

化粧品・医薬部外品の安全性評価に 光毒性試験代替法（3T3 NRU PT）を活用するためのガイダンス（案）

光毒性は、皮膚に化学物質を適用した場合、光（紫外線または紫外線及び可視光）照射が加わることで生ずる皮膚刺激反応である。光毒性の評価には、従来から、動物を用いた試験法が用いられている。すなわち、動物の皮膚に被験物質を塗布し、光照射部位と非照射部位を設定し、光照射後に生じた皮膚反応を非照射部位の反応と比較することで光毒性の有無を判定する試験法である。

光毒性試験に関する *in vitro* の試験法では、培養細胞を用いた試験法が EU において研究開発され¹⁻⁴⁾、2004年に OECD テストガイドライン 432 (OECD Guideline for Testing of Chemicals, 432: *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test)⁵⁾ として採択されている。現在、本試験法が、化学物質の光毒性の有無を検出する試験法として世界的に広く受け入れられている。また、この試験法は、特に感受性 (Sensitivity) の高い試験法としても認識されている。

本試験法は、日本においても、厚生労働科学研究班研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」において検討され光毒性の有無を検出するための *in vitro* 光毒性試験としての妥当性が検証されている⁶⁾。さらに厚生労働科学研究班である「医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会」（あり方検討会）の光関連毒性試験分科会⁷⁾においても議論され、光毒性に関する申請資料に利用することが可能とされている。

本ガイダンスにおいては、*in vitro* 光毒性試験としての本試験法の利用促進に向けて、OECD テストガイドライン 432 の概要及び留意すべき点を解説し、医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請として本試験を用いることを提案する。

1. 試験法の概要

1-1. 原理

光毒性反応は、光が当たることにより励起された化学物質が定常状態に戻る際、エネルギーが何らかの形で放出されるが、その作用を契機として細胞全体が傷害されることで発現すると考えられている。本試験法は、この原理を利用し、マウス由来の線維芽細胞の単層培養系を用い、被験物質の光照射時と非照射時における用量－細胞生存率曲線を描き、光照射によって細胞毒性の増強が見られるか否かで被験物質の光毒性の有無を判定する方法である。生細胞の判別には Neutral Red (NR) を用いる。NR は弱カチオン性の色素で、細胞膜を能動輸送により透過してリソゾームに蓄積される性質を持つ。細胞傷害や、細胞死により、細胞膜の輸送能の低下やリソゾームの脆弱化が起こると NR が蓄積されなくなる。そのため、生細胞と傷害を受けた細胞または死細胞とを区別することが可能である。

その原理を応用し、吸光度により色素の取り込み量を測定し、その違いから光照射による細胞傷害性を評価する。

1-2. 試験手順及び判定

1-2-1. 試験手順

詳細は、OECD テストガイドライン 432 (OECD Guideline for Testing of Chemicals, 432 : *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test) や成書⁸⁾を参照する。

96 穴のアッセイプレート 2 枚を用い、BALB/c 3T3 細胞を 24 時間培養し、24 時間後、96 穴のアッセイプレート 2 枚から培養液を除去し、8 段階に緩衝液 (EBSS、HANKS 液等) で希釈した試験試料及び溶媒を含む緩衝液 (溶媒対照) を培養液と交換し 1 時間培養する。被験物質の緩衝液に対する溶解性に問題がある場合は、良好な溶解性が得られる溶媒 (水、エタノール、DMSO 等) に溶解した後、緩衝液をもちいて 8 段階に希釈し、試験試料を作製する。1 時間培養後、アッセイプレートの一方は光を照射し、もう一方は遮光して放置する。照射光は、UVA と可視光領域を持つ光が推奨されており、照射量は UVA 領域での計測で $5\text{J}/\text{cm}^2$ とする。照射後、試験試料を除去し、培養液に交換した後、18-22 時間培養する。培養後、NR を含む培養液を 3 時間培養して NR を取り込ませる。その後、細胞内に取り込まれた NR を抽出し、測定した吸光度を用いて、溶媒対照を細胞生存率 100% として試験試料の各処理濃度における細胞生存率 (%) を算出し、用量-細胞生存率曲線を得る。

1-2-2. 判定

結果の評価法としては、Photo Irritant Factor (PIF) を求める方法と Mean Photo Effect (MPE) を求める方法と 2 つの評価法が記されている。PIF は光照射時と非照射時の細胞 50% 生存濃度 (IC_{50}) の比であり、以下の式で求められる。

$$\text{PIF} = \text{IC}_{50}(\text{UV-}) / \text{IC}_{50}(\text{UV+})$$

MPE は光非照射時から照射時への用量-細胞生存率曲線のシフトを評価する数値で、各濃度における生存率方向の移動率 (response effect) と、濃度方向における移動率 (dose effect) を掛け合わせた値 (photo effect) の平均値である。それぞれの値を用いたときの判断基準を次頁の表に示した。

どちらの評価軸を用いても評価結果に差はないことが確認されている。これらの判定基準により、光毒性ポテンシャルの有無を判断する。

表：PIF および MPE による光毒性判定基準

Classification	PIF	MPE
No phototoxicity	PIF < 2	MPE < 0.1
Probable phototoxicity	$2 \leq \text{PIF} < 5$	$0.1 \leq \text{MPE} < 0.15$
Phototoxicity	$5 \leq \text{PIF}$	$0.15 \leq \text{MPE}$

1-3. 試験実施上の留意点

1-3-1. 試験実施における各種条件及び注意事項

①培養細胞について

OECD テストガイドラインにおいて、BALB/c 3T3 clone A31 (CCL-163 ; ATCC 又は 86110401 ; ECACC) を推奨しており、他の細胞の使用は可能としているが、同等性を示す必要があるとされる。

②光源及び照射光について

- 照射光については、UVA と可視光領域の光を照射することとし、光源としては、ソーラーシミュレーターとして、キセノンランプもしくは水銀メタルハライドランプが記載されている。

太陽光との近似性はキセノンランプの方が高いとしているが、水銀メタルハライドランプは放熱が少ないことと、安価である点がメリットとして挙げられている。

- 光源の種類によって波長特性が異なることや、照射装置の照射野の UV 強度の差異が生じることにより化学物質との光化学反応や毒性として発現する生物学的な反応も変わってくる。そのため、光源の波長特性を予め把握しておくとともに、その試験条件下での細胞毒性の発現について十分な背景データを得ておく必要がある⁹⁾。
- UV 強度測定器計のメーカーによって、検出する UV 波長域が異なるため、光源の波長特性に合致した UV 強度測定器を選択することが重要である⁶⁾。

③その他

- 溶解性の低い被験物質については、正確なデータが得にくい^{6,9)}。
- 光毒性の有無を定性的に判断するための試験系であり、光毒性の強弱の程度、生体における用量・濃度反応関係については必ずしも評価できない^{6,9)}。
- 被験物質の代謝などによる間接的な光毒性を検出できない⁹⁾。

1-3-2. 試験成立条件について

本試験法によるデータの質を維持する為に、試験施設ごとの背景データを取り、試験が適正に実施されたことを確認する。

試験成立を確認する参考として OECD テストガイドラインで推奨されている数値を以下

に示す。

- ・ 溶媒対照の細胞生存率：光照射条件下および非照射条件下の各プレートの溶媒対照の平均吸光度の値。OECD テストガイドラインでは 0.4（溶媒による背景データの約 20 倍）以上が推奨されている。
- ・ 光照射に対する細胞の感受性：非照射条件下の陰性（溶媒）対照群に対する、光照射条件下の溶媒対照群の細胞生存率。OECD テストガイドラインでは 80%以上であることが推奨されている。
- ・ 陽性対照に対する感受性：陽性対照物質の PIF 値が試験施設の背景データから逸脱していないこと。OECD テストガイドラインでは、塩酸クロルプロマジンを経験対照とした場合の PIF 値は 6 以上であることが推奨されている。

その他、OECD テストガイドラインの TABLE 1（添付資料）に挙げられている化合物を対照物質として、その PIF 値もしくは MPE 値を比較することにより、条件設定を検討する必要がある。

OECD テストガイドラインにて推奨されている以外の条件下においても、評価が適正に実施できる可能性はあるが、その場合には、試験条件の妥当性を評価し、科学的に説明する必要がある。

2. 本試験の利用について

2-1. 試験法の運用及び適用範囲

本試験は、医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に利用可能とする。ただし、製剤の試験には利用できない。本試験法の運用及び適用範囲については、申請資料作成に関するあり方検討会での指摘に基づき、以下の点に留意する。

- ① 化学物質の紫外外部吸収スペクトルを、波長 290～400nm の範囲で測定し、光毒性試験を実施する必要があると判断された場合は、第一選択試験法として本試験法を推奨する。
- ② 適正に実施された本試験法で No phototoxicity と判定された場合には、陰性と判断する。
- ③ 本試験法にて判定結果が No phototoxicity 以外の場合、従来の動物を用いた試験法にて確認し、陰性と判定された場合には、光毒性は陰性と判断する。
- ④ 本試験法は、単層細胞培養系を使用した評価システムであり、溶解性に問題がある（緩衝液と均一に混合しない）もの、著しく培養系に影響を与える（例えば、緩衝液の pH 変化をもたらす）ものは適正に評価できない。物性等から、明らかに本試験法への適用が困難であると判断された被験物質については、本試験法を適用できない。
- ⑤ 被験物質の物性等により、本試験法が適正に実施できていないと判断された場合、

動物試験を含めた他の試験法にて確認する。

2-2. 添付資料について

本試験法の結果を申請用資料として使用する場合には、以下の情報についても提示が必要になる場合がある。

- ・ 光照射機器購入時のスペクトラム分布情報
- ・ UV 強度測定器に関する情報（メーカー、機種、型番、校正記録）
- ・ 陽性対照物質の背景データ

3. 引用文献

- 1) Spielmann H., et al., *In vitro* Phototoxicity testing, the report and recommendation of ECVAM workshop 2, ATLA, 22, 314-348, 1994.
- 2) Spielmann H., et al., EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: first results obtained with Balb/3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicol. In Vitro*, 8, 793-796, 1994.
- 3) Spielmann H., et al., The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (Blind Trial). part1: The 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicol. In Vitro* 12, 305-327, 1998.
- 4) Spielmann H., et al., A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test, ATLA 26, 679-708, 1998.
- 5) OECD, OECD test guideline 432; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: *In Vitro* 3T3 NRU phototoxicity test,
<http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg432.pdf>
- 6) 大野泰雄ら, Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とした光毒性試験代替法の評価結果報告, 平成 14 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究 (H13-医薬-024)
- 7) 光関連毒性分科会、医薬部外品の製造販売承認申請における安全性に関する資料のあり方検討会最終報告書—光関連毒性分科会報告—、平成 21 年度厚生労働科学研究 動物実験代替法を用いた安全性評価体制の確立と国際協調に関する研究 (平成 22 年 4 月)
- 8) 最新 動物実験代替法の技法ノウハウ (技術情報協会発行, 2011)
- 9) CTFA Safety Evaluation Guidelines, Evaluation of Photoirritation and photoallergy potential

添付資料

OECD TG 432

TABLE 1

Chemical and CAS No	PIF	MPE	Absorption Peak	Solvent ¹
Amiodarone HCL [19774-82-4]	>3.25	0.27-0.54	242 nm 300 nm (shoulder)	ethanol
Chlorpromazine HCL [69-09-0]	>14.4	0.33-0.63	309 nm	ethanol
Norfloxacin [70458-96-7]	>71.6	0.34-0.90	316 nm	acetonitrile
Anthracene [120-12-7]	>18.5	0.19-0.81	356 nm	acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium [50865-01-5]	>45.3	0.54-0.74	402 nm	ethanol
L – Histidine [7006-35-1]	no PIF	0.05-0.10	211 nm	water
Hexachlorophene [70-30-4]	1.1-1.7	0.00-0.05	299 nm 317 nm (shoulder)	ethanol
Sodium lauryl sulfate [151-21-3]	1.0-1.9	0.00-0.05	no absorption	water