.6	13.2	15.1	4.8
	20 μ g/mL	-0.2	-0.3	0.9	0.2	0.7
	4 μ g/mL	-0.4	-0.6	-0.5	-0.5	0.1

各被験物質における生データ(続き)						
抗生物質(4)	最終濃度	1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
3,4,4'-Trichlorocarbanilide(TCC)	200 μ g/mL	0.4	2.3	1.8	1.5	1.0
	40 μ g/mL	0.3	0.4	0.6	0.4	0.1
	8 μ g/mL	-0.8	1.1	1.5	0.6	1.2
	1.6 μ g/mL	0.2	0.5	0.4	0.4	0.2
Bithionol	2000 μ g/mL	-3.1	4.7	48.8	16.8	28.0
	400 μ g/mL	-14.0	-19.5	6.7	-8.9	13.8
	80 μ g/mL	-6.9	3.7	41.9	12.9	25.6
	16 μ g/mL	-14.5	34.1	18.6	22.4	10.4
3,5,4'-Tribromosalicylanilide(TBS)	500 μ g/mL	16.7	56.2	17.3	30.1	22.6
	100 μ g/mL	-1.5	-0.1	0.0	-0.6	0.8
	20 μ g/mL	-0.6	-0.6	-0.2	-0.5	0.2
	4 μ g/mL	-0.2	-0.2	-0.1	-0.2	0.0
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	500 μ g/mL	29.1	53.2	18.7	33.7	17.7
	100 μ g/mL	4.5	3.9	3.2	3.9	0.7
	20 μ g/mL	1.7	3.3	1.0	2.0	1.2
	4 μ g/mL	0.2	0.0	-0.5	-0.1	0.3
染料(3)		1回目	2回目	3回目	平均値	標準偏差
Rose Bengal	100 μ g/mL	27.1	37.5	33.1	32.6	5.2
	20 μ g/mL	46.0	60.6	48.6	51.7	7.8
	4 μ g/mL	51.6	76.0	53.0	60.2	13.7
	0.8 μ g/mL	41.5	48.8	32.4	40.9	8.2
Acridine	1000 μ g/mL	73.4	77.7	53.7	68.3	12.8
	200 μ g/mL	80.0	81.4	65.4	75.6	8.9
	40 μ g/mL	15.3	12.3	11.9	13.1	1.9
	8 μ g/mL	6.6	4.6	5.2	5.5	1.0
Anthracene	100 μ g/mL	4.0	2.9	2.9	3.2	0.6
	20 μ g/mL	3.2	2.2	2.3	2.6	0.6
	4 μ g/mL	3.2	0.2	1.7	1.7	1.5
	0.8 μ g/mL	6.4	5.4	5.3	5.7	0.6

1) Battery systemにおける感度, 特異性, 予測性, 一致率

Parameter*	
感度	100%
特異性	73%
予測性(+)	69%
予測性(-)	100%
一致率	81%
偽陰性	なし

*: Balls *et al.*, (1990)

Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. ATLA, 18, 313-337

1) Battery systemの特徴 (適用範囲, 偽陽性, 偽陰性)

<i>in vivo</i> Battery system	+	±	-
+	TCSA Acridine CPZ 5-MOP	Escalol 507 (D)	Bithionol TBS 6-MC Rose Bengal
	8 化学物質	1 化学物質	4 化学物質
±	なし	なし	なし
-	なし	なし	TCC Sulfanilamide Indomethacin Piroxicam Parsol 1789 Parsol MCX ASL-24 ASL-24S Musk Ambrette Musk Ketone Musk Xylene
	なし	なし	1 1 化学物質

2) 酵母光生育阻害試験における感度, 特異性, 予測性, 一致率

Parameter*	
感度	78%
特異性	87%
予測性(+)	78%
予測性(-)	87%
一致率	81%
偽陰性	Galaxolide CPZ

*: Balls *et al.*, (1990)

Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. ATLA, 18, 313-337

2) 酵母光生育阻害試験法の特徴 (適用範囲, 偽陽性, 偽陰性)

<i>in vivo</i> 酵母光生育阻害試験	+	±	-
+	Phantolid 5-MOP Acridine	Escalol 507 (D)	6-MC Rose Bengal
	6 化学物質	1 化学物質	2 化学物質
-	Galaxolide CPZ	なし	Musk Ambrette Musk Xylene Parsol MCX ASL-24S Indomethacin TCC TBS Musk Ketone Parsol 1789 ASL-24 Sulfanilamide Piroxicam Bithionol
	2 化学物質		1 3 化学物質

3) 赤血球光溶血試験における感度, 特異性, 予測性, 一致率

Parameter*	
感度	67%
特異性	73%
予測性(+)	60%
予測性(-)	79%
一致率	71%
偽陰性	8-MOP
	5-MOP

*: Balls *et al.*, (1990)

Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on the validation of toxicity test procedures. ATLA, 18, 313-337

3) 赤血球光溶解試験法の特徴 (適用範囲, 偽陽性, 偽陰性)

<i>in vivo</i> 赤血球光溶解試験	+	±	-
+	TCSA Acridine CPZ Phantolid Galaxolide 5 化学物質		Bithionol TBS 6-MC Rose Bengal 4 化学物質
±	Anthracene 1 化学物質	なし	なし
-	8-MOP 5-MOP 2 化学物質	Escalol 507(D) 1 化学物質	TCC ASL-24 ASL-24S Sulfanilamide Musk Ambrette Indomethacin Musk Ketone Piroxicam Musk Xylene Parsol 1789 Parsol MCX 1 1 化学物質

酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の再現性について

今回、提案する酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験の組合せによる光毒性評価方法は、弊社が独自に開発した方法のため施設間バリデーションは実施していない。しかし、弊社では、本評価法については、施設内の評価を終え、化粧品原料の日常保証に活用している。ただし、本評価法の施設内再現性を示すデータについて、過去からの実績をしめすことは検討した開発原料の関係もあり非常に困難である。

よって、今回の酵母光生育阻害試験及び赤血球光溶血試験における個々の陽性対照物質の値から、施設内再現性を説明する。

1) 酵母光生育阻害試験における陽性対照物質の再現性

陽性対照物質：0.01%8-MOP エタノール溶液

酵母光生育阻害試験においては、被験物質毎に陽性対照物質を置く試験系であり、1被験物質につき4回の試験を行っているため、24被験物質では計96の結果が得られている。各被験物質の阻止帯の平均径(mm)の平均は7.5(5.5~8.9)、標準偏差の平均は1.32(0.13~2.28)、変動係数の平均は0.176(0.021~0.220)であった。この値は、眼刺激性試験代替法の開発を目的とした厚生科学研究班のバリデーションにおける血清培地を用いる4種細胞毒性試験の変動係数の平均が0.292(0.239~0.324)であることを考慮すると、¹⁾本試験法の再現性は高いものと考えられる。(詳細は別紙参照)

2) 赤血球光溶血試験における陽性対照物質の再現性

陽性対照物質：Acridine(8, 40, 200, 1000 μ g/mL)

赤血球光溶血試験においては、試験実施日毎に陽性対照物質(4濃度)を置く試験系であり、27回の試験実施のため濃度毎に27の結果が得られている。各濃度における変動係数は、0.304(8 μ g/mL)、0.203(40 μ g/mL)、0.285(200 μ g/mL)、0.247(1000 μ g/mL)、さらにその平均は0.260であった。本試験法も上記厚生科学研究班の4種細胞毒性試験の変動係数の値と同等以上であり、本試験法の再現性は高いものと考えられる。(詳細は別紙参照)

参考文献

1. Y. Ohno, et al., Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize score for the evaluation of the test, *Toxicology in Vitro*, 13, 73-98 (1999).

1) 酵母光生育阻害試験における陽性対照物質 (8-MOP, 0.01%エタノール溶液) による評価結果の再現性

被験物質	1回目	2回目	3回目	4回目	阻止帯 (mm) の平均	標準偏差	変動係数
Musk Ambrette	8.6	9.0	6.4	6.3	7.6	1.42	0.188
Musk Ketone	8.8	8.5	6.4	6.6	7.6	1.25	0.165
Musk Xylene	7.9	7.4	5.3	5.3	6.5	1.37	0.212
Phantolid	9.8	7.8	8.4	8.0	8.5	0.90	0.106
Galaxolide	9.5	8.9	8.2	7.3	8.5	0.95	0.112
8-MOP	8.9	9.2	7.4	7.3	8.2	0.99	0.121
5-MOP	8.5	8.4	7.7	6.6	7.8	0.88	0.112
6-MC	8.1	8.4	8.2	6.8	7.9	0.73	0.092
Parsol 1789	9.4	9.4	7.9	8.2	8.7	0.79	0.090
Parsol MCX	10.9	10.9	7.1	6.8	8.9	2.28	0.256
ASL-24	9.7	9.3	7.6	6.9	8.4	1.34	0.160
ASL-24S	6.7	6.9	7.0	7.0	6.9	0.14	0.020
Escalol 507 (D)	6.3	6.4	6.1	6.2	6.3	0.13	0.021
Sulfanilamide	8.1	7.2	7.0	6.4	7.2	0.70	0.098
Indomethacin	9.6	10.0	7.6	6.4	8.4	1.70	0.202
Piroxicam	8.8	9.1	6.6	5.7	7.6	1.66	0.220
CPZ	9.1	8.1	6.4	6.0	7.4	1.45	0.196
TCC	5.1	6.0	5.6	5.2	5.5	0.41	0.075
Bithionol	8.0	8.1	9.0	7.5	8.2	0.62	0.077
TBS	8.5	7.2	7.2	7.1	7.5	0.67	0.089
TCSA	8.2	8.1	8.8	6.3	7.9	1.08	0.137
Rose Bengal	6.8	7.8	6.2	6.3	6.8	0.73	0.108
Acridine	6.0	6.3	7.0	6.8	6.5	0.46	0.070
Anthracene	5.5	5.5	6.1	5.9	5.8	0.30	0.052
阻止帯 (mm) の平均	8.2	8.1	7.1	6.6	7.5		
標準偏差	1.46	1.31	0.98	0.74		1.32	
変動係数	0.178	0.162	0.138	0.112			0.176

2) 赤血球光溶血試験における陽性対照物質 (Acridine) による評価結果の再現性

試験実施日	1000 μ g/mL	200 μ g/mL	40 μ g/mL	8 μ g/mL
2002年9月19日	65.4	64.2	14.6	5.8
2002年9月19日	60.9	65.8	14.7	5.9
2002年9月19日	68.5	73.2	17.1	7.2
2002年9月19日	66.2	68.0	16.8	7.4
2002年9月20日	59.3	69.9	14.5	7.1
2002年9月20日	62.2	71.6	15.3	6.2
2002年9月20日	64.7	68.3	18.4	8.9
2002年9月20日	65.0	70.1	18.3	8.1
2002年9月28日	72.7	78.2	10.4	3.3
2002年9月28日	73.4	79.1	11.5	4.8
2002年9月28日	51.9	64.1	10.0	3.7
2002年9月28日	52.1	58.4	10.1	3.9
2002年9月29日	67.0	76.5	11.6	3.5
2002年9月29日	66.1	74.2	11.7	5.6
2002年9月29日	27.9	25.3	8.6	2.2
2002年9月29日	39.4	29.7	9.4	2.9
2002年9月30日	45.5	50.0	10.8	4.2
2002年9月30日	60.2	61.2	11.5	4.6
2002年9月30日	53.7	65.4	11.9	5.2
2002年9月30日	59.9	60.7	13.4	6.7
2002年10月1日	16.9	17.8	12.1	4.5
2002年10月1日	32.6	23.7	11.9	5.2
2002年10月1日	49.9	56.5	12.5	5.1
2002年10月1日	51.5	46.4	13.3	6.2
2002年10月2日	67.2	71.6	14.3	6.4
2002年10月2日	66.4	66.6	14.2	6.5
2002年10月9日	66.8	66.0	11.5	4.2
溶血度の差の平均	56.8	60.1	13.0	5.4
標準偏差	14.00	17.15	2.63	1.64
変動係数	0.247	0.285	0.203	0.304

