

平成10年度厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業 実績報告書

「化学物質の光毒性に係る評価方法に関する研究」

(H10-生活-019)

主任研究者

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 小野 宏

分担研究者

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 田中 憲穂
財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 渋谷 徹
財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 大原 直樹
財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 原 巧
東京大学大学院薬学研究科 長野 哲雄

平成10年度厚生科学研究費補助金研究（生活安全総合研究事業）

「化学物質の光毒性に係る評価方法に関する研究」

総括研究報告書

総括研究報告書

化学物質の光毒性に係る評価方法に関する研究

主任研究者 小野 宏 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所

研究要旨

我々は、光照射による化学物質の毒性や遺伝毒性の増強を効率的に検出する試験法を開発し、さらにその発現機序を解明することを目的とし、以下の項目について研究を行った。

(1) 光毒性試験と光遺伝毒性試験の現状と標準化に関する国際的な動きに関して調査研究を行った。(2) 光遺伝毒性物質の簡便な検出法として、プラスミドの切断を指標とした方法を応用し、実験条件の検討を行った。また、53 種類のモデル化合物を用いてその有用性を検討した。(3) 突然変異誘発性の検出に広く用いられている Ames 試験の応用を試み、各試験菌株について、照射の条件と、用いる陽性対照物質の選定を行った。(4) 簡便かつ高感度な in vivo 変異原性試験である、ショウジョウバエ翅毛スポットテストを、光遺伝毒性試験に応用することを目的として、この試験系における最適な照射条件を検討した。(5) In vivo 光遺伝毒性検出法を確立する研究の一環として、トランスジェニックマウスの皮膚を用いる方法の確立を目的として、皮膚からのゲノム DNA 抽出方法を検討した。(6) モルモットにおける急性皮膚光刺激性試験において、試験実施上問題となる皮膚の透過性について、適用方法の面から検討を加えた。(7) 光毒性に重要な役割を果たしている一重項酸素(1O_2)を、生理的条件下で特異的に検出する手法を開発することを目的とし、新たに DPAX 類の合成に成功し、その有用性を検討した。

本研究によって確立する一連の試験法は、有害性のある化学物質の使用に当たった際の事前の対策など安全性の確保に資することが期待される。

分担研究者

小野 宏 食品薬品安全センター秦野研究所
田中 憲穂 食品薬品安全センター秦野研究所
渋谷 徹 食品薬品安全センター秦野研究所
大原 直樹 食品薬品安全センター秦野研究所
原 巧 食品薬品安全センター秦野研究所
長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科

認し、その発現機序を解明するとともに、これを効率的に検出する試験法を開発することを目的とする。現在までに、培養細胞を用いた試験系を用いて、多環芳香族炭化水素類などの一般化学物質が多数含まれ、低濃度においても毒性作用を発揮することが明らかにしてきた。そこで、このような現象がどの範囲の化学物質に及ぶのか、またどのような条件で生体に影響を発現するかを、その発生機序の解明を含めて検討する必要がある。光(紫外線)による毒性増強の機序として、まず光化学反応によるフリーラジカルの発生、関与が想

A. 研究目的

本研究では、光(紫外線)照射による化学物質の毒性の増強、とくに変異原性の増強の事実を確

定されるので、化学物質と光(紫外線)照射の同時処理の条件での活性酸素の発生に関する検討も実施する。実際の生体に対してこの現象がどの程度の健康影響を有するかを評価するために、適当な動物モデル(バイオマーカーやトランスジェニック動物などの利用)を用いて光(紫外線)照射による化学物質の毒性への影響についても調査する。

本研究の成果によって、環境中の化学物質をはじめとして、新規化学物質についてもこのような毒性を検出することが可能となる試験法が開発され、有害性のある化学物質の使用に当たっての事前の対策など安全性の確保にも資することができる。

B. 研究方法

試験系の開発に関しては、実験材料として、各種の菌株を用いた微生物、各種の培養細胞、ショウジョウバエ、トランスジェニック動物、モルモットなどを用いた。方法としては、ガイドラインに示されている標準的な方法を基本的に採用し、それを光暴露できるように考案して実験を行った。

C. 研究結果

1) 化学物質による光毒性増強作用の検査法とその評価に関する調査研究 (小野)

光毒性試験に関しては、EU/COLIPA によって実施された細胞を用いる光毒性試験に関する国際的な評価試験にオブザーバーとして参加し、この方法が極めて有用であることを確認した。光遺伝毒性に関しては、遺伝毒性の国際ハーモナイゼーションの会議(ワシントン, 1999. 3)において試験法実施の問題点とその試験の進め方に関する大枠について議論が開始されたばかりである。本研究班からも会議に参加し、問題点や方法論について、我々のデータを示すことにより討議した。この討議内容に関しては、更にグループ内で検討を重ね、OECD への報告レポートを作成する予定

である。

2) 培養細胞を用いる各種試験法における光毒性の検討 (田中)

光遺伝毒性物質の簡便な検出法として、プラスミドの切断を指標とした方法を応用し、実験条件の検討を行った。また、53 種類のモデル化合物を用いてその有用性を検討した。その結果、動物や人体に対する光毒性作用の有無が報告されている 32 種の化学物質について、本法の結果と *in vivo* の結果と比較したところ、陽性予測率 91%、陰性予測率 75%と非常に良く一致した。このことから、光毒性物質の簡便なスクリーニング系として、プラスミドを用いる光毒性試験が有用であることが示された。

3) 微生物を用いる光遺伝毒性試験の確立 (渋谷)

光照射によって変異原性が発現または増強される化学物質の検出法について、突然変異誘発性の検出に広く用いられている検定菌を用いた Ames 試験の応用を試みた。まず、照射条件を決定するために、1~9J/cm² の光照射を行い、変異コロニー数や生菌数に大きく影響しない線量域を設定した。その結果、TA100、TA98 では 1J/cm² 以下、TA102、WP2/pKM101 では 3J/cm² 付近において試験が可能であることがわかった。これらの線量域で、適切な陽性対照物質の選定を行ったところ、TA100 および TA98 ではクロロプロマジンが、TA102 および WP2/pKM101 では 8-MOP が最適であると考えられた。また、TA1535 および TA1537 については、低線量域で抗菌性が強く現われ使用できないものと判断した。さらに、実際の試験にあたっては、被験物質の用量を数段階設定するとともに、照射線量についても、数線量を設定することが望ましいと考えられた。

4) ショウジョウバエを用いる光遺伝毒性試験の

研究（原）

本研究は、簡便かつ高感度な *in vivo* 変異原性試験であるショウジョウバエ翅毛スポットテストを、光遺伝毒性試験に応用することを目的としている。今年度は、最適な照射条件の検討を行った。UVA の照射強度は $1\text{mW}/\text{cm}^2$ とし、非照射群、3 時間照射群 ($10.8\text{ J}/\text{cm}^2$) および 5 時間照射群 ($18.0\text{ J}/\text{cm}^2$) を設けた。いずれのスポットの頻度も、用量に依存した増加傾向を示し、全スポットを基準にすれば適切であるが、大シングルスポット (LS) を基準にすれば高すぎるものと判断された。今後は、8-methoxy-psoralen 等の *in vivo* 光遺伝毒性物質を用いて、この試験系の最適な照射条件をさらに検討する予定である。

5) 哺乳動物を用いる変異原性試験に対する光照射の影響に関する研究（渋谷）

本研究では、哺乳動物生体内において、光遺伝毒性検出法を確立する研究の一環として、トランスジェニックマウス試験 (TG マウス試験) の皮膚における試験に着目した。その予備試験として、種々の操作段階における条件の検討を開始した。今回は TG マウスを用いて、皮膚からのゲノム DNA 抽出方法を検討した。抽出法には Puregene kit を用いる方法と、フェノール/クロロホルムで抽出をおこなう方法を用いた。その結果、両抽出法ともに、DNA 含量測定結果にばらつきがみられ、方法のさらなる工夫が課題とされた。なお、Puregene 法はフェノクロ法よりも簡便な操作で実施できるため、この方法で確実に DNA 単離ができることが望ましいと考えられる。今後は、採取組織量の再検討および効果的な細切ならびにホモジナイズ方法を検討すべきといえる。なお、今回の操作に用いたサンプルについては、さらにパッケージング効率の算定さらに陰性対照および陽性対照での突然変異率の測定を行い、基礎的なデータを蓄積してゆく予定である。

6) 実験動物を用いる光毒性試験における照射条件の検討（大原）

これまでの研究によって、モルモットにおける急性皮膚光刺激性試験において、媒体が異なる物質間での皮膚の透過性の相違、有色の被験物質への対応、限度試験とする濃度などの問題点があることが明らかになっている。本年度は、媒体についての問題を解決する目的で、適用方法の検討を行い、適応時に角化層を剥離することによって、安定した良好な結果が得られることが示唆された。また、検体の皮膚浸透性に応じて、適用後照射までの放置時間を調節するため、複数回に分けた塗布が望ましいことが示唆された。

7) 光照射の毒性増強の機序としての一重項酸素の関与の研究（長野）

一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) は活性酸素種の一つであり、化学物質の光毒性に最も関連する重要な反応種である。 $^1\text{O}_2$ は反応性が高く、特異な反応を行うことから、NO のように生体内で何らかの役割を担っていることが期待される分子であるが、他の活性酸素種とは異なり、その生理的役割はおろかその生体内での生成も明らかになっていない。その大きな理由として、 $^1\text{O}_2$ を特異的かつ簡便に検出する方法がなく、生理的条件下で効率よく $^1\text{O}_2$ を検出できる方法は存在しないことが挙げられる。そこで本研究においては、 $^1\text{O}_2$ の生理的条件下からの検出を目的とした高感度特異的検出プローブの開発を行い、その有用性を検討した。その結果、新たに合成に成功した DPAX 類は、 $^1\text{O}_2$ 特異的かつ定量的なプローブとして用いることが明らかとなった。この化合物は蛍光法を検出原理とした初めての $^1\text{O}_2$ 検出試薬であり、現存する $^1\text{O}_2$ 検出系の中で、特異性、感度ともに最も優れている方法である。

D. 考察

近年、ヒトや生物に対する紫外線の影響が、大

きな問題になりつつある。また、光暴露条件下で化学物質の毒性や遺伝毒性が増強される現象も注目されるようになり、発がんとの関わりも懸念されるようになってきた。我々のこれまでの研究によって、多環芳香族炭化水素など、工業原料などとして大量に用いられている一般化学物質や、環境中に普遍的に存在する汚染物質にも強力な光毒性、光遺伝毒性を示す物質があることが明らかにされてきた。そこで、光暴露条件下での毒性・遺伝毒性を調べる試験系を開発し、また、そのメカニズムの解明することによって、既存、新規化学物質の使用に当たっての事前の対策や、環境汚染物質の評価など、安全性の確保に資する系を確立することを目的とし、一連の研究を行った。

試験法の開発については、これまでに *in vivo* や *in vitro* で広く毒性試験に用いられてきた手法を、光暴露条件下での試験に応用することを1つの目標とした。これによって、これまでに通常の条件下での毒性試験で得られている試験結果や、評価法が生かされるという利点がある。この目標に沿って、微生物を用いた遺伝毒性試験、培養細胞を用いた毒性および遺伝毒性試験、哺乳類およびショウジョウバエを用いた遺伝毒性試験、実験動物を用いた皮膚刺激性試験の応用を試みた。また、もう一つの目標として、光毒性や光遺伝毒性物質の作用特性を鑑み、高感度かつ簡便な試験法の開発にも取り組み、一次スクリーニング系として有用なプラスミドDNA切断性試験を開発する一方、生体内での光遺伝毒性を精度よく簡便に検出する手法の一つとして、*in vivo* で皮膚細胞に生じた変異を特異的に検出できるトランスジェニック動物を用いた試験法の開発を行った。本年度は、概ね基礎的な実験条件の設定を行い、いずれの試験法でも満足すべき結果が得られた。次年度からは、これまでに確立した手法を用いて、実際に環境中及び特定物質の光毒性、光遺伝毒性物質の試験を行うと同時に、併せて試験法のさらなる評価を行う。

メカニズムの解明という観点から、一重項酸素の新たな検出法の開発を行った。光毒性、光遺伝毒性の作用機序として、光触媒効果による活性酸素種の発生が、重要な役割を果たしていることが、我々のこれまでの実験によっても明らかにされている。活性酸素種のうち、スーパーオキシド、ヒドロキシラジカルなどについては、既に測定法が確立されているが、一重項酸素については、特に短寿命であることや、特異的なプローブが存在しないといった理由で、厳密な測定が困難であった。そこで、新たなプローブの合成を行い、有用であることが確認された。この新規プローブを用いることによって、これまで光毒性物質の作用機序の中でミッシングリンクとなっていた、一重項酸素の役割の解明が期待される。

また、近年になって、光毒性、光遺伝毒性試験法についての国際的な評価研究や、試験法についてのハーモナイゼーションのための会議が始まった。EU/COLIPA によって実施された細胞を用いる光毒性試験の評価試験にオブザーバーとして参加して、この方法が極めて有用であることを確認した。本法については、現在、OECD ガイドラインとして草案の作成が行われている。

光遺伝毒性に関しては、遺伝毒性の国際ハーモナイゼーションの会議において試験法実施の問題点とその試験の進め方に関する大枠についての討議が行われているが、我々のデータを提供することにより、討議に参加した。試験法に関しては、照射装置や線量測定機器によって線量測定値が異なり、絶対照射条件の設定が難しいという基本的な問題が存在する。また、光照射条件下での各遺伝毒性試験の実施については、実験器材や培地の UV 吸収などが影響し、実験系によっては困難な問題もあることが分かってきた。今後、IWGTP の専門家会議を積み重ね、より良い試験法の開発と実施に向けて努力する予定である。

E. 結論

光(太陽光)による化学物質の毒性増強に関しては、地球環境の悪化とも関連し、光毒性、光遺伝毒性の面から国際的にも大きく取り上げられている。本研究では、これらの新しい毒性試験の動向を調査研究すると同時に、有害物質検出のための簡易試験法の開発、メカニズムの研究、ヒトに対する危険性予測のための in vivo 試験法の開発など、当初の目的に添って成果をあげることができた。加えて、研究成果の一部は、光遺伝毒性に関する国際会議の討議資料として用いられ、ガイドランスのとりまとめに反映することができた。

F. 引用文献

Lopriero,N., In vitro assay systems for testing photomutagenic chemicals, Mutagenesis Vol.6,331-333,1991

OECD., OECD guideline for testing of Chemicals draft proposal for a new guideline, "In Vitro 3T3 Phototoxicity Test", CD draft,1998

Spielmann,H., Balls,M., Dupuis,J., et al., The international EV/COLIPA in vitro phototoxicity validation study., Results of phase II (blindtrial). Part1: The 3T3 NRU Phototoxicity test, Toxicology invitro, 12,305-327,1998

Henderson,L., Fedyk,J., Bourner,C., et al., Mutagenesis Vol9,459-465,1994

G.研究発表

1. 論文発表

1) Yuzuki Nakagawa, Shinobu Wakuri, Atsuko Takahashi, and Noriho Tanaka, Comparative Evaluation of Environmental Toxicants, National Institute of Radiological Sciences, 1998.

2) Hirotsu Kojima, Kuniko Sakurai, Kazuya Kikuchi, Shigenori Kawahara, Yataka Kirino, Hiroshi Nagashi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano, Development of a Fluorescent Indicator for Nitric Oxide Based on the Fluorescein Chromophore" Biol. Pharm. Bull., 46, 373-375, 1998.

2. 学会発表

1) 中川ゆづき、若栗忍、滝川優子、田中憲穂、プラスミド切断による光(遺伝)毒性物質の検出、日本環境変異原学会第27回大会、1998

2) 若栗忍、中川ゆづき、高橋淳子、益川信貴、浜村哲夫、伏脇裕一、田中憲穂、環境中の光毒性物質の検出、第12回日本動物実験代替法学会、1998

平成10年度厚生科学研究費補助金研究（生活安全総合研究事業）

「化学物質の光毒性に係る評価方法に関する研究」

分担研究報告書

1. 化学物質による光毒性増強作用の検査法とその評価に関する調査研究
2. 培養細胞を用いる各種試験法における光毒性の検討
3. 微生物を用いる光遺伝毒性試験の確立
4. ショウジョウバエを用いる光遺伝毒性試験の研究
5. 哺乳動物を用いる変異原性試験に対する光照射の影響に関する研究
6. 実験動物を用いる光毒性試験における照射条件の検討
7. 新規一重項酸素検出蛍光プローブの開発

分担研究報告書

1. 化学物質による光毒性増強作用の検査法とその評価に関する調査研究

分担研究者 小野 宏 食品薬品安全センター 秦野研究所長

研究要旨

種々の化学物質に紫外線(太陽光に含まれる UVA や UVB など)が照射されると、化学物質が活性化され、非常に強い毒性を示す場合がある事が分かってきている。ヒトに対して毒性を示す可能性のあるこれらの化学物質を検出する方法として、従来はモルモットやラットの皮膚に塗布する光毒性試験が行われてきた。しかしながら、動物種によって皮膚反応が異なり化学物質に対する感受性に差があること、更に動物愛護の観点より代替法の開発が進められてきた。本研究では、光毒性試験の代替法として開発されたいくつかの試験法とその評価に関する経緯を調査した。

また、光発がんとの絡みから、光遺伝毒性の適用とその方法についての会議がワシントンで開かれ、問題点の整理と試験方法の標準化についての検討が開始された。その具体的内容として、遺伝毒性試験をどのような物質に適用するか、どんな試験系が適当か、試験に用いる光源や照射強度はどのようにするか、代謝活性化は組み込めるか、など具体的な問題が提起されている事から、その内容について調査検討した。

A. 研究目的

太陽光の直接的な作用により皮膚がんが発生することは良く知られている事実である。しかしながら、ある種の化学物質に太陽光(主に UVA、UVB)があたる事で、化学物質本来の毒性が光によってさらに増強され、ヒトや生物に対して強い毒性を顕わす事が分かってきた。これまで著者等の研究成果により、既存化学物質の中でも特に芳香族炭化水素類では極めて強い毒性が顕れ、特にベンゾピレンでは光照射により細胞毒性が約7-8万倍、染色体異常で約1万倍に増強される事が示された。また、生活用品に一般的に含まれている化学物質や、キノロン系などの医薬品でも光(遺伝)毒性を示すものがある。懸念される問題として、これらの物質の中には、動物を用いる光発がん試

験で陽性の報告がなされているものもあり、我々の生活環境中からそれらを速やかに検出し、排除する為の、高感度なアッセイ系を確立しなければならない。

そこで本研究では、光毒性試験と光遺伝毒性試験に整理し、先ず光毒性試験としてどのような試験系があり、それぞれの試験系についての評価が国際的にどのようなにされ、ガイドラインへ反映されるかについてのべる。一方、光遺伝毒性試験の実施にあたっては、これまで各研究者がそれぞれ独自の条件で試験を実施し、その結果が試験の条件によって異なる事がよくみられた。、本年度は、遺伝毒性試験法国際調整の為の国際会議(IWGTP:International Workshop on Genotoxicity Test Procedures)がワシントンで開かれ(1999年3

月)、この会議の光遺伝毒性試験の部会に分担研究者の田中が参加し、試験の条件に関して討議したことから、その会議の結果をふまえて問題点を総括する。ちなみに、IWGTP での合意事項は、IWGTP Recommendation としてとりまとめられ OECD ガイドラインへ反映するのが目的である。

B. 光毒性試験

動物を用いる毒性試験の代替法については、多くの試験法が開発され、有望な試験系については施設間で大規模な評価試験(Validation Study)が行われている。光毒性試験に関しては、BALB3T3 細胞を用いる In Vitro Phototoxicity Test を含み8種の試験法についての評価試験が EU/COLIPA により企画(1991)され、in vitro 試験法の中でどの方法が局所または全身的に投与された化学物質の、ヒトへの光炎症反応を精度良く予測する事ができるかを目的として、Phase I と Phase II の2回にわたって行われた。

その結果、Phase I の評価試験(1992-19993)では BALB3T3 を用いる試験、赤血球の溶血試験、ヘモグロビンの酸化の組み合わせ、そして Skin²

試験などの光毒性試験が in vivo の結果と良い相関を示した。とりわけ、BALB3T3 を用いる試験が全ての化学物質について精度良く評価できたことから、Phase II のコアになる試験として採用された。Phase II(1994-1995)の結果では、光毒性物質に関しては、研究室間で得られたデータのパラッキが極めて低く、加えて、感度 93%、特異性 84%、陽性の予測率 96%、陰性の予測 73%で、本法が極めて信頼性の高い方法である事が示された。この様に、BALB3T3 を用いる光細胞毒性試験が代替法として極めて信頼性が高いという結論が得られたことから、OECD ガイドライン案(1998)として OECD 事務局へ提出されている。この試験系に関しては、本研究班でも基本的な試験として採用しており、今後、光毒性試験のコアとして用いられると思われる。OECD へ提出された原案では、先ず

被験物質に関して構造活性や光化学の面から調べ UV 吸収を示す物質に関して In vitro 光細胞毒性試験を実施する。その結果よりリスク評価を行い、場合によっては、更に光遺伝毒性、アレルギー試験を行った後、皮膚吸収や NOAEL などのデータもみて総合的にリスク評価を行う事が示されている。

C. 光遺伝毒性試験

光発がんの予測試験として、光遺伝毒性試験は極めて重要である。ここで特筆すべき事は、光毒性を示す物質の大部分が遺伝的傷害を伴っている可能性が高いことである。光毒性発現のメカニズムとしては、UV 吸収を示す化学物質は紫外線によって励起され、電子移動の過程で生じた活性酸素種により細胞に傷害が起きると考えられている。別項の分担研究(田中)の報告に記載したように、本研究班のデータでも光毒性物質は DNA 切断を生じる場合が多いことが示された。

このように、光毒性試験の次のステップとして光遺伝毒性試験の必要性和重要性が高まっている。しかしながら、遺伝毒性試験の方法に関しては、ガイドライン的なものがなく、それぞれの研究者が独自の試験条件で実施しているのが実情である。そこで、先に述べたワシントンでの IWGTP のワークショップでは、光遺伝毒性の検討部会が設けられ、試験に関わる様々な問題について討議をおこなった。その内容と意見の要約を表1に示す。

また、図1~4に、このワークショップで報告した 秦野研究所で得られたデータの一部を示す。

表1 IWGTP ワークショップにおける討議内容

1. 光遺伝毒性試験を適用すべき候補物質には、どのようなものがあるか

- ・Sunscreens...EEC cosmetics committee guideline にあげられている。
- ・光毒性を示す物質...光毒性試験の OECD ガイドライン案にあげられている。
- ・皮膚に存在し UV 吸収を示す物質で遺伝毒性が未知のもの。

2. 試験に用いる光源はどのタイプがよいか

- ・ソーラー シュミレーター(UVB のカットが必要かもしれない)
- ・地表に達する太陽光線のスペクトルと強度に対比させた、フィルターを付けたキセノン光源(報告書に波長と特性を記載)
- ・UVA/UVB の比は、細胞の種類とエンドポイントに留意する必要がある。
- ・培養器のプラスチック(透過率 UVB60%,UVA90%)やガラスによる UV 吸収に注意する。

3. 光源の照射強度とスペクトルに影響を与える条件

- ・プラスチックの蓋、pH インディケーター、血清、被験物質の物理化学的特性(吸収、遮蔽)、照射時の面積と培地量、その深さ)、細胞濃度、照射室の物理的条件(光の反射や表面吸収)、照射時の細胞は monolayer か suspension か等

4. 試験のデザイン

a. 評価試験の実施

- ・試験施設でのその試験に関する照射条件下での用量依存曲線を示しておく事(試験時または試験法開発の過程において)。

b. 最低と最高の照射率の設定限界について

- ・一定の照射限界値を示すにはデータが不十分である。
- ・実用的な範囲では短時間の照射が良いであろう。それは、照射熱、細胞の適応、修復等の理由による。
- ・非生理的条件下での照射限界に留意する。

c. 照射の均一性

- ・照射面積上での照射線量の均一性を確認する。

d. UV 照射線量の物理的測定

- ・UVA および UVB についてそれぞれ測定する。
- ・実験毎に測定すべきか?
- ・スペクトラムにおける UVA/UVB の寄与率を見る為、スペクトルラジオメーターを用いて広い波長領域でのバンドパターンをみる必要があるかどうか?
- ・可視光に吸収がある場合、可視光をルックスメーターまたはスペクトルラジオメーターで測る。ある物質では可視光域で毒性や光変異原がある事が知られている。

e. 陽性対照物質の使用

- ・実験毎に設ける。UV 照射群毎には必要ないが、UV 線量の低い方に設ける。しかしながら、照射群毎においた方が良いとの意見もある。
- ・照射した陽性対照での照射条件下での反応性を見ておく。また、非照射での陽性対照は特に置く必要はない。

f. UV 照射での線量の選択について次のような場合がある。

- ・検体の濃度を変えて、UV 線量を一定にする。
- ・UV 線量を変えて、検体の濃度を一定にする。
- ・検体の濃度と UV 線量と両方変化させる。

表1. (続き)

g. UV 照射線量と検体の投与量

- ・1線量の場合、生物学的な基準で選択する。低線量で、再現性のある遺伝毒性効果または光毒性についての論拠に基づく。
- ・検体の濃度群数は、ガイドラインに示すような標準的なプロトコールに従う。
- ・検体の最高濃度についても、標準的なプロトコールに従う。
- ・濃度設定の為、予備試験として UV 照射下で光毒性試験を実施する事が望ましい、その際の細胞毒性限界は既存のガイドラインに従う。
- ・光毒性がある場合、UV 線量を下げ、検体の濃度を上げると光遺伝毒性の検出が容易になるとの論拠がある。

h. コントロールの設定は次のような場合がある

- ・非照射での溶媒対照
- ・照射下での溶媒対照
- ・溶媒なしの照射対照

i. 検体による吸収と遮蔽

- ・UV 吸収を示す検体については、補正の為に UV 照射量を変える事はしない。

j. 照射条件

- ・細胞に対して検体処理と UV 照射を同時に行う。
- ・細胞への検体の取り込みを容易にするため、暗中で前処理する必要があるかもしれない。

k. 代謝活性化の応用

- ・S9 の存在下で試験が可能であるとの報告はないことから、現時点ではできない。

5. 試験系について

a. 微生物を用いる試験系

- ・OECD ガイドラインでのサルモネラ菌株の使用(E.Coli では修復能のある菌株がよい)。ただし、全ての菌株が使用できるわけではない。
- ・プレート法または懸濁法が可能。
- ・1光陽性対照物質(少なくとも1菌株で)とそれぞれの菌株につき通常の遺伝毒性陽性物質を設ける。または、それぞれの菌株に光遺伝毒性の陽性対照物質を設ける。

b. 染色体異常試験/in vitro 小核試験

- ・ほとんどの細胞が接着細胞で行われているが、懸濁細胞でも可能である。

c. 標準的な方法として受け入れられる光遺伝毒性試験として下記のような試験系がある。

- ・Mouse lymphoma assay(tk+/-)
- ・HGPR T assay
- ・S.cerevisae D7 test
- ・GPT-AS52 cell
- ・Comet assay (いくつかの time points が必要)

d. In vivo 試験系

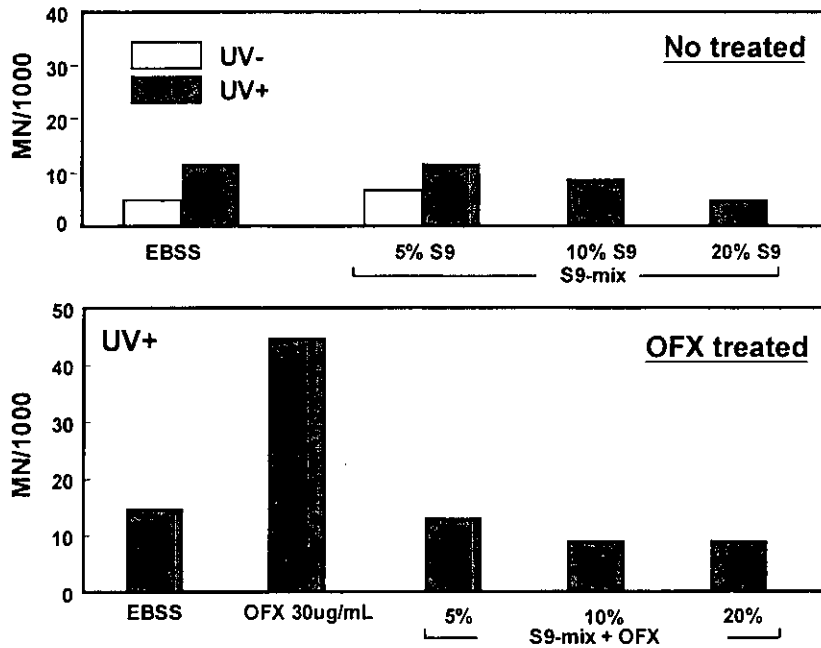
- ・Comet assay
 - i) 光遺伝毒性物質については可能である。
 - ii) データーが不十分なので、陰性の結果についてのクライテリアが不明である。
 - iii) まだ、標準化された処理と照射についてのプロトコールが確立していない。
- ・トランスジェニックアッセイ
 - i) まだ、データーが不十分である。

6. 最小限の試験系の組み合わせ

- ・Photoclastogenicity に関して試験する。photoclastogenicity に関して陰性の場合 photogene mutations(細胞または微生物)試験を実施する。

1-1

Effects of S9-mix on MN induction



1-2

Effects of S9 and co-factors on MN induction

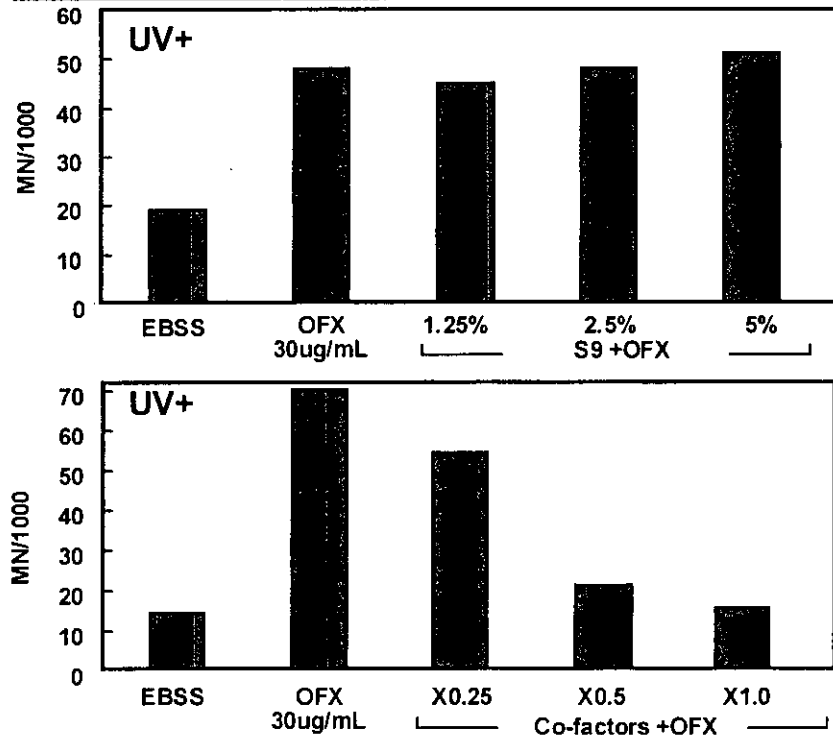
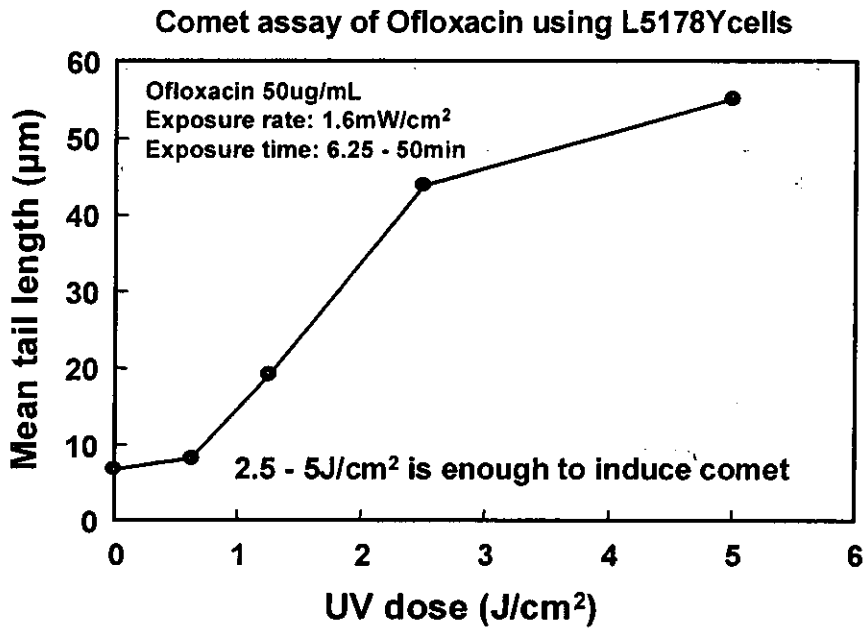


図1. S9の光遺伝毒性試験に与える影響

代謝活性化によって遺伝毒性を発揮する化学物質を検索する場合には、ラット肝臓 S9 分画を加えて試験を行う。しかしながら、CHL/1U 細胞を用いた光小核試験によって、既知の光遺伝毒性物質であるオフロキサシンの光遺伝毒性が抑制されることが示され(1-1)、その効果は S9 自体より、むしろ電子供与体などの目的で加える補酵素に由来するものであることが示唆された(1-2)。

2-1

Exposure rate: do we have to limits for minimal exposure rate?



2-2

In vitro micronucleus test using CHL/IU cells

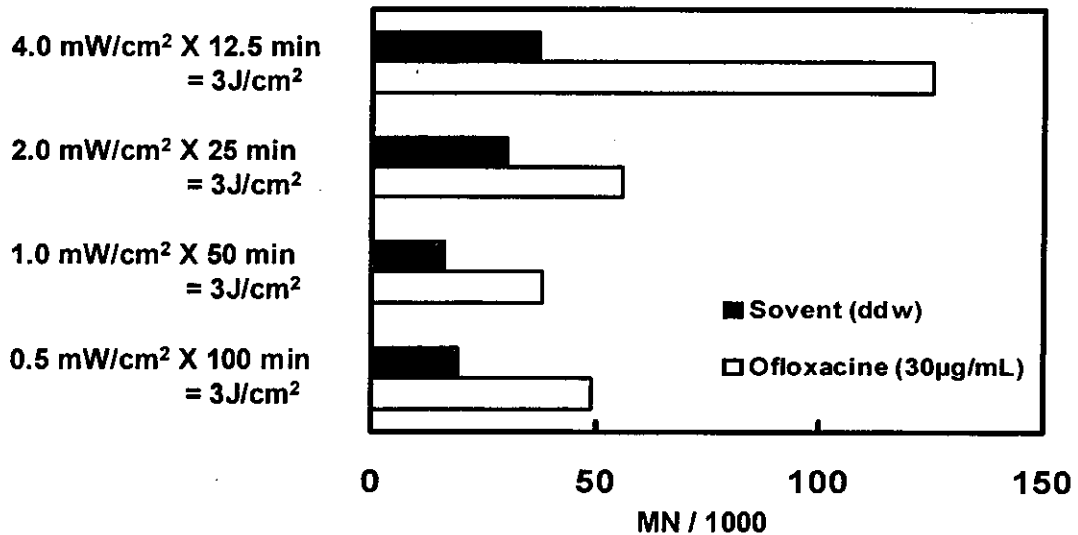
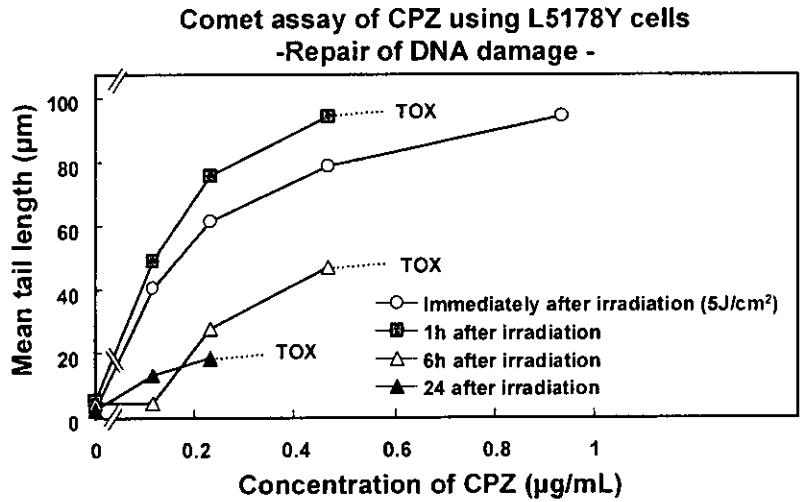


図2 光照射線量の設定

光照射に用いる線量は、光そのものの影響が試験に大きく影響しない程度の強さで、かつ、実際の太陽光を上回らない程度であることが望ましい。そのような範囲に収まる照射条件であっても、光遺伝毒性の増強効果は線量依存的であることから(2-1)、線量が低すぎると遺伝毒性を見落とす危険性がある。また、同じ照射線量であっても、短時間に強い光をあてた場合と、弱い光を長時間あてた場合では生物学的効果は異なるので、線量の設定は慎重に行う必要がある(2-2)。

3-1



3-2

Comet assay of 8-MOP using BALB 3T3

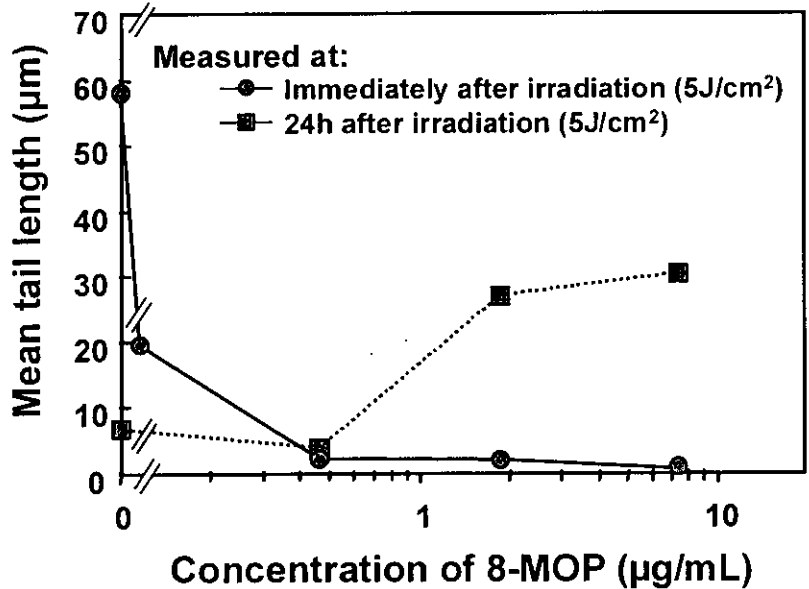


図 3. コメットアッセイによる光遺伝毒性の検出

コメットアッセイは、DNA の初期傷害を高感度かつ簡便に検出する系であり、近年、遺伝毒性物質の検出に盛んに利用されるようになってきた。コメットアッセイの特徴として、*in vitro* 小核や染色体異常試験と異なり蓄積効果が全く無く、変異原の作用が失われると、DNA 傷害が細胞の DNA 修復機構によって急速に修復され、検出できなくなることが挙げられる。クロルプロマジン¹⁾は、光触媒効果による活性酸素の産生を作用機序としており、光照射を終了した時点で毒性が失われてしまうことが示された(4-1)。一方、8-MOP は代表的な光毒性物質であるが、光エネルギーを利用して DNA を架橋することにより、毒性を発揮することが知られている。このような物質では、処理後短時間では検出が難しく、照射終了から 24~48 時間培養してからコメットアッセイを行う必要がある。従って、未知の化学物質の光遺伝毒性を、コメットアッセイを用いて検討する場合には、照射終了直後と、ある程度時間が経ってから、複数のタイムポイントで試験を実施することが望ましいと考えられる。

Irradiation procedure : Concomitant or Preirradiation?

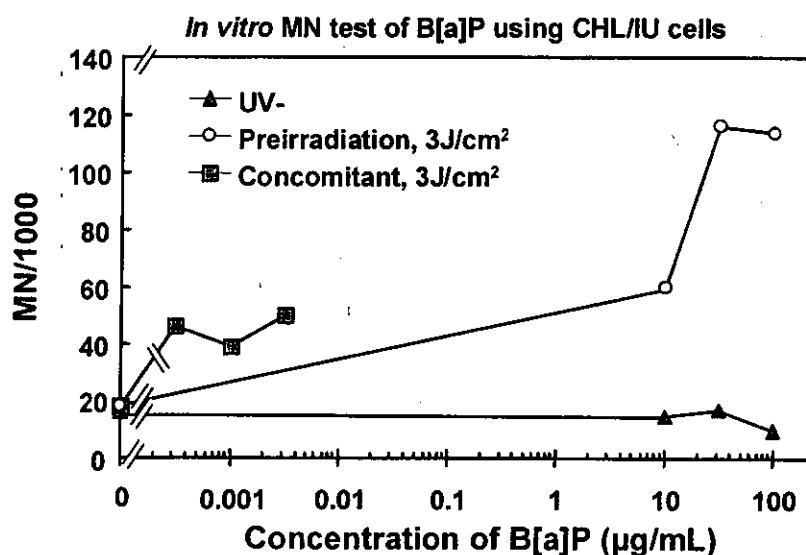


図4. 前照射と同時照射の比較

照射のプロトコールとして、あらかじめ光照射を行った検体を細胞に処理する前照射法と、検体存在下で細胞を照射する同時照射法の2種類が考えられる。前者に関しては、細胞に対する光の影響を考慮する必要が無いので、任意の線量を長時間照射できる利点があるが、実際に既知の光遺伝毒性物質を用いて光小核試験を行ったところ、陽性となる濃度域が大きく異なることが明らかになった。また、別の実験で、これらの遺伝毒性は、異なる作用機序で発現していることを示唆する結果が得られているので、いずれかの方法で他方を代替することはできないことが示唆された。

E. 結論

これまで述べたように、光毒性試験と光遺伝毒性試験の標準化に関しては、国際的にも大きな動きがあり、光毒性は既にOECDのガイドラインに提案され、これから各国の意見を聞く事が開始される。一方、光遺伝毒性に関しては、試験の条件など問題点の整理が開始されたばかりである。

近年、オゾン層の破壊に伴う紫外線の増加により、直接的作用による皮膚がんの増加に加えて、太陽光に暴露された環境汚染物質や一般化学物質の作用により、ヒトや生物に対して遺伝的傷害をもたらす可能性が増えることが示唆される。また、光による毒性と遺伝毒性の関係に関しては、in vitroのみならず in vivoの試験系も含めて光毒性発現のメカニズムについての研究が早急になされ

るべきである。一方で、確立された試験系を用いて、環境中の光遺伝毒性物質を感度良く検出する必要がある。

F. 引用文献

- 1) Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Doing, B., Holzhutter, H., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Papa, W., Pfanenbecker, Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994) EEC/COLIPA project on in vitro phototoxicity testing: first results obtained with a BALB/C 3T3 cell phototoxicity assay, Toxic. In Vitro, 8, 4, 793-796.

- 2) Spielmann, H., Balls, M., Pechovitch G., Dupuis J., De Silva, O., Papa, W., Holzhutter, H., (1997) A validation study of in vitro photoirritation tests in a joint EU/COLIPA project: preliminary report, In animal Alternatives, Welfare and Ethics, Edited by Zutphen, L and Balls, M., Elsevier Science B.V., 1135-1143
- 3) Lopriero, N., In vitro assay systems for testing photomutagenic chemicals, Mutagenesis Vol.6, 331-333, 1991
- 4) OECD., OECD guideline for testing of Chemicals draft proposal for a new guideline, "In Vitro 3T3 Phototoxicity Test", CD draft, 1998
- 5) Henderson, L., Fedyk, J., Bourner, C., et al., Mutagenesis Vol9, 459-465, 1994

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

- 1) 中川ゆづき、若栗忍、滝川優子、田中憲穂、プラスチック切断による光(遺伝)毒性物質の検出、日本環境変異原学会第27回大会、1998

分担研究報告書

2. 培養細胞を用いる各種試験法における光毒性の検討

分担研究者 田中 憲穂 食品薬品安全センター 細胞毒性学研究室 室長

研究要旨

我々は、これまでに種々の *in vitro* 光(遺伝)毒性試験法により、多環芳香族炭化水素やキノロン系抗菌剤などの光細胞毒性、光遺伝毒性について研究してきた。光毒性物質の簡便な検出方法としては、BALB 3T3 細胞を用いたニュートラルレッド法があり、種々の化学物質を用いたバリデーションスタディによって、その有効性が示されている。今回、光遺伝毒性物質の、より簡便な検出法として、プラスミドの切断を指標とした方法を応用し、光毒性の可能性のある 53 種類のモデル化合物を用いてその有用性を検討した。その結果、動物やヒトに対する光毒性作用の有無が報告されている 32 種の化学物質について、*in vivo* の結果と比較したところ、陽性予測率 91%、陰性予測率 75%と非常に良く一致した。このことから、光毒性物質の簡便なスクリーニング系として、プラスミドを用いる光毒性試験が有用であることが示された。

A. 研究目的

近年、オゾン層の破壊によって地球上への有害紫外線(UVA, UVB)量が増加し、皮膚がんの生成など、ヒトや生物に対する紫外線の直接的影響が大きな問題になりつつある。一方、光暴露条件下で化学物質の毒性や遺伝毒性が増強される現象も注目されるようになり、発がんとの関わりも懸念されるようになってきた。これら問題を探求するためには、光暴露条件下での毒性・遺伝毒性を調べる試験系の開発が急務であると考えられるが、現在のところ、試験系の本格的な評価がなされるには至っていない。

我々は、これまでの研究によって、培養細胞を用いた化学物質の光暴露下での光毒性および光遺伝毒性の検出法の開発を試み、*in vitro* での遺伝毒性試験法として広く用いられている染色体異常試験、*in vitro* 小核試験、マウスリンフォーマ突然変異試験を、太陽光に近い波長構成を持つソーラーシミュレータによる光暴露条件下で行うこと

により、OECD 既存化学物質の High Production Volume (HPV) リストに記載されている一般化学物質を含む、モデル化合物を用いて光毒性・光遺伝毒性を検出することが可能であることを報告してきた。

光毒性・光遺伝毒性物質は、主として波長 315nm~400nm の A 領域紫外線(UVA)、B 領域紫外線(UVB)を吸収することによって、その作用を発揮することが知られている。即ち、化学物質の光毒性・光遺伝毒性を予測する上で、A、B 領域紫外線を吸収する化学物質は、全て光毒性・光遺伝毒性を示す可能性があると言えるが、それに該当する物質は、一般化学物質の中にも非常に数多く存在する。このため、細胞や動物を用いる試験のプレスクリーニング試験として、簡便かつ短期間で実施できる試験法を行うことにより、効率よく光毒性・遺伝毒性物質の検出が可能になると考えられる。

近年、DNA の切断をプラスミドの立体構造変化

によって簡便に検出する手法が報告された¹⁾。そこで、この手法を光暴露条件下での化学物質の DNA 切断性の検出に応用して、簡便なスクリーニング試験法の開発することを目的として、実験条件の設定、in vivo の実験で得られている結果との対比を行った。

B. 研究方法

1. 化学物質

検体には、ヒトや動物に対する光毒性・光遺伝毒性を示すことが知られているもの、示さないことが知られているもの、不明のものを取り合わせて、53 種の化学物質を用いた (Table 1)。化学物質は、OECD 既存化学物質の HPV リスト (1994 年) に記載されている一般化学物質を中心として、環境汚染物質、農薬、医薬品や化粧品原料なども加えた。

2. プラスミドの調製

プラスミドは、pUCSV-BSD (4.1 kb) をフナコシ (株) より購入して用いた。塩化ルビジウム法でコンピテント化した、大腸菌 XL-1 Blue 株に、定法に従ってプラスミドを導入した。アンピシリン 100 μ g/mL を含む LB 培地中で菌を増殖させ、Plasmid MAXI kit (QUIAGEN 社) を用いて、アルカリ抽出、カラムクロマトグラフィー精製にてプラスミドを調製した。

3. 検体処理

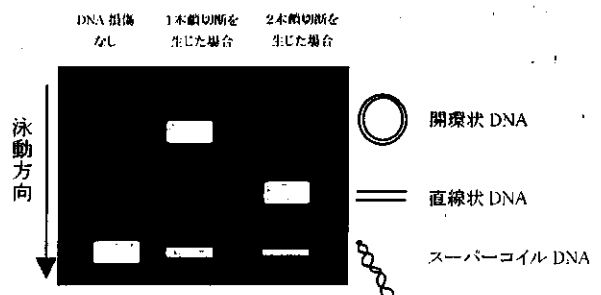
検体の最高濃度は、最終濃度で 1mg/mL とした。検体はアセトンに溶解後、公比 2~10 の範囲で数段階希釈系列を作製し、検体調製液とした。プラスミド 100 ng を含む緩衝液に、検体調製液を加え (1% v/v)、液量 20 μ L の反応液とした。

反応液を U 底の 96 穴マルチウェルプレートに移し、プラスミドと検体をなじませるために室温暗所に 1 時間静置した後、ソーラーシミュレータ (SOL500, Dr Hönle) を用いて照射を行った。照

射に用いる分光放射照度 (UVA 領域) と、照射を行う時間は、予備実験を行って適切な条件を求め、1 mW/cm² にて 50 分間、すなわち 3 J/cm² とした。分光放射照度は、UVA メーター (Type 37, Dr Hönle) を用いて、照射直前に測定した。

処理終了後直ちに、0.8% アガロースゲルを用いて、トリスホウ酸緩衝液中で電気泳動 (100V 定電圧) を行った。プラスミドは、生理的条件に近い溶液中では、スーパーコイルと呼ばれる高次構造をとるが、1 本鎖切断を生じると高次構造が解けた開環状構造、2 本鎖切断を生じると直線状の構造に変化する。これらの高次構造が異なる DNA は電気泳動によってバンドに分離できるため、それぞれのバンドの DNA 量を測定することによって、損傷を生じたプラスミド DNA を定量化することができる。

損傷 DNA の定量は、1 μ g/mL の臭化エチジウムを含むトリスホウ酸緩衝液中でゲルを染色し、UV トランスイルミネータ上で臭化エチジウムの蛍光強度を、画像解析ソフトウェア (Scion image) を用いて測定することによって行った。



損傷の指標には、全プラスミド DNA 中の損傷 DNA (開環状および直線上プラスミド) のパーセンテージを用いた。

C. 研究結果

1. 光暴露条件の検討

スクリーニング試験を始めるにあたって、光の暴露条件を検討した。光強度の単位は、総照射線量 (mJ/cm²) で表されるが、これは単位時間あたり

の光の強さ、即ち分光放射照度 (mW/cm^2) に照射を行う時間の秒数 (sec) を乗じたものである。したがって、暴露条件は、時間および分光放射照度の 2 つのファクターを同時に調節し、最適な条件を求めなければならない。そこで、EEC/COLIPA の BALB 3T3 細胞を用いた光毒性試験共同研究²⁾ で用いられた条件を参考にして、照射時間を 50 分間に固定し、分光放射照度を調節して最適な照射線量を検討した。一般に、光毒性・遺伝毒性物質は、照射線量が弱いほど効果が低いので、試験の感度を向上させるために、光そのものの影響が試験遂行上問題にならない程度に低く、かつ自然太陽光の強度を上回るような非

現実的な条件にならない範囲で、最も強い照射条件を最適条件とした。

その結果、放射照度 $1\text{mW}/\text{cm}^2$ にて 50 分間、すなわち $3\text{J}/\text{cm}^2$ 以下では、光そのものによる DNA 切断が 10% 以下に収まることが示されたので、試験結果に与える影響は問題にならないと判断した。また、自然太陽光の UVA 分光放射照度は、昼間では $2\sim 3\text{mW}/\text{cm}^2$ に達するため現実的な範囲に留まると考え、以降のスクリーニング試験には $1\text{mW}/\text{cm}^2$ にて 50 分間、すなわち $3\text{J}/\text{cm}^2$ を用いることにした (Fig. 1)。

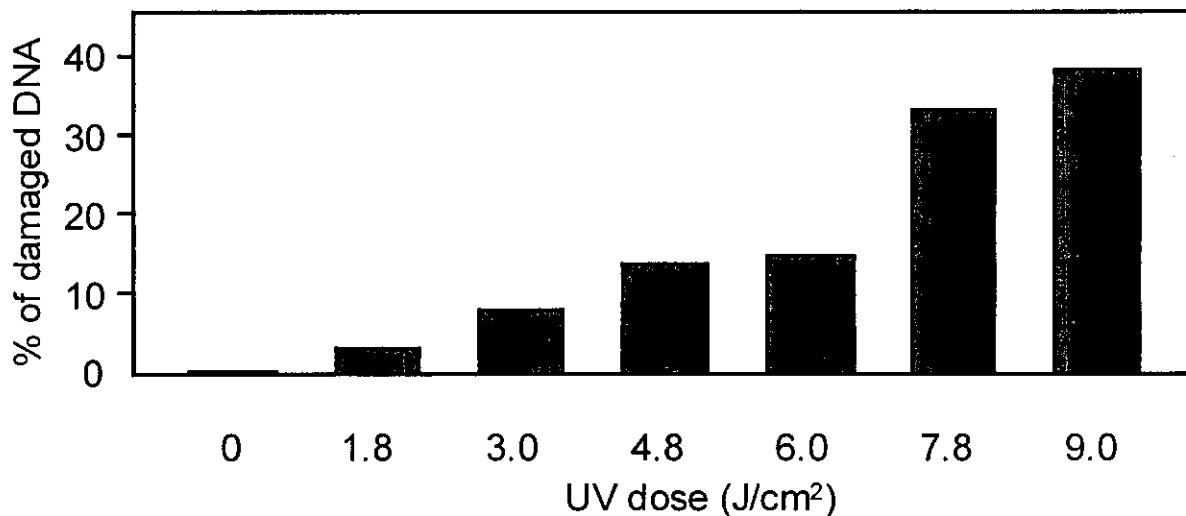


Fig. 1 光照射条件の検討

光照射によるプラスミドの切断を検討した。 $0.6\sim 3.0\text{mW}/\text{cm}^2$ の範囲で放射強度を調節し、50 分間の照射を行った ($1.8\sim 9.0\text{J}/\text{cm}^2$)。その結果、照射線量依存的にプラスミド切断が増加し、光照射のみでも DNA の切断が多量に生じることが示された。

2. 緩衝液の検討

プラスミド弛緩法を行う際には、反応液の pH 変化による DNA 損傷を防ぎ、また高次構造を安定化するために若干の塩を加えるため、緩衝剤を加える。主として、トリス塩酸系緩衝剤もしくはリン酸系緩衝剤が用いられるが、これら 2 者のいずれが、光照射条件下でのプラスミド切断試験に適しているかを調べた。既知の光遺伝毒性物質である

Ofloxacin をモデル光遺伝毒性物質に用い、Ofloxacin を $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む群と、溶媒対照群を設けて、それぞれトリス塩酸緩衝液 (10mM Tris-Cl, pH7.2) とダルベッコリン酸緩衝液中 (カルシウム、マグネシウムフリー)、さらにコントロールとして緩衝液を含まない反応液中で反応を行った。その結果、光照射を行った Ofloxacin 処理群での DNA 切断性は、ダルベッコリン酸緩衝液を用いた