

## 5) 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

(株) 資生堂 ライフサイエンス研究センター

## 1. はじめに

光毒性の発現メカニズムは、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を想定して、これまでにいくつかの*in vitro*の光毒性試験法が検討されてきた。細胞膜への影響をとらえる試験法には、赤血球溶血試験法及び蛋白質や脂質の光酸化を検討する方法がある。また、細胞膜及び細胞内小器官への影響を検討する試験法として、酵母生育阻害試験法、培養細胞を用いる毒性試験法及び3次元培養モデルを用いた毒性試験法がある。なお、これらの細胞毒性試験法のendpointとしては、細胞の生死を色素の取り込み法で検討する方法と炎症性サイトカインや各種メディエーターの放出を指標とする方法がある。

これらの*in vitro*試験法により、光毒性の発現に関する情報がある程度得られることは比較的早くから知られている。しかし、光毒性試験代替法として、*in vivo*との対応性に関する研究や統一プロトコールでの比較検討等は最近まで行われていない。

## 2. EU/COLIPA バリデーション

EU/COLIPAバリデーションPhase I<sup>1)</sup>はこのような種々の代替法のうち、スクリーニングを目的とする8種類の試験法(酵母、ヒトリンパ球、ヒト角化細胞、3T3細胞を用いた増殖抑制試験や市販キットSOLATEX-PI<sup>TM</sup>及びSKIN2<sup>TM</sup>を用いる方法等)と作用

メカニズムの検討を目的とする6種類の試験法(赤血球溶血、ヘモグロビンやヒスチジンの光酸化、蛋白結合性、リノール酸過酸化試験等)を選び、施設間で大規模な評価検討(validation study)を行ったものである。

被験物質には紫外部吸収を持つ光毒性物質11種類、紫外部吸収を持つ非光毒性物質5種類及び紫外部吸収を持たない非光毒性物質4種類の合計20種類が選定され、*in vivo*データは主にヒト光パッチテストデータや症例報告と動物データを基に判断されている(表-1)。

Phase Iの検討の結果、11種類の光毒性物質をすべて陽性にとらえることができ、施設間のバラツキも少なかった3T3細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法(3T3 NRU PI法)が光毒性物質と非光毒性物質を検出するスクリーニング法として最適と判断された(表-2)。

EU/COLIPAバリデーションPhase Iで検討された物質は、既知の光毒性物質や医薬品用の薬剤を含むが、化粧品関連の原料が少なかった。そこで、Phase Iの検討で用いられた被験物質Chlorpromazine、6-Methylcoumarine(6-MC)、3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)、8-Methoxypsoralen(8-MOP)、Bithionol、Piroxicam、Rose bengal及び2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid(Uvinul MS40)を含む、香料成分8種類、紫外線吸収剤4種類、薬剤4種類、殺菌剤4種類及び色剤3種類の合計23種類の被験物質(表-3)を選定し、培養細胞を用いた光細胞毒性試験法の有用性を弊社において検討した。

## 3. 光細胞毒性試験

試験方法は、EU/COLIPAバリデーション

表 -1

EU/COLIPA validation : 被験物質と *in vivo* 結果

chemical	Phototoxicity <i>in vivo</i> *	
	Human	Animal
class I ; UV-absorbing, phototoxic		
Promethazine	+	+/-
Chlorpromazine	++	++
6-Methylcoumarin	A	A
TCSA	A	+
Doxycycline	+	+
8-MOP	++	++
Tetracycline	+	+
Amiodarone	+	+
Bithionol	+	+
Neutral red	+	
Rose bengal	+/-	-
class II ; UV-absorbing, non-phototoxic		
Piroxicam	(+)	-
Cinnamic aldehyde	A	A
Chlorhexidine		
Uvinul MS 40	+/-	
PABA	A	
class III ; non-UV-absorbing, non-phototoxic		
Penicillin G		
L-Histidine		
Thiourea	A	
Sodium lauryl sulfate		

\* +=phototoxic; -=non-phototoxic; +/-=inconclusive; A=photoallergen

H. Spielmann et al. EEC/COLIPA PROJECT ON IN VITRO PHOTOTOXICITY TESTING:  
FIRST RESULTS OBTAINED WITH A BALB/C 3T3 CELL PHOTOTOXICITY ASSAY,

Toxicology in Vitro, vol. 8 793-796, 1994.

プログラムに従った<sup>2)</sup>が、使用した照射光源は異なるものを用いた (EU/COLIPA ; 照射波長約 300 ~ 700nm、弊社 ; 照射波長 320 ~ 400nm)。弊社で実施した試験方法を以下に、また、EU/COLIPA との試験条件の比較を表-4 に示した。

#### 試験法

1) 96 穴マイクロプレートに BALB/3T3 Clone A31 細胞  $3 \times 10^4$  cells/well を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間前培養を行う。

2) 被験物質を PBS を用いて調整する。非水溶性物質では まず DMSO を用いて調整し、DMSO の最終濃度が 1% になるように PBS にて希釈する。前培養を行ったプレートの培地を捨て、被験物質 PBS 溶液を添加

後、1 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養後 UVA5J/cm<sup>2</sup> を照射する。プレートは照射用、非照射用を用意し、非照射用プレートは遮光して室温で放置する。

3) 照射終了後、照射用、非照射用プレートの被験物質を捨て、PBS で洗浄後、培地を添加する。さらに 24 時間培養し、ニュートラルレッド取り込み法で両プレートの細胞生存率を算出し、EC<sub>50</sub> 値 (50% 細胞生存濃度) を求める。

光照射の有無による EC<sub>50</sub> 値の比 (EC<sub>50</sub> UV(-)/EC<sub>50</sub> UV(+)) を光毒性 factor とし、評価のカットオフ値は EU/COLIPA と同様に 5 以上を陽性とした。In vivo データは弊社既存データを採用し、本検討のための再実験

表 2

EU/COLIPA validation : 試験結果の要約

chemical	Mechanistic assays				Commercial assay				Growth inhibition assay			Phototoxicity: in vivo *		
	histidine photooxidation	RBC photolysis	RBC photohb oxidation	SKIN ZK 1300	SO-LATEX PI	SKIN ZK 1350	yeast growth inhibition	human lymphocytes MTT	human keratinocytes NRU	COMMON standard	3T3-NRU assay	Human	Animal	
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
class I : UV-absorbing, phototoxic														
Promethazine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
Chlorpromazine	+	+	-	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	++
6-Methylcoumarin	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	A
TCSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	A
Doxycycline	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8-MOP	+	-	(+)	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Tetracycline	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Amiodarone	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bithionol	-	+	+	+	+/	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Neutral red	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Rose bengal	++	+	(+)	+	+	+	+	n.l.	+	+	+	+	+	+/-
class II : UV-absorbing, non-phototoxic														
Proxycam	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
Cinnamic aldehyde	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
Chlorhexidine	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uvinal MS 40	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
PABA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
class II : non-UV-absorbing, non-phototoxic														
Penicillin G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thiourea	-	-	-	-	not qualified	-	-	-	-	-	-	-	-	A
SDS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*=phototoxic; -=non-phototoxic; +/-=inconclusive; A=photoallergen

H. Spielmann et al. ECCOLIPA PROJECT ON IN-VITRO PHOTOTOXICITY TESTING: FIRST RESULTS OBTAINED WITH

A BALB/C 3T3 CELL PHOTOTOXICITY ASSAY. Toxicology in Vitro, vol. 8, 793-796, 1994.

表 -3

## 弊社での検討：被験物質とモルモットによる光毒性試験結果

被験物質	<i>in vivo</i> モルモット*
香料 (8)	
Musk ambrette	-
Musk ketone	-
Musk xylene	-
Phantolid	+
Galaxolide 50 (Galaxolide 50% in diethyl phthalate)	+
8-Methoxypsoralen (8-MOP)	+
5-Methoxypsoralen (5-MOP)	+
6-Methylcoumarin (6-MC)	-
紫外線吸収剤 (4)	
2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX)	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (Oxybenzone, ASL-24)	-
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone- 5-sodium sulfate (Benzophenone-5, ASL-24S)	-
2-Ethylhexyl-p-dimethyl-aminobenzoate (Escalol 507)	±
薬剤 (4)	
Sulfanilamide	-
Indomethacin	-
Piroxicam	-
Chlorpromazine HCl(CPZ)	+
殺菌剤 (4)	
3,4,4'-Trichlorocarbanilide(TCC)	-
Bithionol	-
3,4',5-Tribromosalicylanilide(TBS)	-
3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilide(TCSA)	+
色剤 (3)	
Rose bengal	-
Acridine	+
Anthracene	+

\* -: 0-0.5, ±: 0.6-1.2, +: 1.3-5.0

は実施しなかった。EU/COLIPAでは *in vivo* (+)に評価されている Bithionolが弊社 *in vivo* データでは(-)に評価されていたが、動物種、濃度、溶媒等の違いに起因すると考えられた。

## 4. 試験結果

BALB/3T3 Clone A31 細胞を用いた光細胞毒性試験法では、EU/COLIPA バリデーション Phase Iの検討で用いられた被験物質 8種類に関して、TCSA 及び Rose bengal を除いて評価結果は一致した<sup>3,4)</sup>。TCSA に関

しては光毒性 factor は5以下であったが、光照射による EC<sub>50</sub> 値の低下が認められていることから、ポテンシャルは確認された。Rose bengal に関しては、吸収スペクトルが UVA 領域よりさらに長波長領域まで存在しているため<sup>5)</sup>、光源の違いが影響したのかもしれない。検討した被験物質 23 種類の結果について *in vivo* との対応性の観点からまとめると、感度 67%、特異性 80%、予測値 (+)67%、予測値(-)80%、相関性 73% で対応性は良好であった (表-5)<sup>3,4)</sup>。しかしながら、false negative と評価される物質も 3 種類 (Galaxolide 50、Phantolid、TCSA) 認め

表-4  
光細胞毒性試験法におけるプロトコルの比較

	EU/COLIPA validation	弊社での検討
細胞名	BALB/C 3T3 cells, clone 31 マウス由来 線維芽細胞	BALB/3T3 clone A31 マウス由来 線維芽細胞
播種細胞数	10000 cells/well, 100 ml	30000 cells/well, 100 ml
前培養時間	24 時間	24 時間
被験物質の調整	EBSS (Earle's balanced salt solution) 難溶性物質はDMSO に希釈し 1% 以下で添加	PBS (Phosphate buffered saline) 難溶性物質はDMSO に希釈し 1% 以下で添加
紫外線照射	UVA 5J/cm <sup>2</sup> ソーラーシミュレーター SOL500 light source Dr.Honle, Germany λ =300~ 700 nm mercury-metal halide lamp (1.67 mW/cm2 for 50 min)	UVA 5J/cm <sup>2</sup> UVA ランプ Transilluminator Vilber Lourmat, France λ =320~400 nm, λ <sub>max</sub> =365nm  (1.59 mW/cm2 for 53 min)
後培養時間	24 時間	24 時間
end point	NR 取り込み法	NR 取り込み法

表-5  
*in vitro*(Balb/3T3 cells)と *in vivo*の対応性

<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	+	±	-
+		8-MOP CPZ Anthracene	Escatol 507	Musk ambrette 6-MC Bithionol
		5 品	1 品	3 品
		Galaxolide 50 Phantolid TCSA	0 品	Musk ketone Parsol MCX ASL 24S Piroxicam Rose bengal TBS Musk xylene ASL 24 Sulfanilamide TCC Indomethacin
		3 品	0 品	11 品

感度 (Sensitivity)	67%
特異性 (Specificity)	80%
予測値 (+) (Positive predictive value)	67%
予測値 (-) (Negative predictive value)	80%
相関性 (Equivalence)	73%
False negative	Galaxolide 50 Phantolid TCSA

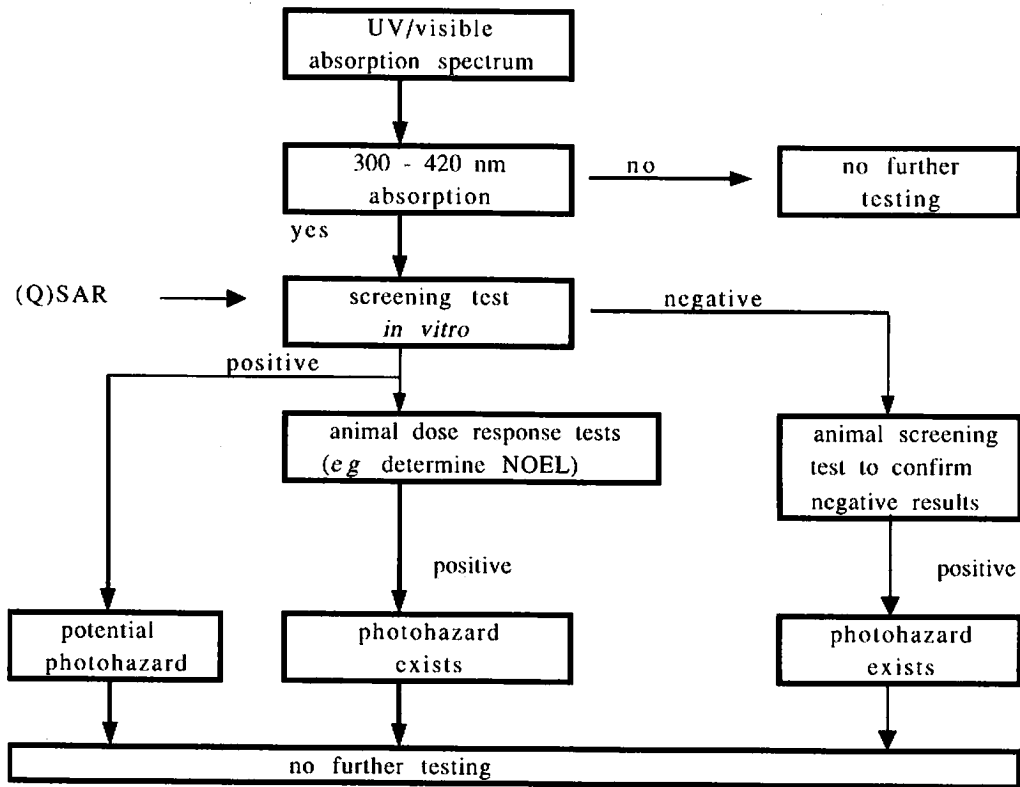
られた。なお、false negative となった物質のうち Galaxolide 50 及び Phantolid は、高濃度において光毒性が発現する比較的光毒性の弱い物質であった。

False positive になった3種類の物質は、Musk ambrette、6-MC 及び Bithionol であった。このうち、Bithionol は EU/COLIPA では

光毒性物質として分類されており、光毒性のポテンシャルがあると考えられる。また、Musk ambrette 及び 6-MC は光アレルギー性物質として知られており、本試験法では光毒性と光アレルギー性の区別なく、光増感物質としてとらえられたものと考えられた。また、Phase I の評価では、ヒトケラチノ

図 - 1

光毒性評価システムに関する OECD ガイドライン案(1995)



Paris, 15, Feb. 1995

サイト、ヒトリンパ球を用いた毒性試験も検討され、BALB/3T3 線維芽細胞が最も感度が良好との結論が出されている。そこで現在、細胞種差に関しても検討を加えている。

### 5. 光細胞毒性試験法の有用性と問題点

光細胞毒性試験法の有用性と問題点について以下にまとめた。

#### 有用性 (メリット)

- ・細胞膜破壊のみでなく、DNAを含む細胞核や細胞内小器官への障害を発現機序とした光毒性をとらえることができる。

- ・ *In vivo* との対応性が比較的良好。

- ・ EU/COLIPA バリデーションにて最も推奨されている方法である。

#### 問題点 (デメリット)

- ・ 難水溶性の被験物質の場合、試験が適

切に実施できないことがある。

特に、被験物質の析出等により非照射の毒性が不正確になると、光毒性 factor 及び評価に影響が出やすいと考えられる。

- ・ 難水溶性の被験物質の場合、溶媒として DMSO を用いるが、これは一重項酸素消去剤として働く可能性があり、結果を慎重に考察する必要がある。

- ・ 23 種類の被験物質でも false negative が存在することから、本試験法のみでのスクリーニングでは光毒性物質を見逃す危険性がある。

### 6. 3T3 NRU 法が OECD ガイドラインに採用された場合の実施に関する問題点

光細胞毒性試験法には上記のような問題点が考えられるが、EU/COLIPA バリデーションプログラムのプロトコルでの実施

表-6  
In vivo 光毒性試験に関する OECD ガイドライン案

Acute Dermal Photoirritation		Acute Dermal Photoirritation	
	Dose-Response Test		Screening Test
動物種	ツナギを最も勤めるが、モルモットでも可能 (多濃度水準の試験が可能な皮膚面積が必要なため) (試験系を考慮すればラットやマウスでも可能)	同左	
匹数	10匹	最低3匹	
照射	慣習的に UVA が用いられる 照射エネルギーは10J/cm <sup>2</sup> 等 UVBも用いる場合は、約0.1 J/cm <sup>2</sup> (紅斑の出ない Dose)	同左	
適用	0.025 ml/1.5×1.5 cm <sup>2</sup> 6匹を照射し、4匹を非照射とする 未希釈または紅斑のほとんど出ない濃度を最高濃度として、 配合量やヒトに対する安全性保証を考慮した多段階濃度設定	0.025 ml/1.5×1.5 cm <sup>2</sup> 未希釈または紅斑のほとんど出ない濃度を適用 照射部位と非照射部位を設ける	
判定	1, 4, 24, 48, 72 時間後に紅斑と浮腫を判定	同左	
評価	非照射、溶媒対照などを考慮して NOAEL を決定	非照射、溶媒対照などを考慮して評価	

が義務づけられた場合を想定して、問題点を以下に示す。

- ・難水溶性の被験物質では正確な評価ができない可能性がある。

- ・皮膚科領域での光過敏症の試験では慣習的に照射光源として UVA ランプが多く用いられており、ソーラーシミュレーターを用いる光細胞毒性試験との整合性や対応性に疑問が生じる。

- ・ヒトに対する光毒性評価を目的としているため、細胞種としてマウス由来の 3T3 細胞に限定する必要はないと考える。

## 7. 光毒性評価に関する OECD ガイドライン (案) について

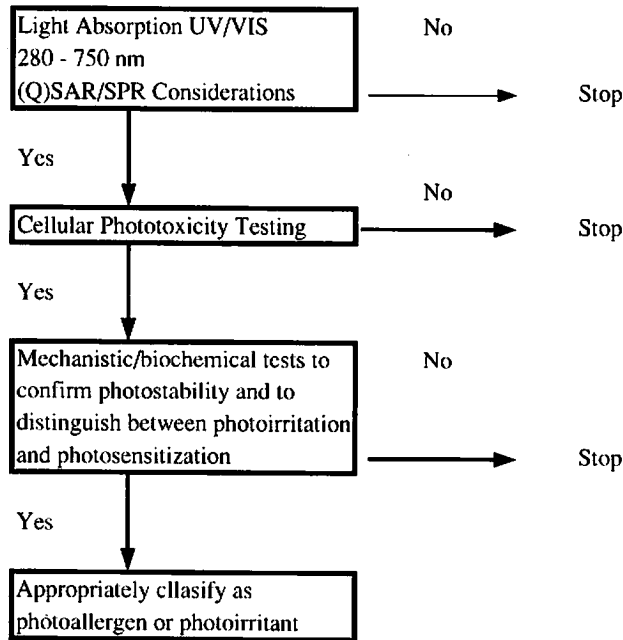
1995年に提示された光毒性評価システムに関する OECD ガイドライン(案)(図-1)では、まず紫外外部吸収(320-420 nm)の有無を確認し、紫外外部吸収の認められたものについてのみ *in vitro* 試験を行う。スクリーニングに用いられる *in vitro* 試験としては、3T3 NRU PI法が採用されると思われる。*In vitro* 試験の結果、陰性の場合には動物を用いて確認し、陽性の場合には動物を用いて最大無作用濃度を求める評価システムになっている。

*In vivo* 光毒性試験法に関しては、1995年2月にドラフトが作成され、それに対するコメントが求められているが、それ以降の動きは現在のところまだ見られない。このドラフトは、「Acute Dermal Photoirritation

Screening Test」と「Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test」の2部で構成され、実施にあたっての理念として“動物福祉の観点から無用な動物実験を行わないようにする”ため、目的に合わせた試験法を選択するようになってきている。さらに、紫外部吸収(310-420 nm)を持たない被験物質は実施しない、事前に irritation/corrosion の情報を得る、pH 2 以下または pH 11.5 以上の強酸、強アルカリ及び腐食性の強い被験物質の実施は避ける等の具体的チェック項目の記載がある。具体的には2試験法を対比させて表-6に示した。なお、本光毒性試験の評価システムでは *in vitro* 試験の結果にかかわらず *in vivo* 試験も検討するため、動物数の実質的な削減は期待できないと推測される。

また、1996年度版(OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods 1996/1)(図-2)では、逆に動物実験による確認が全くなくなっている。*In vitro* 試験として 3T3 NRU PI法を用いた場合、false negative 及び false positive と評価される物質が存在する。False negative は非常に少ないと考えられるものの、*in vitro* 試験の結果のみからの判断ではリスクを伴う。また、経皮吸収等の要因が考慮されていない光細胞毒性試験は感度が高く、false positive が比較的多いと考えられ、有用な物質が利用できなくなる可能性もある。光細胞毒性試験で

図-2  
光毒性評価のストラテジーに関する OECD 案 (1996)



Final report of the OECD workshop on harmonization of  
Validation and acceptance criteria for alternative  
toxicological test methods  
Solna, Sweden, Jan. 1996

は、光毒性と光アレルギー性物質が区別されることなく光増感作用を持つ物質すべてが陽性としてとらえられる。これらを区別する方法は現時点ではまだ報告されていない。どちらの作用機構であっても photohazard は検出されると考えられるが、今後、作用機序の面で光毒性と光アレルギー性を区別する *in vitro* 法の開発も必要と考えられる。

#### 8. その他の試験法による検討と Battery system

光細胞毒性試験法以外の方法として、弊社にて赤血球光溶血試験法<sup>6)</sup>及び酵母光生育阻害試験法<sup>7)</sup>を用いて光細胞毒性試験と同様の被験物質23種類の評価を行った。これらの試験法は、EU/COLIPAバリデーシヨ

ン Phase I での検討項目にも含まれており、前者は作用機序を検討する方法、後者はスクリーニング方法として位置付けられている。

赤血球法及び酵母法での評価結果を *in vivo* の結果と比較検討した。赤血球法では膜破壊に基づく光毒性をとらえることはできるが、DNA に対する障害を発現機序とする 8-MOP や 5-MOP に関しては陰性であることが確認された。酵母生育阻害試験法では、細胞膜のみならず細胞内小器官への障害が反映されるため、8-MOP 及び 5-MOP は陽性と評価されたが、酵母法(-)、赤血球法(+)となる被験物質も出てきた。これは、細胞膜に対する感受性の差に起因し、赤血球の方が酵母より感度が高いと考えられた。特に、酵母法で唯一 false negative となった Phantolid が赤血球法では陽性であった。



表-7  
Battery による評価

*in vitro* (Battery: 赤血球&酵母) と *in vivo* の対応性

<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	-	±	-
+	8-MOP Galaxolide 50 CPZ Acridine 8 品	5-MOP TCSA Anthracene Phantolid 1 品	Musk ambrette Rose bengal TBS 5 品
-	0 品	0 品	Musk ketone TCC ASL-24 P-MCX Indomethacin Musk xylene P-1789 ASL-24S Sulfanilamide Piroxicam 10 品

*in vitro* (Battery: 赤血球&細胞) と *in vivo* の対応性

<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	+	±	-
+	8-MOP Galaxolide 50 CPZ Acridine 8 品	5-MOP TCSA Anthracene Phantolid 1 品	Musk ambrette Musk xylene TBS 6 品
-	0 品	0 品	Musk ketone ASL-24S Sulfanilamide Piroxicam 8 品

*in vitro* (Battery: 酵母&細胞) と *in vivo* の対応性

<i>in vivo</i> <i>in vitro</i>	+	±	-
+	8-MOP Galaxolide 50 CPZ Acridine 7 品	5-MOP TCSA Anthracene 1 品	Musk ambrette Rose bengal 4 品
-	Phantolid 1 品	0 品	Musk Ketone ASL-24S Sulfanilamide Indomethacin Bithionol Musk xylene 6-MC Piroxicam TCC TBS 10 品

そこで、酵母法、赤血球法及び細胞法のいずれか2法を組合せ、いずれかの試験法で陽性と評価された物質は「陽性」と評価し、*in vivo*との対応性を検討した(表-7)。その結果、赤血球-酵母法及び赤血球-細胞法の組合せでは false negative が認められなくなった。

このように、作用機序を考慮し、感受性の差を補うため複数の試験法の結果を組み合わせた Battery system は、スクリーニング法として有用と考えられた。

また、酵母法では難水溶性物質の被験物質に対しても、高濃度での適用が可能であり、赤血球法や細胞法にないメリットがある。

したがって、最も適切な代替法を設定するためには、*in vivo*の毒性発現機序を検討し、各*in vitro*試験法の作用機序及び特長を理解したうえで、各被験物質の特性も考慮して、試験法を選定あるいは組み合わせて評価することが重要である。

## 9. 参考文献

- 1) Spielmann, H., et al. (1994) *In Vitro* Phototoxicity Testing, ATLA 22, 314-348.
- 2) Spielmann, H., et al. (1994) EEC/COLIPA Project on *in vitro* phototoxicity testing: first results obtained with a BALB/C 3T3 cell phototoxicity assay, *Toxicology in Vitro*, 8, 793-796.
- 3) 杉山真理子ら (1995) 香粧品科学会 第20回学術大会要旨集 (東京), 59.
- 4) 杉山真理子ら (1995) 日本動物実験代替法学会 第9回大会要旨集 (京都), 80-81.
- 5) 高瀬吉雄 (1968) 紫外線と皮膚 特にタール系色素と光毒性, *Journal of J.C.C.A. Special issue*, 135-144.
- 6) Sugiyama, M., et al. (1994) *In vitro* assays to predict phototoxicity of chemicals: (I) Red blood cell hemolysis assay, *AATEX*, 2, 183-191.
- 7) 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.