



薬生薬審発 1027 第 1 号
令和 4 年 10 月 27 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長
（ 公 印 省 略 ）

医薬部外品・化粧品的光安全性試験評価体系に関するガイダンスについて

今般、「医薬品等の動物試験代替法の開発及び国際標準化等に関する研究」（日本医療研究開発機構研究費（医薬品等規制調和・評価研究事業、研究開発代表者 小島肇））において、医薬部外品・化粧品の光安全性を評価するにあたって、動物を用いずに光安全性を評価することを目的として、複数の試験法を用いた際の評価フロー及び実施方法について、留意点等をまとめたガイダンスを別添のとおり作成されたので、貴管下関係業者に対して周知願います。

医薬部外品・化粧品の光安全性試験評価体系に関するガイダンス

平成 30 年 3 月 29 日発の「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添付する資料に関する質疑応答集（Q&A）について」¹⁾において、光安全性試験実施の際には平成 26 年 5 月 21 日発「医薬品の光安全性評価ガイドラインについて」²⁾及び平成 26 年 11 月 21 日発「医薬部外品の承認申請に際し留意すべき事項について」³⁾を参照するように記載されており、太陽光（紫外部及び可視光領域）の波長内（290～700 nm）に光吸収帯を持っている医薬部外品・化粧品原料については、光安全性評価を実施していく必要がある。太陽光の照射を受けた医薬部外品や化粧品原料が原因となって皮膚に発症する毒性として、刺激に基づくと考えられる一過性の皮膚反応である光毒性や、免疫を介した反応である光アレルギー(光感作性)等が知られており⁴⁾、上記資料では、光安全性を評価するために必要な項目として、光毒性試験及び光感作性試験が挙げられている。

光毒性試験における *in vitro* の代替法として、2004 年、経済協力開発機構（OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development）は光毒性試験に関する *in vitro* 試験法「3T3 NRU PT (Neutral Red Uptake Phototoxicity Test)」を試験法ガイドライン（TG : Test Guideline）432⁵⁾として採択した。3T3 NRU PT は単層培養細胞を用いて化学物質の光毒性の有無を検出する試験法として以前より使用されており、特に感受性の高い試験法として認識されている。3T3 NRU PT の利用については上記 TG432 をもとに、国内において既にガイダンス⁶⁾が発出されており、医薬部外品や化粧品の安全性評価へ広く利用されている。また、光感作性試験については、利用可能な代替法はなく、動物を用いた光感作性試験にて評価が行われてきている。一方、OECD は 2019 年、光化学的反応性評価法として 活性酸素種（ROS: Reactive Oxygen Species）assay を TG495 として採択した⁷⁾。ROS assay は化学物質の光化学的特性を指標とした *in chemico* 法であり、簡便かつ迅速に測定可能な光安全性評価法として提案されている。

本ガイダンスは、医薬部外品・化粧品の光安全性を評価するにあたって、上記の方法を利用した評価フロー及び実施方法についてわかりやすく解説するとともに、必要な留意点等をガイダンスとしてとりまとめたものである。

1. 評価フローに基づく光安全性評価

1-1. 基本的な考え方

本ガイダンスで取り扱う内容は、光毒性及び光感作性である。光毒性及び光感作性の実験的評価（*in vitro* 試験もしくは *in vivo* 試験）を行う前に、光化学的性質及び薬理学的/化学的分類に基づく初期評価（紫外線/可視光吸収性の把握や化学的光反応性の確認等）の実施が推奨される。

1-2. 概要

光安全性評価を以下の手順で行う（図 1）。

（1）紫外線/可視光吸収性の把握

光安全性評価では、まず初めに被験物質の光吸収性を確認する。紫外部/可視光領域（波長 290～700 nm）におけるモル吸光係数（MEC: Molar Extinction Coefficient）を確認する（補遺 1）。紫外部/可視光領域において光の吸収帯が認められない、あるいは、被験物質の MEC が $1,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 未満の場合は、光毒性及び光感作性を引き起こすほどの光反応性は無いと考えられるため、追加の光安全性（光毒性及び光感作性）試験を実施する必要はない²⁾。

（2）化学的光反応性の確認

（1）において、光反応性が否定できない場合は、光毒性及び光感作性に対する実験的評価を行う。被験物質の化学的光反応性は、光照射下における物質由来の活性酸素生成につながり、光安全性上の懸念につながる恐れがある。光毒性及び光感作性に対する実験的評価の *in chemico* 試験として、ROS assay の利用が可能である（補遺 2）。ROS assay は光毒性及び光感作性の検出が可能であることから、適切に実施された ROS assay にて陰性と判定された場合は、光安全性の懸念がないと結論でき、それ以降の光毒性試験及び光感作性試験の実施は必要ない。一方、ROS assay の結果から光安全性の懸念があると判断される場合、臨床的な光安全性の懸念を必ずしも示唆するものではないが、追加的評価を考慮すべきと考える。

（3）光毒性試験及び光感作性試験

（1）及び（2）において、被験物質の光安全性の懸念があると判断される場合、光毒性試験及び光感作性試験の実施が必要である。光毒性試験の *in vitro* 法である 3T3 NRU PT は、TG432⁵⁾ 及び既出ガイダンス⁶⁾ を参考に実施できるが、2019 年に TG432 改訂版⁸⁾ が発出されたことから、変更点（補遺 6）を考慮した上で試験を実施する必要がある。適切に実施された 3T3 NRU PT で陰性となれば、対象となる被験物質の光毒性は陰性と判断できる。一方、3T3 NRU PT の結果から光毒性が陰性であると判断できない場合、臨床的な光毒性を必ずしも示唆するものでなく、追加的評価を考慮すべきと考え、従来¹⁻³⁾ の方法で評価する。光毒性が陰性であっても、光感作性の確認は必要であるため、光感作性試験を従来¹⁻³⁾ の方法を別途行う。なお、これらの光毒性試験及び光感作性試験が適切な条件下において実施される場合、本光安全性評価フローにおける化学的光反応性の確認は必ずしも必須ではない。

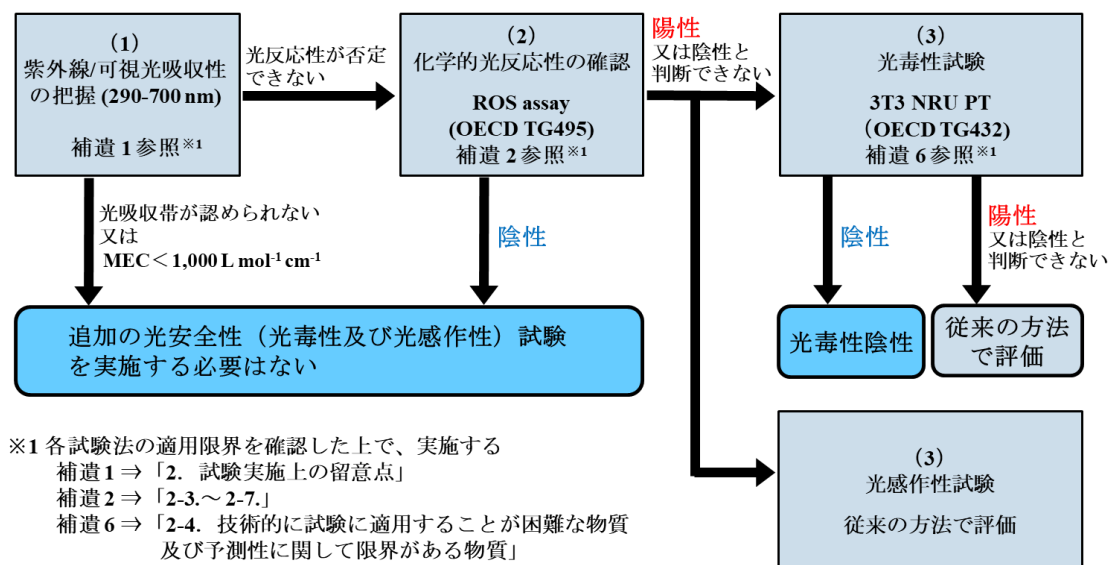


図 1 光安全性評価フロー

2. 本評価フローの予測性と運用方法に関する留意点

2-1. ベンチマーク物質との相対評価

ベンチマーク物質は、特定の化学物質又は製品クラスに属する未知の化学物質の光安全性、又は光反応性が特定の範囲内にある被験物質を相対的に評価する上で有用である。なお、被験物質との比較に用いられるベンチマーク物質は以下の要件を満たすものである。(i) 供給源に一貫性及び信頼性がある、(ii) 化学構造及び機能が被験物質に類似している、(iii) 物理的及び化学的特性が既知である、(iv) 紫外部及び可視光領域の波長内（290～700 nm）における吸収スペクトルが被験物質に類似している、(v) 光安全性が望ましい範囲内にあること（ヒトが安全に使用できること）を示す既知のデータがある。

2-2. 本評価フローの光毒性予測

光毒性情報が知られている 59 物質（陽性対照 34 品、陰性対照 25 品）の試験成績を用い、本評価フローの予測性を解析した（詳細なデータは補遺 8 を参照）。各試験法の予適用限界である難水溶性物質の陰性結果を結論がでない（Inconclusive）を除いた本評価フローの感度、特異度及び正確度は全て 100% であった（表 1）。以上の結果から、適切に実施された本評価フローの光毒性予測の偽陰性懸念は低いことが示唆された。

表 1 本評価フローの光毒性予測結果

	(1) MEC	(2) ROS/mROS* assay	(3) 3T3 NRU PT	評価フロー 予測結果
感度	100% (34/34)	100% (34/34)	100% (30/30)	100% (30/30)
特異度	72.0% (18/25)	81.0% (17/21)	100% (22/22)	100% (23/23)
正確度	88.1% (52/59)	92.7% (51/55)	100% (52/52)	100% (53/53)

* mROS : micellar ROS assay⁹⁾

2-3. ROS assay の光感作性予測

日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH: International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) で議論し採択された ROS assay¹⁰⁾ は光毒性を対象としており、ROS assay の光感作性予測については議論されていない。ただ、光毒性の発症メカニズムにおいて発生する ROS は、光感作性を有する物質でも同様に発生する¹¹⁾。そのため、適切な試験条件下において ROS assay を実施した結果で陰性となった場合は、光毒性及び光感作性を示さないと判断できる。補遺 4 に詳細を記載している。

3. 本評価フローの限界と留意点

3-1. 各試験法の適用限界

難水溶性物質や植物エキスのような構造式や分子量の情報が不明な物質の光安全性の評価を行う際には、各試験法（補遺 1、補遺 2 及び補遺 6）の適用範囲を考慮した上で実施する。

3-2. 代謝物

代謝により親化合物と大幅に異なるクロモフォア¹⁾が生じることは通常ないので、一般的に代謝物について、別途、光安全性評価を行う必要はない²⁾。

3-3. 間接的光毒性

細胞学的、生化学的、生理学的変化による光毒性であるが、光化学的反応に関連しないもの（偽ポルフィリン症やポルフィリン症等）を指す²⁾。本ガイダンスは間接的光毒性には対応していない。

¹⁾ クロモフォア：可視光あるいは UV を吸収する分子の部分構造（ICH S10 より）

4. 引用文献

- 1) 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添付する資料に関する質疑応答集（Q&A）について（厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課事務連絡，平成30年3月29日付）
- 2) 医薬品の光安全性評価ガイドラインについて（厚生労働省医薬食品局審査管理課長、薬食審査発 0521 第 1 号，平成 26 年 5 月 21 日）
- 3) 医薬部外品の承認申請に際し留意すべき事項について（厚生労働省医薬食品局審査課長、薬食審査発 1121 第 15 号、平成 26 年 11 月 21 日）
- 4) Onoue S., Seto Y., Sato H., Nishida H., Hirota M., Ashikaga T., Api A.M., Basketter D., Tokura Y., 2017. Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments. *J. Dermatol. Sci.* 85, 4-11.
- 5) OECD, 2004, OECD Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Available at: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Test%20No.432-2004%20English.pdf>, Accessed April 4th 2022
- 6) 光毒性試験代替法としてのin vitro 3T3 NRU 光毒性試験を化粧品・医薬部外品の安全性評価に活用するためのガイダンス（厚生労働省医薬食品局審査管理課、事務連絡平成24年4月26日）
- 7) OECD, 2019. OECD Test No. 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity, <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/915e00ac-en.pdf?expires=1625737066&id=id&accname=guest&checksum=63D6CA3AF7673D27F10120003C2A9973>, Accessed April 4th 2022
- 8) OECD, 2019, OECD Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Available at: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071162-en.pdf?expires=1631607250&id=id&accname=guest&checksum=8C7791EDD86F693111AE5484758418F1>, Accessed April 4th 2022
- 9) Seto Y., Kato M., Yamada S., Onoue S., 2013. Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, 1838-1846.
- 10) International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2014. ICH S10 Guidance on photosafety evaluation of pharmaceuticals. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-5_en.pdf, Accessed April 4th 2022
- 11) Tokura Y., 2009. Photoallergy. *Expert Rev. Dermatol.* 4, 263-270.

補遺 1 モル吸光係数 (MEC) の確認

1. 概要

1-1. MEC の算出方法

紫外部/可視光領域の波長 (290~700 nm) の吸収スペクトルの評価を行えば、追加の光安全性評価を行う必要がなくなる場合もあることから、初期評価の手法として推奨される¹⁾。

MEC 測定のための標準化された条件は非常に重要である。基本的な内容を確認する場合には、OECD のTG101²⁾ 又は ICH S10³⁾ を参照する。

溶媒の選択

適切な溶媒の選択については、測定に必要な条件 (被験物質の溶解性や紫外線/可視光領域の透過性) と生理学的な妥当性の両面から決定すべきである。メタノールは望ましい溶媒として推奨されており、MEC の閾値を $1,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ とする際に用いられた⁴⁾。

注 1) 分子中のクロモフォア (例えば、フェノール構造や芳香族アミン、カルボン酸等) が pH 感受性を有すると考えられる場合、pH 7.4 の水性緩衝液を用いた追加測定の実施により、吸収スペクトルや MEC の差異に関する有益な情報が得られる。

注 2) OECD TG101 を参考に、酸性 (pH < 2)、中性、塩基性 (pH > 10) の 3 つの異なる pH 条件における吸収スペクトル測定を行ってもよい。水媒体で溶解しない場合、10% HCl 又は NaOH を含む有機溶媒 (メタノールが推奨される) を用いる ([HCl], [NaOH] = 1 M)。

MEC の算出

Lambert-Beer の法則を用いて算出する。MEC は吸光度とモル濃度から成る検量線の傾きに相当する。

$$A = d \sum_i \epsilon_i C_i$$

A: 吸光度 (-)

ϵ : MEC ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

C: 被験物質のモル濃度 (mol/L)

d: セルの光路長 (cm)

注 1) 良好な直線性が得られる濃度範囲で複数濃度を設定することが望ましい。MEC の閾値を $1,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ とする際には、100 μM 付近の濃度で測定されているが⁴⁾、光吸収性の低い被験物質は必要に応じて、より高濃度で調製してもよい。

1-2. 判定

MEC が $1,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 未満であれば光毒性及び光感作性を引き起こすほどの光反応性は無いと判定され、追加の光安全性（光毒性及び光感作性）試験を実施する必要はない。MEC が $1,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 以上の場合は、光反応性を否定できないため、不足する光安全性試験を行う。

2. 試験実施上の留意点

2-1. 技術的に試験に適用することが困難な物質

- (1) 溶媒に溶解しない物質
- (2) 溶媒中での安定性が問題となる物質（例：溶媒中で加水分解）
- (3) 分子量が不明な物質

2-2. 予測性に関して限界がある物質

- (1) クロモフォアが pH 感受性を有する物質

メタノール中と pH 調整緩衝液中での吸収スペクトルに有意な差が認められる場合、 $1,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ の閾値を用いることはできない。

3. 引用文献

- 1) 医薬品の光安全性評価ガイドラインについて（厚生労働省医薬食品局審査管理課長、薬食審査発 0521 第 1 号, 平成 26 年 5 月 21 日）
- 2) OECD, 1981. OECD Test No. 101: UV-VIS Absorption Spectra (Spectrophotometric Method), <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069503-en.pdf?expires=1629963576&id=id&acname=guest&checksum=C3C8A906CA7E04F1F908CDB2980A5DEB>, Accessed April 4th 2022
- 3) International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2014. ICH S10 Guidance on photosafety evaluation of pharmaceuticals. https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-5_en.pdf, Accessed April 4th 2022
- 4) Bauer D., Averett L.A., De Smedt A.D., Kleinman M.H., Muster W., Pettersen B.A., Robles C., 2014. Standardized UV-vis spectra as the foundation for a threshold-based, integrated photosafety evaluation. Regul. Toxicol. Pharmacol. 68, 70-75.

補遺 2 ROS assay (OECDの TG495)

1. 試験法の概要

1-1. 原理

光毒性は、光照射によって産生される光反応性物質に対する急性の組織反応である。第一段階として化学物質が光エネルギーを吸収し励起状態へ移行し、一重項酸素 (SO : Singlet Oxygen) やスーパーオキシドアニオン (SA : Superoxide Anion) を含むROSを生成する過程を経る。光エネルギーの吸収により、光付加体や光反応物質の形成等を生じることもあるが、その場合でも ROS が介在すると考えられている¹⁾。ROS assay は、光照射による SO 及び SA の 2 種の ROS 産生の有無を確認する試験である。SO 産生の評価は、光照射を受けて被験物質が励起化合物となり、これから産生された SO が imidazole と反応中間体を形成し、これが *p*-nitrosodimethylaniline (RNO) を酸化・変色することで 440 nm の吸光度が減少することを指標とする。一方 SA は、励起化合物から産生される SA の電子移転反応により nitorobule tetrazolium (NBT) を還元し生成される monoformazan が 560 nm に吸収を有するため、この吸光度の増加を指標として評価する。

1-2. 試験手順及び判定

1-2-1. 試験手順

詳細な内容を確認する場合には、TG495 を参照する²⁾。

被験物質・対照物質の準備

ROS assay を実施する際には、DMSO で 10 mM の被験物質溶液を試験直前に調製し、assay mixture における終濃度は 200 μ M とする。DMSO に溶解しない場合は、20 mM sodium phosphate buffer (NaPB) を用いてもよい。光安定性に注意をしつつ、ボルテックスミキサーや超音波処理にて 5~10 分程度混和し、溶解性を確認することが推奨される。Assay mixture 中の終濃度 200 μ M において懸濁、沈殿又は着色等が認められる場合、終濃度 20 μ M 濃度に希釈して実施してもよいが試験結果の判断には注意が必要である。

陽性対照物質として quinine hydrochloride (CAS No. 6119-47-7)、陰性対照物質として sulisobenzone (CAS No. 4065-45-6) をいずれも試験直前に 10 mM に調製して用いる。

Assay mixture の準備、擬似太陽光の照射

ROS assay では SO と SA の双方を評価するため、それぞれの測定に必要な assay mixture を図 2 に従い調製する。調製後、200 μ L の assay mixture を 96 ウェルマイクロプレートに $n=3$ になるよう移し、光学顕微鏡観察 ($\times 100$) と目視観察にて溶解性を確認する。5 秒程度攪拌した後、照射前の各 assay mixture の吸光度 (440 nm 及び 560 nm) を測定する。96 ウェルマイクロプレートを reaction container にセットし、気密性を高めるために石英板をしっかりと固定し、solar simulator で 1 時間擬似太陽光を照射する。1 分程度攪

拌した後、照射後の各 assay mixture の吸光度（440 nm 及び 560 nm）を測定する。

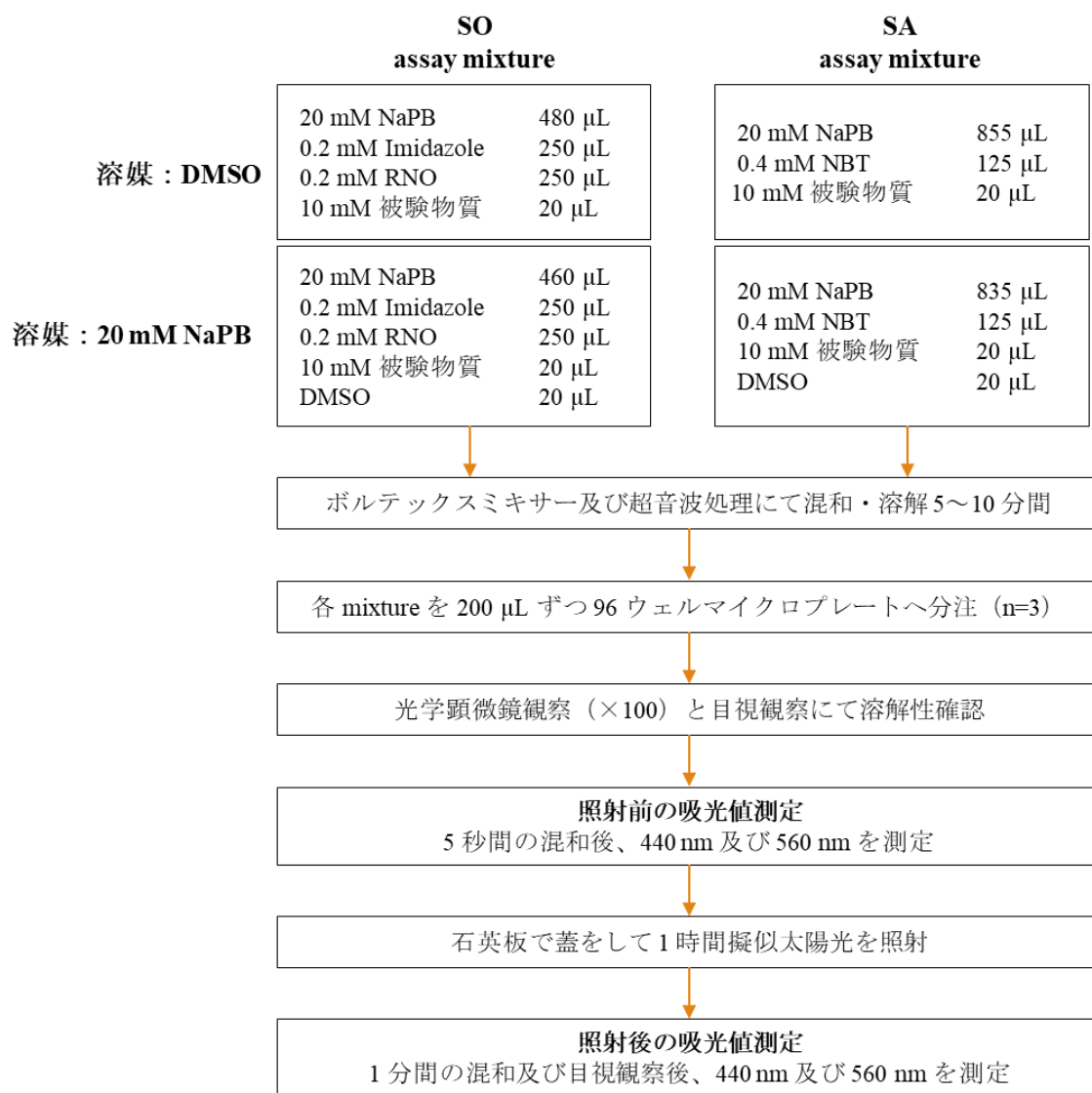


図 2 被験物質の選択溶媒に応じたワークフロー

SO 及び SA の算出

Blank 及び被験物質の照射前後の吸光度から、SO 及び SA の産生を以下の通りそれぞれ算出する。

$$\text{SO} : \Delta A_{440} \times 10^3 = \{A_{440}(-) - A_{440}(+) - (A - B)\} \times 10^3$$

A₄₄₀(-): 照射前の assay mixture の 440 nm における吸光度

A₄₄₀(+): 照射後の assay mixture の 440 nm における吸光度

A: 照射前の blank の 440 nm における吸光度

B: 照射後の blank の 440 nm における吸光度

$$SA : \triangle A_{560} \times 10^3 = \{A_{560(+)} - A_{560(-)} - (B - A)\} \times 10^3$$

A₅₆₀₍₋₎: 照射前の assay mixture の 560 nm における吸光度

A₅₆₀₍₊₎: 照射後の assay mixture の 560 nm における吸光度

A: 照射前の blank の 560 nm における吸光度

B: 照射後の blank の 560 nm における吸光度

1-2-2. 判定

被験物質の平均値は、SO が 25 未満かつ SA が 20 未満の場合は、光反応性は陰性と判定する。SO が 25 以上あるいは SA が 20 以上のいずれかの条件を満たした場合、光反応性は陽性と判定する。ただし、溶解度等の問題で 20 μ M にて対応した場合、陰性判定はできない。

2. 試験実施上の留意点

2-1. 試験実施における各種条件及び注意事項

新たに試験を実施する試験施設では、ROS assay の習熟度確認物質（補遺 3）等を活用し精度の向上に努めなければならない。また、光照射強度や光照射時間、サンプル温度、共存する有機溶媒をはじめとする種々の条件によって大きく変動が誘発されるため、細心の注意が必要である。

Solar simulator

ROS assay に使用する solar simulator は、標準昼光に近い条件とするため、290 nm 以下の波長をカットする UV フィルターを装着した Atlas Suntest CPS/CPS+（照射量：1.8～2.2 mW/cm²）又は Seric SXL-2500V2（照射量：3.0～5.0 mW/cm²）が推奨される。また、Solar simulator のチャンバー内の温度は、試験系へ影響しないよう 20～29℃ の範囲で制御する。Solar simulator によっては照射ムラが発生することがあるため、照射ムラの無い領域を把握しておく必要がある。他の solar simulator を用いて使用することも可能であるが、その場合には習熟度確認物質（補遺 3）を用いた条件最適化を必要とする。

Reaction container

Assay mixture を擬似太陽光に照射する際、水分揮発による濃度変動回避のためスペクトルパターンが変化しない石英板にて蓋をして固定し、気密性を高める必要がある。推奨される reaction container は、スチール製の固定具、白色テフロンシート及び蓋の役目を果たす石英板から構成される（図 3）。他の reaction container を使用することも可能であるが、

その場合には習熟度確認物質（補遺 3）を用いた条件最適化を必要とする。

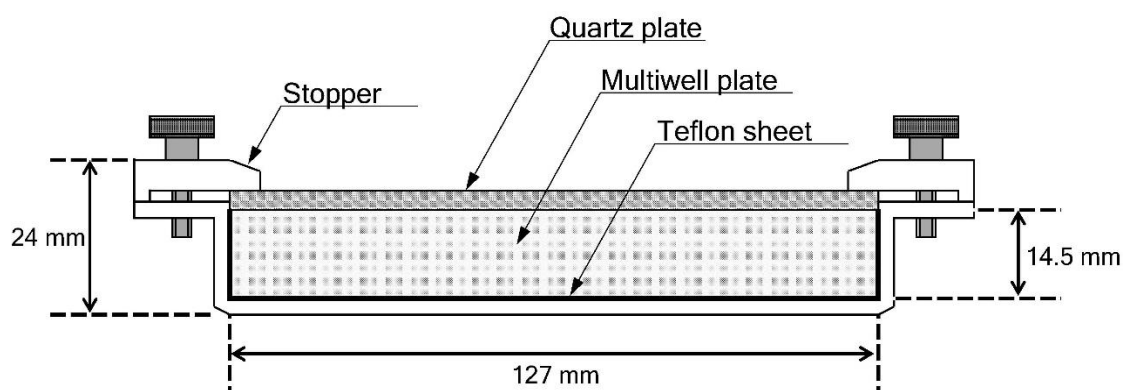


図 3 Reaction container の構成

2-2. 試験成立条件について

以下の条件を満たした場合にのみデータを採用する。

- (1) 照射前の assay mixture において、被験物質が溶解している。
- (2) 照射前の assay mixture において、被験物質の着色干渉が無い。
- (3) 440 nm 及び 560 nm における吸光度が 0.02～1.5 の範囲内である。
- (4) Blank、陽性対照及び陰性対照を同一のプレート内で評価し、陽性対照及び陰性対照の SO 及び SA が妥当な範囲に収まる。

なお、(4)における妥当な範囲は、ROS assay 開発施設が設定した上限・下限値（陽性対照物質 200 μM : SO が 319～583、SA が 193～385、陰性対照物質 200 μM : SO が -9～11、SA が -20～2）を指す。陰性対照の SA が下限値を下回る場合、 Cu^{2+} を添加した NaPB を用いることで妥当な範囲に収まることが報告されている³⁾。

2-3. 吸光度測定に干渉する場合の対処について

光照射によって生成された物質が測定波長域（440 nm 又は 560 nm）に光吸収性を示す場合、吸光度測定に干渉する可能性がある。その場合、反応基質を含まない assay mixture（control）を用意して ROS assay と同様の操作を行い、440 nm 又は 560 nm における吸光度変化を ROS assay データから差し引くことで補正が可能である⁴⁾。

2-4. ベンチマーク物質との相対評価

ROS assay で陰性結果が得られない場合、被験物質に関連したベンチマーク物質との相対評価を行うこともできる。

2-5. 難溶性物質への対応

終濃度 200 μM 濃度において assay mixture 中で懸濁、又は、沈殿物を光学顕微鏡 ($\times 100$) 又は目視観察で確認できる場合、終濃度 20 μM 濃度に希釈した ROS assay 又は assay mixture に 0.5% (v/v) Tween 20 を添加した micellar ROS assay (mROS) ⁵⁾ を用いて試験を実施する。ただし、陽性判定はできるが、陰性判定から光反応性が陰性と判断することはできない。

2-6. 混合物又は多成分物質への対応

混合物とは、互いに反応しない 2 つ以上の物質からなる混合物又は溶液とする ⁶⁾。一方、多成分物質とは、その定量的組成に、2 つ以上の主要成分が濃度 10% (w/w) 以上 80% (w/w) 未満存在することにより定義される物質とする ⁷⁾。これら、混合物と多成分物質との違いについて、混合物が 2 つ以上の物質が化学反応を起こさず混合することにより得られるのに対し、多成分物質は化学反応の結果得られる。

既知組成の混合物及び多成分物質は、水以外の構成成分の割合の合計から得られる純度及び見かけ分子量を用いて 10 mM の被験物質溶液を調製する。主要な分子量を測定できないポリマーの場合、モノマーの分子量（又は、ポリマーを構成する複数のモノマーの見かけ分子量）を考慮して、10 mM の被験物質溶液を調製し、各 assay mixture に使用する。また、未知成分で構成される原料を被験物質とする場合は、見かけ分子量を 250 と設定し、各 assay mixture における原料の終濃度を 50 $\mu\text{g/mL}$ とする（補遺 5）。ただし、光安全性懸念を示唆する情報がある場合等は、陰性結果が得られたとしても申請者は個別に対応する必要がある。

2-7. 技術的に試験に適用することが困難な物質及び予測性に関して限界がある物質

様々な構造を有する化学物質の光安全性の予測が可能であることが示されているが ^{4,5)}、被験物質に対する本試験法の適否を判断する際には以下の点について考慮する。

2-7-1. 技術的に試験に適用することが困難な物質

- (1) 溶媒に溶解しない物質又は溶媒中で安定的に均一に分散しない物質
- (2) 色素

ROS assay は変色を指標とした試験系であることから、溶解時に着色が認められる被験物質は評価できない。

2-7-2. 予測性に関して限界がある物質

- (1) 難水溶性の物質

終濃度 200 μM 濃度において assay mixture 中で懸濁、又は、沈殿物を光学顕微鏡 ($\times 100$) 又は目視観察で確認できる場合、陽性判定はできるが、陰性判定から光反応性が陰性と判断することはできない。

(2) 光安定性に問題がある物質

光照射により分解することがその被験物質の光安全性懸念を示唆するわけではない。そのため、光安定性に問題がある被験物質は偽陽性となる可能性がある。

(3) 酸化性又は還元性を有する物質

酸化性物質は RNO を酸化させ、還元性物質は NBT を還元させる可能性があるため、被験物質を偽陽性と予測することがある。

3. 引用文献

- 1) Tokura Y., 2009. Photoallergy. Expert Rev. Dermatol. 4, 263-270.
- 2) OECD, 2019. OECD Test No. 495: Ros (Reactive Oxygen Species) Assay for Photoreactivity.
<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/915e00ac-en.pdf?expires=1625737066&id=id&accname=guest&checksum=63D6CA3AF7673D27F10120003C2A9973>, Accessed April 4th 2022
- 3) Ohtake T. and Hirota M., 2022. Causes and countermeasure for blank absorbance increase in the ROS assay. J. Toxicol. Sci. 47, 109-116.
- 4) Onoue S., Suzuki G., Kato M., Hirota M., Nishida H., Kitagaki M., Kouzuki H., Yamada S., 2013. Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. Toxicol. In Vitro 27, 2316-2324.
- 5) Seto Y., Kato M., Yamada S., Onoue S., 2013. Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. Toxicol. In Vitro 27, 1838-1846.
- 6) United Nations (UN) (2017), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Seventh revised edition, New York and Geneva, United Nations Publications.
https://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/07files_e0.html, Accessed April 4th 2022
- 7) OECD, 2022. OECD Test No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins.
<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264229709-en.pdf?expires=1631144327&id=id&accname=guest&checksum=E85765EDAB5BB15A728867C3F6710642>, Accessed July 21th 2022

補遺 3 ROS assay の習熟度確認物質

表 2 ROS assay の習熟度確認物質リスト

化学物質名	CAS 番号	性状	SO ¹⁾	SA ¹⁾	溶媒	濃度
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	150-13-0	固体	-8 to 12	-11 to 7	DMSO	200 µM
Benzocaine	94-09-7	固体	-7 to 9	-7 to 17	DMSO	200 µM
Doxycycline hydrochloride	10592-13-9	固体	115 to 429	230 to 468	DMSO	200 µM
Erythromycin	114-07-8	固体	-15 to 11	-9 to 21	DMSO	200 µM
Fenofibrate	49562-28-9	固体	77 to 203	-31 to 11	DMSO	20 µM
L-Histidine	71-00-1	固体	-8 to 12	8 to 120	NaPB	200 µM
Norfloxacin	70458-96-7	固体	131 to 271	57 to 161	DMSO	200 µM
8-Methoxy psoralen	298-81-7	固体	31 to 137	0 to 126	DMSO	200 µM
Octyl salicylate	118-60-5	液体	-5 to 11	-8 to 20	DMSO	20 µM
Acridine	260-94-6	固体	182 to 328	121 to 243	DMSO	200 µM
Chlorpromazine hydrochloride	69-09-0	固体	-56 to 70	66 to 106	DMSO	200 µM
Diclofenac	15307-79-6	固体	34 to 416	47 to 437	DMSO	200 µM
Furosemide	54-31-9	固体	31 to 225	-7 to 109	DMSO	200 µM
Ketoprofen	22071-15-4	固体	120 to 346	77 to 151	DMSO	200 µM
Nalidixic acid	389-08-2	固体	54 to 246	88 to 470	DMSO	200 µM
Omeprazole	73590-58-6	固体	-221 to 103	30 to 216	DMSO	200 µM
Promethazine hydrochloride	58-33-3	固体	20 to 168	-3 to 77	DMSO	200 µM

略号等：

CAS 番号：Chemical Abstracts Service Registry Number (CASRN)

¹⁾ バリデーション研究で得られた結果に基づく。

補遺 4 ROS assay の光感作性予測への利用についての補足

化学物質による光線過敏症は光毒性と光感作性に分けられる。そのうち、光感作性は、光化学反応によって蛋白質付加体等の光反応生成物を形成し、それにより引き起こされる免疫を介した反応とされている¹⁾。光照射による光反応性物質産生時に発生する SO と SA は、光感作性を示す物質でも同様に発生し、光感作性では、光蛋白結合又は光分解のエネルギーにつながると考えられている²⁾。一般的に、臨床の現場において、光毒性と光感作性を明確に鑑別することは難しいとされており³⁾、光毒性と光感作性の両方の性質を有する化学物質もある。したがって、光毒性を示さない光感作性物質の選定が難しいことから、ROS assay が作用機序の観点から光感作性物質の検出が可能か否かの検証は容易ではない。そこで、以下示す観点から光感作性物質として分類した 34 物質を表 3 に示した。

- ・法規制により化粧品への配合が禁止されている光線過敏症の原因化学物質である。
- ・公的な評価書（医薬品インタビューフォーム、IFRA、CIR、SCCS）において、副作用に光線過敏症が記載されている、又は、光感作性陽性物質と判断されている。
- ・*In vivo* 光感作性試験の陽性対照として使用されている。

ROS assay の結果は 34 物質全て陽性であったことから、光毒性に加えて光感作性を含めた光安全性評価ツールとして ROS assay を利用することは妥当と考えられる。

表 3. 光感作性物質として分類した物質リスト

No.	化学物質名	CAS 番号	光感作性		ROS/mROS assay	
			根拠	Ref.	結果	Ref.
1	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	法規制、 <i>in vivo</i> （陽性対照）	4、5	+*	33
2	4-Methyl-7-ethoxycoumarin	87-05-8	IFRA	6	+	33
3	6-Methylcoumarin	92-48-8	IFRA、 <i>in vivo</i> （陽性対照）	6、5	+	33
4	7-Methoxycoumarin	531-59-9	IFRA	6	+	33
5	Amiodarone HCl	19774-82-4	IF（光線過敏症）	7	+*	33
6	Oxybenzone	131-57-7	SCCS	8	+	34
7	Bithionol	97-18-7	法規制、 <i>in vivo</i> （陽性対照）	9、5	+	33
8	Chlorpromazine HCl	69-09-0	IF（光線過敏症）	10	+	33
9	Dichlorophen	97-23-4	CIR	11	+*	33
10	Diclofenac Na	15307-79-6	IF（光線過敏症）	12	+	33
11	Doxycycline HCl	10592-13-9	IF（光線過敏症）	13	+	35
12	Enoxacin	74011-58-8	<i>in vivo</i> （陽性対照）	14	+	33
13	Fenticlor	97-24-5	<i>in vivo</i> （陽性対照）	5	+*	33
14	Fenofibrate	49562-28-9	IF（光線過敏症）	15	+*	33

15	Furosemide	54-31-9	IF (光線過敏症)	16	+	35
16	Glibenclamide	10238-21-8	IF (光線過敏症)	17	+	36
17	Hexachlorophene	70-30-4	<i>in vivo</i> (陽性対照)	18	+	33
18	Hydrochlorothiazide	58-93-5	IF (光線過敏症)	19	+	36
19	Ketoprofen	22071-15-4	IF (光線過敏症)	20	+	33
20	Lomefloxacin HCl	98079-52-8	IF (光線過敏症)	21	+	37
21	Musk ambrette	83-66-9	IFRA、SCCS	6, 22	+*	33
22	Nalidixic acid	389-08-2	IF (光線過敏症)	23	+	35
23	Norfloxacin	70458-96-7	IF (光線過敏症)	24	+	35
24	Ofloxacin	82419-36-1	IF (光線過敏症)	25	+	35
25	Omadine Na	3811-73-2	<i>in vivo</i> (陽性対照)	5	+	36
26	Piroxicam	36322-90-4	IF (光線過敏症)	26	+	33
27	Promethazine HCl	58-33-3	IF (光線過敏症)	27	+	33
28	Pyridoxine HCl	58-56-0	IF (光線過敏症)	28	+	36
29	Sparfloxacin	110871-86-8	IF (光線過敏症)	29	+	37
30	Quinine	130-95-0	FDA PRESCRIBING INFORMATION (Photosensitivity)	30	+	33

31	Sulfanilamide	63-74-1	<i>in vivo</i> (陽性対照)	5	+	33
32	Sulfasalazine (Salazosulfapyridine)	599-79-1	IF (光線過敏症)	31	+	36
33	Tetracycline HCl	64-75-5	IF (光線過敏症)	32	+	33
34	Tribromsalan (3,5,4'-Tribromosalicylanilide)	87-10-5	法規制	4	+*	33

+: 陽性、IFRA: International Fragrance Association、IF: 医薬品インタビューフォーム、CIR: Cosmetic Ingredient Review、SCCS: Scientific Committee on Consumer Safety、*: Tween 20 を添加した micellar ROS assay (mROS) 結果

引用文献

- 1) International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2014. ICH S10 Guidance on photosafety evaluation of pharmaceuticals.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-s10-photosafety-evaluation-pharmaceuticals-step-5_en.pdf, Accessed April 4th 2022
- 2) Tokura Y., 2009. Photoallergy. Expert Rev. Dermatol. 4, 263-270.
- 3) 川田 暁, 2011. 光アレルギー. Jpn. J. Clin. Immunol. 34, 8-12.
- 4) U.S. Food and Drug Administration, Code of Federal Regulations Title 21, Section 700.15 - Use of certain halogenated salicylanilides as ingredients in cosmetic products. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=700.15>, Accessed April 4th 2022
- 5) Gerberick G.F. and Ryan C.A., 1990. A predictive mouse ear-swelling model for investigating topical photoallergy. Food Chem. Toxicol. 28, 361-378.
- 6) International Fragrance Association (IFRA), 2021. IFRA Standards-50th Amendment.
- 7) アミオダロン塩酸塩速崩錠 50mg 「TE」, 医薬品インタビューフォーム第 11 版 (2022 年 4 月改訂)
- 8) SCCS, 2021. OPINION on Benzophenone-3 (CAS No 131-57-7, EC No 205-031-5). SCCS/1625/20.
- 9) U.S. Food and Drug Administration, Code of Federal Regulations Title 21, Section 700.11 - Cosmetics containing bithionol. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=700.11>, Accessed April 4th 2022

- 10) コントミン®糖衣錠 12.5mg, 医薬品インタビューフォーム第 13 版 (2021 年 1 月改訂)
- 11) Yamarik T.A., 2004. Safety assessment of dichlorophene and chlorophene. *Int. J. Toxicol.* 23, 1-27.
- 12) ジクロフェナク Na 錠 25mg「サワイ」, 医薬品インタビューフォーム第 19 版 (2022 年 2 月改訂)
- 13) ビブラマイシン錠 50mg, 医薬品インタビューフォーム第 14 版 (2021 年 2 月改訂)
- 14) Horio T., Miyauchi H., Asada Y., Aoki Y., Harada M., 1994. Phototoxicity and photoallergenicity of quinolones in guinea pigs. *J. Dermatol. Sci.* 7, 130-135.
- 15) トライコア錠 53.3mg, 医薬品インタビューフォーム第 10 版 (2022 年 3 月改訂)
- 16) フロセミド錠 10mg「NP」, 医薬品インタビューフォーム第 7 版 (2021 年 6 月改訂)
- 17) グリベンクラミド錠 1.25mg「三和」, 医薬品インタビューフォーム第 5 版 (2017 年 3 月改訂)
- 18) Harber L.C., Targovnik S.E., Baer R.L., 1968. Studies on Contact Photosensitivity to Hexachlorophene and Trichlorocarbanilide in Guinea Pigs and Man. *J. Invest. Dermatol.* 51, 373-377.
- 19) ヒドロクロロチアジド錠 12.5mg「トーワ」, 医薬品インタビューフォーム第 16 版 (2020 年 2 月改訂)
- 20) ケトプロフェンテープ 20mg「日医工」, 医薬品インタビューフォーム第 11 版 (2021 年 3 月改訂)
- 21) バレオン®カプセル 100mg, 医薬品インタビューフォーム第 13 版 (2019 年 10 月改訂)
- 22) SCCS, 2012. OPINION on Fragrance allergens in cosmetic products. SCCS/1459/11.
- 23) ウイントマイロン®錠 250, 医薬品インタビューフォーム第 6 版 (2013 年 12 月改訂)
- 24) ノルフロキサシン錠 100mg「サワイ」, 医薬品インタビューフォーム第 8 版 (2021 年 3 月改訂)
- 25) オフロキサシン錠 100mg「テバ」, 医薬品インタビューフォーム第 14 版 (2020 年 11 月改訂)
- 26) バキソ®軟膏 0.5%, 医薬品インタビューフォーム第 7 版 (2021 年 2 月改訂)
- 27) ピレチア細粒 10%, 医薬品インタビューフォーム第 13 版 (2020 年 10 月改訂)
- 28) ビタミン B₆錠 30mg「F」, 医薬品インタビューフォーム第 10 版 (2021 年 2 月改訂)
- 29) スパラ錠 100mg, 医薬品インタビューフォーム第 13 版 (2011 年 1 月改訂)
- 30) QALQUIN® (quinine sulfate), PRESCRIBING INFORMATION (Revised: 6/2019)

- 31) サラゾスルファピリジン腸溶錠 500mg「SN」, 医薬品インタビューフォーム第 19 版 (2020 年 5 月改訂)
- 32) アクロマイシン®末, 医薬品インタビューフォーム第 10 版 (2020 年 9 月改訂)
- 33) Onoue S., Suzuki G., Kato M., Hirota M., Nishida H., Kitagaki M., Kouzuki H., Yamada S., 2013. Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. *Toxicol. In Vitro* 27, 2316–2324.
- 34) Seto Y., Ohtake H., Kato M., Onoue S., 2015. Phototoxic Risk Assessments on Benzophenone Derivatives: Photobiochemical Assessments and Dermal Cassette-Dosing Pharmacokinetic Study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354, 195-202.
- 35) Onoue S., Hosoi K., Wakuri S., Iwase Y., Yamamoto T., Matsuoka N., Nakamura K., Toda T., Takagi H., Osaki N., Matsumoto Y., Kawakami S., Seto Y., Kato M., Yamada S., Ohno Y., Kojima H., 2013. Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1241–1250.
- 36) Onoue S., Ohtake H., Suzuki G., Seto Y., Nishida H., Hirota M., Ashikaga T., Kouzuki H., 2016. Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens. *Toxicol. In Vitro* 33, 147–152.
- 37) Seto Y., Kato M., Yamada Y., Onoue S. 2013. Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27. 1838-1846.

補遺 5 ROS assay の未知組成の構成成分への対応についての補足

光安全性懸念が報告されている化学物質のほとんどが分子量 500 以下の低分子化合物であり、その平均分子量は 250 と仮定できる。分子量 250 の化合物が終濃度 200 μM となる 50 $\mu\text{g/mL}$ での重量濃度試験で、定法の ROS assay と同等の感度 (100%) であることが確認されている (表 4, 5)。また、同一成分に対し見かけ分子量を 150、200、250、300、350 と仮定した際の各見かけ分子量における感度及び特異度を算出し、見かけ分子量を 250 以上と設定した際に偽陰性結果が認められなかった (表 6, 7)。さらに、光安全性懸念のある植物抽出物を用いた検証において、補遺 2 で記載された各 assay mixture における原料の終濃度を 50 $\mu\text{g/mL}$ (見かけ分子量 250) に調製して実施した ROS assay で偽陰性が認められなかったと報告されている¹⁻²⁾。ただし、植物抽出物のような天然素材は構造式や分子量情報が不明である場合が多く、同じ基原植物であっても抽出部位や抽出方法によって、構成成分や組成が大きく異なる可能性がある。このような場合においては、ROS assay で得られる結果にも大きな影響を及ぼすことが考えられるため、光安全性懸念を示唆する情報がある植物を基原とする場合においては個別に対応する。

表 4 ROS assay 試験結果¹⁾

分類	化粧品成分	その他物質	混合物
感度	100% (17/17)	100% (12/12)	100% (11/11)
特異度	76.9% (10/13)	50.0% (2/4)	55.6% (5/9)
正確度	90.0% (27/30)	87.5% (14/16)	80.0% (16/20)

感度：光毒性物質が ROS assay で陽性を示す割合 (%)

特異度：非光毒性物質が ROS assay で陰性を示す割合 (%)

正確度：ROS assay の判定結果が光毒性物質、非光毒性物質を正しく判定した割合 (%)

表 5 試験に用いられた物質 ¹⁾

分類	光毒性物質 (40 物質)		非光毒性物質 (26 物質)	
化粧品成分 (30 物質)	(17 物質) 4-Methyl-7-ethoxycoumarin 5-Methoxypsoralen 6-Methylcoumarin 7-Methoxycoumarin 8-Methoxypsoralen Benzophenone Bithionol Dichlorophene Fenticlor	Hexachlorophene Methyl β -naphthyl ketone Methyl <i>N</i> -methyl-anthranilate Musk ambrette Musk ketone Musk xylene <i>p</i> -Phenylenediamine Triclocarban	(13 物質) 1,3-Butylene glycol 2-Propanol 3-(-4-Methylbenzylidene)camphor Ascorbic acid Cetyl alcohol Ethanol Glycerin Isopropyl myristate Lauric acid Propylene glycol Sodium laurate Sodium lauryl sulfate Sulisobenzone	
その他物質 (16 物質)	(12 物質) Acridine Amiodarone HCl Chlorpromazine HCl Diclofenac Na Enoxacin Fenofibrate	Indomethacin Ketoprofen Piroxicam Promethazine HCl Sulfanilamide Tetracycline HCl	(4 物質) DMSO Lactic acid Methyl salicylate Penicillin G	
混合物 (20 物質)	(11 物質) Angelica root oil Bergamot oil Celery seed oil Cumin seed oil Grapefruit oil	Lemon oil Lime oil Oil parsley St. John's wort powder Tagetes oil Verbena oil	(9 物質) Carrot oil Corn oil Ginger oil Lemongrass oil	Olive oil Orange oil Rape seed oil Safflower oil Soybean oil

表 6 ROS assay 試験結果 ²⁾

見かけ分子量 (終濃度)	150 (30 $\mu\text{g/mL}$)	200 (40 $\mu\text{g/mL}$)	250 (50 $\mu\text{g/mL}$)	300 (60 $\mu\text{g/mL}$)	350 (70 $\mu\text{g/mL}$)
感度	86.7%	93.3%	100%	100%	100%
特異度	78.9%	73.7%	52.6%	47.4%	36.8%
正確度	84.4%	87.5%	85.9%	84.4%	81.3%

表 7 試験に用いられた物質²⁾

分類	光毒性物質 (45 物質)		非光毒性物質 (19 物質)	
分子量既知 (44 物質)	(34 物質)	Isoniazid Ketoprofen Methyl β -naphthyl ketone Methyl <i>N</i> -methyl- anthranilate Mequitazine Nalidixic acid Octyl dimethyl PABA Ofloxacin Omadine Na Piroxicam Prochlorperazine Maleate Pyridoxine HCl Promethazine HCl Quinine HCl Sparfloxacin Sulfanilamide Tetracycline HCl	(10 物質)	1,3-Butylene glycol 2-Propanol DMSO Ethanol Glycerin Lactic acid Lauric acid Penicillin G Propylene glycol Sulisobenzone
分子量未知 (20 物質)	(11 物質)	Lemon oil Lime oil Parsley oil St. John's wort powder Tagetes oil Verbena oil	(9 物質)	Orange oil Rape seed oil Safflower oil Soybean oil Lemongrass oil Olive oil

引用文献

- 1) Nishida H., Hirota H., Seto Y., Suzuki G., Kato M., Kitagaki M., Sugiyama M., Kouzuki H., Onoue S., 2015. Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools. Regul. Toxicol. Pharmacol, 72, 578-585.
- 2) Ohtake H., Tokuyoshi Y., Iyama Y., Nukaga T., Nishida H., Ohtake T., Hirota M., Yamada K., Seto Y., Sato H., Kouzuki H., Onoue S. 2022. Reactive oxygen species (ROS) assay-based photosafety screening for complex ingredients: Modification of the ROS assay protocol. J. Toxicol. Sci., in press.

補遺 6 3T3 NRU PT (OECDの TG432 改訂)

TG432 の成立後、行政的受け入れで生じた問題点や、その後発出された光安全性評価に関する他の TG との整合性を取る形で2019年にTG432は改訂された¹⁾。本改訂では、基本的内容に対する変更はなく、細かな確認事項の追記が多い。3T3 NRU PT に関する主な改訂点²⁾を注釈にて示す。

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、マウス由来繊維芽細胞の単層培養系を用い、被験物質の光照射下及び非照射下における細胞毒性の違いから光毒性の有無を評価する試験法である。生細胞の判別には Neutral Red (NR) を用いる。NR は弱カチオン性色素であり、能動輸送により細胞膜を透過しリソゾームに蓄積される性質を持つ。細胞死及び細胞傷害を受けると、細胞膜の輸送能低下、リソゾームの脆弱化が起こり NR は蓄積されなくなる原理を応用し、光照射下と非照射下の NR 取り込み量を指標に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

詳細な内容を確認する場合には、2019 年に改訂された TG432¹⁾を参照する。

被験物質・対照物質の準備

96 ウェルマイクロプレート 2 枚を用い、Balb/c 3T3 細胞を 18～24 時間培養後、培養液を除去し、緩衝液 (EBSS、HANKS 液等) で 8 段階に希釈した被験物質及び溶媒対照溶液と交換し、1 時間前培養する。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 (エタノール、DMSO 等) で溶解後、緩衝液を用いて 8 段階に希釈し被験物質溶液を調製する。なお、緩衝液で希釈した際に、濁り又は沈殿が認められる場合もあることから、溶解性を確認し記録する。被験物質の最高適用濃度は 1000 µg/mL を超えない。

陽性対照物質として塩酸クロルプロマジン (CAS No. 69-09-0) を用いる。

- 注 1) TG432 改訂にて、被験物質は用時調製ではなく当日調製可能と変更された。
- 注 2) ラジカルスカベンジャーである DMSO を利用可能な溶媒とすべきかについては様々な意見があったが、難水溶性物質の溶媒として最適という理由から外せないとの意見も多く、残された。また、DMSO やエタノールを用いた詳細な調製法が追記された。
- 注 3) TG432 改訂にて、溶解度限界と無細胞毒性の考え方として「沈殿がみられる濃度まで細胞毒性がない被験物質については、試験条件下での溶解限界を示すことが有効な場合がある。その場合、沈殿を示す 2、3 点の濃度を実験に含め、それらのデータは解析から除外する」という考え方が追記された。

光照射

1 時間の前培養後、プレート的一方は光を照射し、もう一方は遮光し静置する。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 J/cm^2 とする。照射後、被験物質溶液を除去し培養液に交換し、18～24 時間培養する。

NR 測定

培養後、NR を含む培養液にて 3 時間培養し、NR を取り込ませる。その後、細胞内に取り込まれた NR を抽出し吸光度測定を行い、溶媒対照を細胞生存率 100% として被験物質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。

- 注 1) TG432 改訂にて追加された論文³⁻⁴⁾により、NR のメカニズムに関する記載が追記された。具体的には、NR は中性付近 pH では帯電しないが、リソソーム内腔の低 pH でトラップされる。光毒性物質は、ROS の形成及びリソソーム膜の透過性の増加、pH 勾配の減少等を通じて細胞損傷を誘発する可能性がある。生体異物によるこのような変化が NR の受入れと結合を減少させるため、生存細胞と損傷細胞又は死細胞を区別することが可能である。
- 注 2) 培地中 NR の結晶化は大きな誤差を生じる可能性があることから、フィルターろ過や遠心等による追加手順が推奨される旨が追記された。

1-2-2. 判定

本試験法は光毒性の有無を定性的に判断する試験系である。結果の評価法としては、Photo Irritant Factor (PIF) の算出と Mean Photo Effect (MPE) の算出の 2 つの方法がある¹⁾。なお、PIF 及び MPE を算出するソフトウェアパッケージは OECD から入手可能である⁵⁾。どちらの評価軸を用いても評価結果に差は無いことが確認されており、それぞれの値を用いた光毒性ポテンシャルの判定基準を表 8 に示す。

PIF の算出

PIF は光照射下 (UV+) と非照射下 (UV-) の細胞 50% 生存濃度 (IC₅₀) 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 の算出

MPE は光の非照射下から照射下への用量－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と濃度方向における移動率を掛け合わせた値の平均値である。

表 8 PIF 及び MPE による光毒性判定基準

Prediction	PIF		MPE
No phototoxicity	PIF < 2	or	MPE < 0.1
Equivocal phototoxicity*	2 ≤ PIF < 5	or	0.1 ≤ MPE < 0.15
Phototoxicity	5 ≤ PIF	or	0.15 ≤ MPE

* TG432 改訂にて probable phototoxicity から equivocal phototoxicity へ変更された。

被験物質が PIF < 2 あるいは MPE < 0.1 の場合は光毒性陰性、PIF ≥ 2 あるいは MPE ≥ 0.1 の場合は光毒性陽性と判定する。ただし、溶解性の問題がある場合、陽性判定はできるが陰性判定はできない。

2. 試験実施上の留意点

2-1. 試験実施における各種条件及び注意事項

新たに試験を実施する試験施設では、3T3 NRU PT の習熟度確認物質（補遺 7）等を活用し精度の向上に努めなければならない。

モル吸光係数 (MEC) の確認

MEC が 1,000 L mol⁻¹ cm⁻¹ 未満であれば、被験物質は光反応性を起こす可能性は低い。そのような物質は、3T3 NRU PT又は光有害反応を検討する他の生物学的試験を実施する必要がない。

注 1) TG432 改訂において、MEC が 10 から 1,000 に引き上げられた。TG495 ROS assay との整合性を考慮した上で、変更された。

培養細胞

バリデーションに用いられた Balb/c 3T3 clone A31 細胞（CCL-163：ATCC 又は 86110401：ECACC）が推奨される。細胞の UVA 感受性は継代数に伴って増加する可能性があることから、最低継代数の Balb/c 3T3 細胞（100 未満が望ましい）を用いる。他の細胞又は細胞株を同手順で用いることが可能であるが、習熟度確認物質（補遺 7）における反応が適切である等の同等性を示す。

注 1) TG432 改訂にて、他の細胞又は細胞株を用いる場合は Guidance Document No. 34⁶⁾ に従い同等性を確認することが追記された。また、細胞の継代数が多い場合は UV 感度について説明することが記載された。

光源及び照射光

適切な光源とフィルターを選択することが重要である。照射光は、細胞毒性の強い UVB を適切に減弱させるフィルターを通した UVA と可視光領域の光を照射する。光源は、ソーラーシミュレーターとしてキセノンランプ若しくは水銀メタルハライドランプが推奨される。太陽光との近似性はキセノンランプの方が高いとされているが、水銀メタルハライドランプは放熱が少なく安価という点がメリットとして挙げられている。光源の種類やフィルターによって UV 強度に差異が生じ、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、予め光源の波長特性の把握と試験条件下での十分な背景データを得ておく必要がある。

注 1) TG432 改訂にて、光源や受入れ基準について、より詳細に明記された。

照度測定

照度は適切な広域 UVA 測定器を用いて試験前に定期的に確認する。試験に用いるのと同種類の 96 ウェルプレートの蓋を通して照度を測定する。

照射量 5 J/cm²（UVA 領域にて測定）は Balb/c 3T3 細胞に毒性がなく、光毒性反応を惹起するのに化学物質を励起する十分な量である⁷⁻⁸⁾。照度 1.7 mW/cm² で 50 分間照射すると照射量は 5 J/cm² となる。以下の式を用いて異なる照射時間と照度を使用することも可能であるが、その場合には習熟度確認物質（補遺 7）における反応が適切である等の同等性を示す必要がある。

$$\text{照射時間 (min)} = \frac{\text{照射量 (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{照度 (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ W sec})$$

注 1) TG432 改訂にて、UVA 測定器の較正は、同一の光源やフィルターを有する中央較正施設で実施すべきと追記された。

光照射に対する細胞の感受性と背景データの確立

光照射に対する細胞の感受性を、試験に用いる最大継代数の細胞で確認することが推奨される。本試験に用いるよりも高い照射量を含むいくつかの照射量を用いる。非細胞毒性の最高照射量（バリデーション試験では 5 J/cm^2 ）は、習熟度確認物質（補遺 7）を用いて正しく分類できていることを示す。

その他

本試験法は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⁹⁻¹⁰⁾。

2-2. 試験成立条件について

以下の条件を満たした場合にのみデータを採用する。

- (1) 溶媒対照の細胞生存性：光照射下及び非照射下における各プレートの溶媒対照の平均吸光度の値が 0.4（溶媒による背景データの約 20 倍）以上であること。
- (2) 光照射に対する細胞の感受性：非照射下に対する照射下の溶媒対照群の細胞生存率が 80% 以上であること。
- (3) 陽性対照に対する感受性：陽性対照物質の $\text{IC}_{50}(\text{UV-})$ 、 $\text{IC}_{50}(\text{UV+})$ 及び MPE が妥当な範囲にあり、PIF 値が 6 以上であること。

なお、(3) における妥当な範囲は、3T3 NRU PT 開発施設が設定した上限・下限値（ $\text{IC}_{50}(\text{UV-})$: $7.0 \sim 90.0 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 、 $\text{IC}_{50}(\text{UV+})$: $0.1 \sim 2.0 \text{ } \mu\text{g/mL}$ 、MPE : $0.33 \sim 0.63$ ）を指す。

2-3. ベンチマーク物質との相対評価

3T3 NRU PT で陰性結果が得られない場合、被験物質に関連したベンチマーク物質との相対評価を行うこともできる。

2-4. 技術的に試験に適用することが困難な物質及び予測性に関して限界がある物質

様々な構造を有する化学物質の光毒性の予測が可能であることが示されているが⁹⁻¹⁰⁾、被験物質に対する本試験法の適否を判断する際には以下の点について考慮する必要がある。

2-4-1. 技術的に試験に適用することが困難な物質

- (1) 溶媒に溶解しない物質又は溶媒中で安定的に均一に分散しない物質

2-4-2. 予測性に関して限界がある物質

(1) 難水溶性の物質

本試験法は単層細胞培養系であるため、溶解性に問題がある被験物質は評価が困難である。緩衝液で希釈した被験物質溶液に濁り又は沈殿物が観察される場合、陽性判定はできるが、陰性判定から光毒性が陰性と判断することはできない。

(2) 著しく培養系に影響を与える物質（例：浸透圧や pH 等）

3. 引用文献

- 1) OECD, 2019, OECD Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071162-en.pdf?expires=1631607250&id=id&ac_cname=guest&checksum=8C7791EDD86F693111AE5484758418F1, Accessed April 4th 2022
- 2) Onoue S., Kouzuki H., Toyoda A., Fueki O., Hosoi K., Kojima H., Ashikaga T., Onodera H., 2021. Current Issues in Photosafety Evaluation. Yakugaku Zasshi 141, 111-124
- 3) Brunk U. T., Svensson I., 1999. Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak. Redox. Rep. 4, 3-11.
- 4) Johansson A.C., Appelqvist H., Nilsson C., Kågedal K., Roberg K., Ollinger K., 2010. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. Apoptosis 15, 527-540.
- 5) Software to be used with TG 432: phototox version 2.0.
Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4software.htm>, Accessed April 4th 2022
- 6) OECD, 2005, OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 34. GUIDANCE DOCUMENT ON THE VALIDATION AND INTERNATIONAL ACCEPTANCE OF NEW OR UPDATED TEST METHODS FOR HAZARD ASSESSMENT.
Available at: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd34.pdf>, Accessed April 4th 2022
- 7) Spielmann H., Balls M., Brand M., Döring B., Holzhütter H.G., Kalweit S., Klecak G., Eplattenier H.L., Liebsch M., Lovell W.W., Maurer T., Moldenhauer F., Moore L., Pape W.J., Pfannenbecker U., Potthast J., de Silva O., Steiling W., Willshaw A., 1994. EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxicol. In Vitro 8, 793-796.
- 8) Spielmann H., Balls M., Dupuis J., Pape W.J., de Silva O., Holzhütter H.G., Gerberick F., Liebsch M., Lovell W.W., Pfannenbecker U., 1998. A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Altern. Lab. Anim. 26, 679-708.
- 9) Ohno, Y. Itagaki, H. Okamoto Y., Tanaka N., Oomori T., Kojima, H., Hatao, M., Kaneko T., Imai,

- K. and Wakuri S., 2004. Pilot study of the evaluation of alternative toxicity tests. Evaluation of 3T3-NRU phototoxicity tests. AATEX 10, 50-142.
- 10) Personal Care Products Council (PCPC), 2014. Evaluation of Photoirritation and Photoallergy Potential. PCPC 2014 Safety Evaluation Guidelines Chapter 7, 83-99.

補遺 7 3T3 NRU PT の習熟度確認物質

表 9 3T3 NRU PT の習熟度確認物質リスト

化学物質名	CAS 番号	PIF	MPE	Phototoxic	Absorption Peak
Amiodarone HCL	19774-82-4	>3.25	0.27-0.54	Yes	242 nm 300 nm (shoulder) in ethanol
Chlorpromazine HCL	69-09-0	>14.4	0.33-0.63	Yes	309 nm in ethanol
Norfloxacin	70458-96-7	>71.6	0.34-0.90	Yes	316 nm in acetonitrile
Anthracene	120-12-7	>18.5	0.19-0.81	Yes	356 nm in acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium	50865-01-5	>45.3	0.54-0.74	Yes	402 nm in ethanol
L-Histidine	71-00-1	No PIF	0.05-0.10	No	211 nm in water
Hexachlorophene	70-30-4	1.1-1.7	0.00-0.05	No	299 nm 317 nm (shoulder) in ethanol
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	1.0-1.9	0.00-0.05	No	No absorption in water

略号等：

CAS 番号：Chemical Abstracts Service Registry Number (CASRN)

補遺 8 本評価フローの光毒性予測

表10 本評価フローの光毒性予測結果

	Chemical name	CAS No.	Photo-irritation	Ref.	MEC (L/mol/cm)	Ref.	ROS/mROS assay	Ref.	3T3 NRU PT	Ref.	評価フロー判定結果
1	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	+	1	>10,000	2	+ ^a	2	+	3	+
2	5-Methoxypsoralen	484-20-8	+	2	>10,000	2	+ ^a	2	+	3	+
3	6-Methylcoumarin	92-48-8	+	1	>1,000	2	+	2	+	3	+
4	8-Methoxypsoralen	298-81-7	+	1	>10,000	2	+	2	+	3	+
5	Acridine	260-94-6	+	2	>10,000	2	+	2	+	3	+
6	Amiodarone HCl	19774-82-4	+	1	>1,000	2	+ ^a	2	+	3	+
7	Anthracene	12012-7	+	2	>1,000	2	+ ^a	2	+	3	+
8	Benzophenone	119-61-9	+	1	>1,000	2	+	2	+	3	+
9	Bithionol	97-18-7	+	1	>10,000	2	+	2	+	3	+
10	Chlorpromazine HCl	69-09-0	+	1	>1,000	2	+	2	+	3	+
11	Diclofenac Na	15307-79-6	+	1	>1,000	2	+	2	+	4	+
12	Doxycycline HCl	10592-13-9	+	1	>10,000	5	+	5	+	3	+
13	Enoxacin	74011-58-8	+	1	>10,000	2	+	2	+	3	+
14	Fenofibrate	49562-28-9	+	2	>10,000	2	+ ^a	2	+	3	+
15	Furosemide	54-31-9	+	1	>1,000	5	+	5	+	3	+
16	Griseofulvin	126-07-8	+	1	>10,000	6	+	7	— ^b (Inc.)	8	Inc.
17	Hydrochlorothiazide	58-93-5	+	1	>1,000	6	+	7	— ^b (Inc.)	8	Inc.
18	Indomethacin	53-86-1	+	2	>1,000	2	+	2	— ^b (Inc.)	8	Inc.
19	Ketoprofen	22071-15-4	+	1	>1,000	2	+	2	+	3	+

20	Lomefloxacin HCl	98079-52-8	+	1	>10,000	9	+	7	+	3	+
21	Methyl β -naphthylketone	93-08-3	+	2	>1,000	2	+	2	+	3	+
22	Methyl-N-methylantranilate	85-91-6	+	2	>1,000	2	+	2	+	3	+
23	Nalidixic acid	389-08-2	+	1	>1,000	5	+	5	+	3	+
24	Naproxen	22204-53-1	+	6	>1,000	6	+	7	+	3	+
25	Norfloxacin	70458-96-7	+	5	>10,000	5	+	5	+	3	+
26	Ofloxacin	82419-36-1	+	1	>10,000	5	+	5	+	3	+
27	Piroxicam	36322-90-4	+	1	>10,000	2	+	2	— ^b (Inc.)	8	Inc.
28	Promethazine HCl	58-33-3	+	1	>1,000	2	+	2	+	3	+
29	Pyridoxine HCl	58-56-0	+	1	>1,000	10	+	10	+	3	+
30	Quinine	130-95-0	+	1	>1,000	2	+	2	+	3	+
31	Rose Bengal	632-69-9	+	5	>10,000	5	+	5	+	3	+
32	Sparfloxacin	110871-86-8	+	1	>10,000	11	+	7	+	3	+
33	Tetracycline HCl	64-75-5	+	1	>10,000	2	+	2	+	3	+
34	Tribromsalan (3,5,4'-Tribromosalicylanilide)	87-10-5	+	1	>10,000	2	+ ^a	2	+	3	+
35	1,3-Butylene glycol	107-88-0	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
36	2-Propanol	67-63-0	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
37	4-Methyl benzylidene camphor	36861-47-9	—	2	>10,000	2	— ^a (Inc.)	2	— ^b (Inc.)	2	Inc.
38	Ascorbic acid	50-81-7	—	2	<1,000	2	+	2	—	3	—
39	Aspirin	50-78-2	—	10	<1,000	5	—	5	—	3	—
40	Benzocaine	94-09-7	—	10	>10,000	5	—	5	—	3	—
41	Cetyl alcohol	36653-82-4	—	2	<100	2	—	2	—	3	—

42	Cinnamic aldehyde	104-55-2	—	9	>1,000	9	—	9	—	3	—
43	DMSO	67-68-5	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
44	Erythromycin	114-07-8	—	10	<100	5	—	7	—	3	—
45	Ethanol	64-17-5	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
46	Glycerin	56-81-5	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
47	Hexachlorophene	70-30-4	—	1	>1,000	5	+	5	—	2	—
48	Isopropyl myristate	110-27-0	—	2	<100	2	— ^a (Inc.)	2	— ^b (Inc.)	2	—
49	Lactic acid	50-21-5	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
50	Lauric acid	143-07-7	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
51	L-histidine	71-00-1	—	5	<100	5	+	5	—	3	—
52	Methyl salicylate	119-36-8	—	2	>1,000	2	+	2	—	3	—
53	Octyl salicylate	118-60-5	—	10	>1,000	4	— ^a (Inc.)	7	— ^b (Inc.)	12	Inc.
54	Penicillin G	61-33-6	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
55	Phenytoin	57-41-0	—	5	<100	5	—	7	—	3	—
56	Propylene glycol	57-55-6	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
57	Sodium laurate	629-25-4	—	2	<100	2	—	2	—	3	—
58	Sodium lauryl sulfate	151-21-3	—	2	<100	2	— ^a (Inc.)	2	—	3	—
59	Sulisobenzone	4065-45-6	—	2	>10,000	2	—	2	—	3	—

+：陽性、—：陰性、Inc.：Inconclusive

^a Tween 20 を添加した micellar ROS assay (mROS) 結果。mROS 陰性結果は Inconclusive とした。

^b 溶解性の問題で IC50 を算出できていないことから Inconclusive とした。

引用文献

- 1) Onoue S., Seto Y., Sato H., Nishida H., Hirota M., Ashikaga T., Api A.M., Basketter D., Tokura Y., 2017. Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments. *J. Dermatol. Sci.* 85, 4–11.
- 2) Onoue S., Suzuki G., Kato M., Hirota M., Nishida H., Kitagaki M., Kouzuki H., Yamada S., 2013. Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties. *Toxicol. In Vitro* 27, 2316–2324.
- 3) Schmidt F., Wenzel J., Halland N., Güssregen S., Delafoy L., Czich. A., 2019. Computational Investigation of Drug Phototoxicity: Photosafety Assessment, Photo-Toxophore Identification, and Machine Learning. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 2338-2352.
- 4) Garcia-Lainez G., Martínez-Reig A. M., Limones-Herrero D., Consuelo Jiménez M., Miranda M. A., Andreu I., 2018. Photo(geno)toxicity changes associated with hydroxylation of the aromatic chromophores during diclofenac metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 341, 51-55.
- 5) Onoue S., Hosoi K., Wakuri S., Iwase Y., Yamamoto T., Matsuoka N., Nakamura K., Toda T., Takagi H., Osaki N., Matsumoto Y., Kawakami S., Seto Y., Kato M., Yamada S., Ohno Y., Kojima H., 2013. Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1241–1250.
- 6) Henry B., Foti C., Alsante K., 2009. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? *J. Photochem. Photobiol. B.* 96, 57-62.
- 7) Seto Y., Kato M., Yamada Y., Onoue S. 2013. Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27. 1838-1846.
- 8) Kleinman M. H., Smith M. D., Kurali E., Kleinpeter S., Jiang K., Zhang Y., Kennedy-Gabb S. A., Lynch A. M., Geddes C. D., 2010. An evaluation of chemical photoreactivity and the relationship to phototoxicity, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 58, 224-232.
- 9) Nishida H., Ohtake T., Ashikaga T., Hirota M., Onoue S., Seto Y., Tokura Y., Kouzuki H., 2021. In chemico sequential testing strategy for assessing the photoallergic potential. *Toxicol. In Vitro* 77, 105235.
- 10) Onoue S., Ohtake H., Suzuki G., Seto Y., Nishida H., Hirota M., Ashikaga T., Kouzuki H., 2016. Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens. *Toxicol. In Vitro* 33, 147–152.
- 11) Schümann J., Boudon S., Ulrich P., Loll N., Garcia D., Schaffner R., Streich J., Kittel B., Bauer D., 2014. Integrated Preclinical Photosafety Testing

Strategy for Systemically Applied Pharmaceuticals, *Toxicol. Sci.* 139, 245–256.

- 12) Spielmann H., Balls M., Dupuis J., Pape W.J., de Silva O., Holzhütter H.G., Gerberick F., Liebsch M., Lovell W.W., Pfannenbecker U., 1998. A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. *Altern. Lab. Anim.* 26, 679-708.