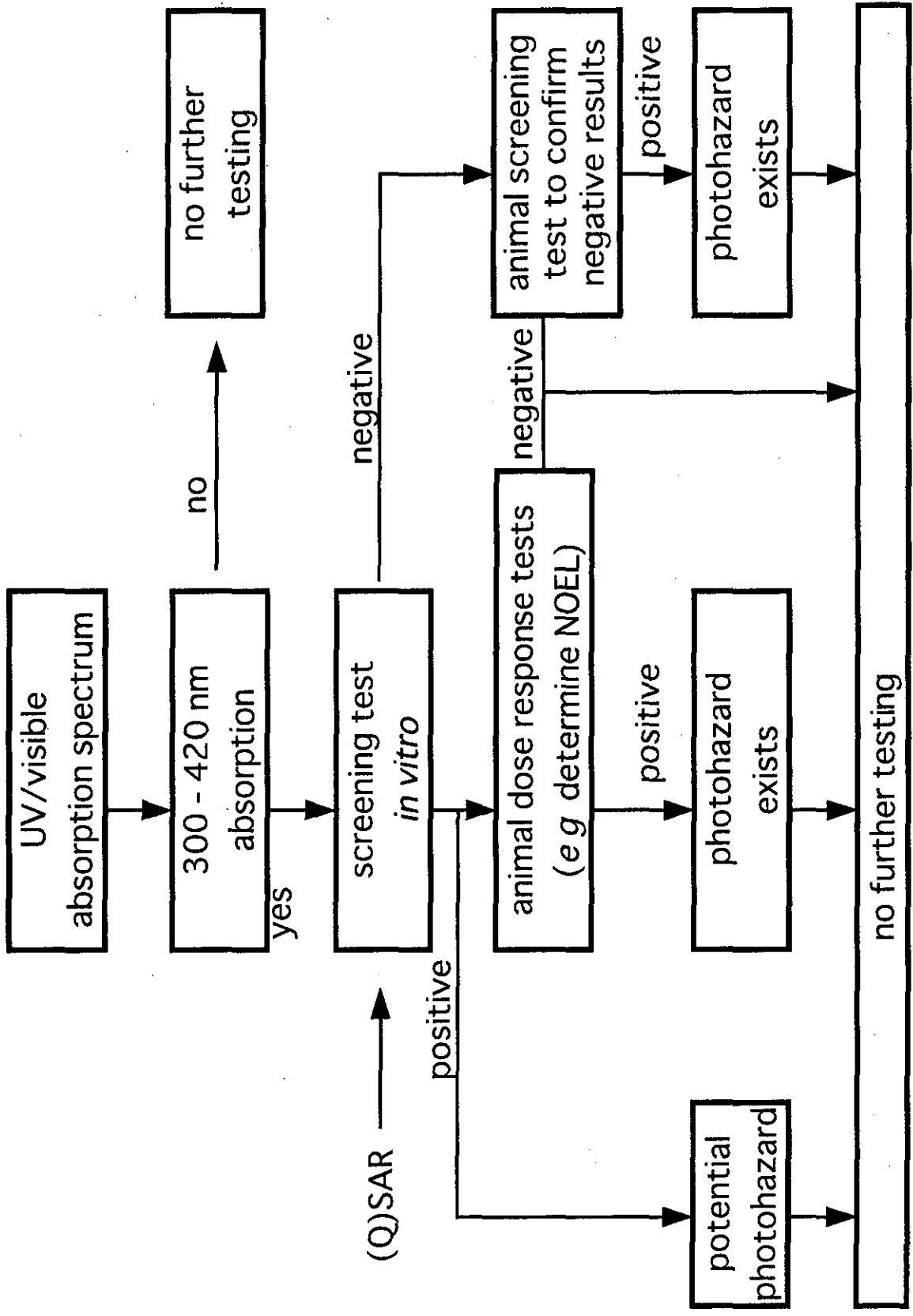


Table 3. 動物を用いる光毒性評価に関する試験法の比較

	Morikawa法 (1975)	急性皮膚光毒性試験 (OECD案 1995)	医薬部外品・化粧品製造申請ガイドブック (1994)	化粧品の安全性評価に関する指針2001 (日本化粧品工業連合会)
動物種	ハートレイ系白色モルモット (約400g) あるいは白色ウサギ (2.5~3.0kg)	急性皮膚光毒性試験 用量依存試験 ウサギ (2.0~3.5kg), モルモット (300~500g), マウス, ラットの各動物種, ウサギを推奨	同左	白色ウサギ, 又は白色モルモット
性, 匹数	10匹	雌雄いずれか10匹 (6匹を照射, 4匹を非照射)	雌雄いずれか最低3匹	1群5匹以上 必要に応じて光照射群, 非照射群 (対照群) を設定
照射	FL-40BLランプ, FL-40SEランプ, FL-40SW-SDL-AP-NUランプなどを単独, または組み合わせて用いる 総エネルギー: 14.1J/cm ² 照射時間: 110分 照射距離: 10cm	慣習的にUV-Aが用いられる UV-A: 約10J/cm ² UV-B: 約0.1J/cm ² 照射時間: 2時間以内 照射距離: 約10cm	同左	UV-A領域のランプ単独, 又はUV-AとUV-B領域の各ランプを併用 照射量: 適切に評価し得る量 一般に10~15J/cm ²
適用	0.05mL/2×2cm ² 適用30分後に照射	1.5×1.5cm ² ; 0.025mL/cm ² 適用30分後に照射 原体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	0.025mL/2.5×2.5cm ² 適用30分後に照射 原体または一次刺激のない濃度	適切に評価し得る面積, 及び用量 必要に応じて数段階濃度
判定	24, 48, および72時間後に紅斑, 浮腫を判定	照射1, 4, 24, 48, および72時間後に紅斑, 浮腫を判定	照射30~60分, 4, 24, 48, および72時間後に紅斑, 浮腫を判定	24, 48, 及び72時間目に投与部位を肉眼観察し, 紅斑, 及び浮腫について適切な採点法で判定
評価	照射部位, 非照射部位の反応を比較し評価	非照射, 媒体対照等を考慮して最大無作用量を決定	非照射, 媒体対照等を考慮して評価	照射部位, 非照射部位の反応を比較し評価

(注) : Ison法 (ヘアレスマウス), Ljunggren法 (マウス), Morikawa法 (モルモット・ウサギ), Sams法 (モルモット), Stott法 (モルモット)

Fig. 1. From OECD Guideline (Draft 1995): Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test



質 50 μ L を左右 2 列に塗布し、片側をアルミフィルムで被覆し遮光する。

- ・塗布後 30 分に紫外線を照射する。光源は東芝製 UV ランプの FL-40BLB、FL-40SE、FL-40SW-SDL-AP・NU を単独、または組み合わせて使用し、ガラスフィルターにより 320nm 以下の紫外線を遮断する。照射エネルギー量は 14.1J/cm² である。
- ・判定は、光照射後 24、48、72 時間に皮膚反応の観察による（紅斑と痂皮、浮腫を別個に 0～4 のスコアで評価）。

なお、この試験手順は、幾つかの変更点はあるが、「化粧品の安全性評価に関する指針 2001」の光毒性試験に記述された内容の原点と考えられる。

この試験法における大きな要因としては、光照射までのラグタイムが挙げられる。中山ら(1985)は、bergapten の事例で、塗布直後に照射を開始すると試料自体の分解により反応強度が弱くなり、またラグタイムが長くなると皮膚内濃度の低下のため反応強度が低下することを報告している⁸⁾。このラグタイムについては Lovell ら(1992)も acridine、anthracene 及び 8-MOP を用いて詳細に検討しており、15 分と 30 分では媒体の影響は小さいが、60 分では媒体の影響が大きくなること、また、7.5 分では皮膚反応は弱い傾向にあることを報告している¹²⁾。彼らは、さらに観察時間についても検討しており、acridine と anthracene は照射後 4 時間が反応最大、8-MOP は 72 時間後が最大となったことを報告している¹²⁾。

その他の要因として、損傷皮膚への適用、媒体効果及び光源の波長等が挙げられる。Morikawa ら(1976)は、損傷のない皮膚への適用では捉えられなかった xanthene 系色素の光毒性が、被験物質の皮内注または損傷皮膚への適用により捉えることが可能になったこと、並びに経皮適用では用いる媒体により反応の強度が影響されることを報告している¹³⁾。さらに、彼らは可視部に吸収をもつ xanthene 系色素の光毒性評価では、可視部に極大波長をもつ光源が有効であることも報告している¹³⁾。

現在、動物を用いる最新の光毒性評価法として OECD ガイドライン案がある。このガイドライン案は「Acute Dermal Photoirritation Screening Test」と「Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test」の 2 部から構成されている。ガイドライン案では、動物福祉の観点から無用な試験の実施を避け、また強刺激性物質の試験を最小限にすることに重点が置かれている。そのため、構造活性相関により皮膚腐食性が予測される物質、pH2 以下の強酸および pH11.5 以上の強アルカリ、経皮投与で高い毒性を示す物質、さらには 310～420nm の紫外部に吸収を持たない物質については試験の実施を要しないとの記載がある。また動物試験に先駆け in vitro 試験を実施し、結果が陰性の場合には「Acute Dermal Photoirritation Screening Test」、結果が陽性の場合には「Acute Dermal Photoirritation Dose-Response Test」を実施することが求められている(Fig. 1)。これらのガイドライン案は経皮投与における試験法であり、Morikawa 法と比較すると動物種としてウサギを推奨している点及び観察時間の相違はあるが、試験自体は良く類似している。また本邦における「化粧品の安全性評価に関する指針 2001」においても試験自体は類似していることから経皮投与の試験法についてはほぼ大枠のコンセンサスが得られているものと考えられる (Table 3)。

3-4) 経口投与や腹腔内投与による試験法

経口投与や腹腔内投与は、抗生物質やサルファ剤等の全身適用を目的とする医薬品等における光毒性評価法として検討されてきた。腹腔内投与の系としては、Isonら(1967)は、hrs/J系のヘアレスマウスに被験物質を投与して紫外線(300~400nm)を $320\mu\text{W}/\text{cm}^2$ で48時間照射し、その後の皮膚反応(紅斑や浮腫)を肉眼観察することにより光毒性物質を検出できることを報告している¹⁴⁾。Samsら(1967)は、モルモットの腹腔内に被験物質を投与して4~10時間太陽を光照射し、その後耳介の傷害を肉眼観察することにより光毒性物質を検出できることを報告している¹⁵⁾。また、彼らは太陽光を各種人工光源に変えた系についても報告している¹⁶⁾。

経口投与により医薬品等の光毒性を評価する試験法としてはWagaiら(1990)の方法がある¹⁷⁾。この方法は、被験物質を経口投与したマウスの全身に光照射し、耳介の皮膚反応と厚さを評価するものであり、医薬品の光毒性評価で汎用されている^{18, 19)}。試験法の概略を以下に記述する。

- ・ 6~7週令(17.1~18.8g)の雌性BALB/cマウスを用いる(1群4~6匹)。
- ・ 被験物質としては、quinolone系抗生物質等が用いられ、媒体(0.5% carboxymethyl-cellulose)を陰性対照としている。
- ・ 10mL/kgを単回経口投与。
- ・ 照射は東芝製UVランプ(FL20SBLB)を用いて経口投与直後から、全身に4時間照射($21.6\text{J}/\text{cm}^2$)。
- ・ 判定は、照射後0, 24, 48時間に耳介の紅斑・浮腫を肉眼観察するとともに耳介の厚さを測定する。また、48時間の観察後に耳介を採取し、病理組織検査を実施する。
- ・ 投与濃度と紅斑の発生頻度をプロットし、紅斑を50%誘導する濃度(EID50)を算出することで、抗生物質の光毒性強度を比較することも可能である。

Wagaiら(1990)の試験法は、マウスの耳介の厚さを測定する点では「5. その他の投与方法による試験法」に記述するMouse Ear Swelling法(MES法)に類似しているが、被験物質の投与経路が経口である点で大きく異なる。また、Hirio(1994)らはモルモットに抗生物質を経口投与し、UVA $30\text{J}/\text{cm}^2$ 照射後の皮膚反応を肉眼観察している²⁰⁾。

その他、全身適用における光毒性評価系としては、Ljunggrenら(1977, 1984)により開発された方法がある^{21, 22)}。この方法は、マウスの腹腔内投与後に尾の部分のみ光照射し、終了後に尾を切断する。採取した尾を乾燥し、乾燥前後の尾の重量から評価するものである。試験法の概略を以下に記述する。

- ・ 雌性マウス(NMRI)で1群5匹以上を使用、週令等の記述はない。
- ・ 被験物質は腹腔内投与(溶けにくい物質は経口投与)。
- ・ 用量は $2.5\text{mg}/\text{kg}$ ~反応量(致死量)。
- ・ 投与後直ちに、尾の部分のみ光照射($5\text{mW}/\text{cm}^2/\text{sec}$)、5時間で $90\text{J}/\text{cm}^2$ 。

- ・光源は Philips TL 40W/ 08(UVA, peak 355nm)。
- ・屠殺は被験物質で異なるが多くの場合、照射開始から 24 時間後。
- ・尾の先 0.5cm の部位から 2cm の長さを切断採取。
- ・110℃で 3 時間乾燥し、乾燥前後の重量変化から相対的水分量を算出。

なお、本論文には、光毒性の有無に関する基準の記載はなく、さらに反応のピークが chlorpromazine では 24 時間、8-MOP では 72 時間と異なっており、尾の採取時期が増える程動物数が必要であるという問題点を有している。

いずれにしても全身適用系の薬剤の評価では、薬剤の体内動態との関係で照射時間や照射までのラグタイムについて検討する必要があると思われる。

3-5) その他の投与方法による試験法

その他の試験法としては、被験物質を耳介に塗布して光照射後の腫脹の厚さを測定する Ear Swelling 法^{23, 24)}、皮内投与後に光照射して皮膚の厚さを測定する方法^{25, 26)}、光感作性試験の対照群の皮膚反応から光毒性を評価する方法²⁷⁾などが挙げられる。

Gerberick ら(1989)は、マウスの耳介腫脹測定 (Mouse Ear Swelling (MES)) を提案している²³⁾。試験法の概略を以下に記述する。

- ・BALB/c 系雌性マウス (20~25 g) を用い 1 群 4~5 匹を使用する。
- ・被験物質または媒体 (acetone, acetone-corn oil, MtOH) を両耳に 8 μ L ずつ塗布する。
- ・塗布後 30~60 分後に片耳のみ光照射 (非照射の片耳は実験者の手で保護する)。
- ・光源は 150-W xenon short-arc UV solar simulator (Solar Light Company, USA) を使用し、照射量は最大 10 J/cm²。
- ・観察時間は被験物質で異なり、8-MOP は反応が遅い時間 (48 時間以降) に延びてくるが、anthracene は速い時間にピークがある (20~30 分)。

この Ear Swelling 法をモルモットで検討したのが Stott ら(1970)の報告である²⁴⁾。Stott らは、Hartley 系モルモットの耳介に、DMSO に溶解した被験物質と媒体対照として DMSO を 1 日 2 回、3 日間継続塗布した。なお、動物は光照射下と非照射下で 3 日間飼育する 2 群を用いた。耳介の厚さの測定は、処置開始後 24、48、72 時間に行い、照射群及び非照射群とも被験物質による厚さから媒体 (DMSO) による厚さを差し引き算出し、さらに照射群及び非照射群の差から既知の光毒性物質の検出が可能であることを報告している²⁴⁾。

皮内投与後に光照射して皮膚の厚さを測定する方法は、Selvaag ら(1997)により報告されている^{25, 26)}。試験法の概略を以下に記述する。

- ・6~20 週令の雌性ヘアレスマウス (hr/hr-c3H/TifBom) を使用する (1 群 6~7 匹)。
- ・被験物質は経口糖尿病薬や利尿薬で、陰性対照は媒体の DMSO とする。
- ・動物を麻酔後、直径 6 mm の穴 (2ヶ所) の空いた Duoderm で覆う。
- ・その穴を通して被験物質の DMSO 溶液を 50 μ L 皮内投与する。
- ・もう一つの穴には DMSO のみ皮内投与する。

- ・照射光源は Bluelight 2000(Honle 社製、Germany)で、照射量は 6~12 J/cm² (UVA)と 45~89 mJ/cm² (UVB)。
- ・判定は、照射 24, 48 時間後に皮膚反応を観察し、さらに皮膚の厚さをゲージで測定し、陰性対照との差を求める。

また光毒性は、光感作性試験の対照群における光照射部位の反応からも評価可能と考えられる。一般に光感作性試験では免疫助剤として FCA を使用しているため、正常の動物と比較すると検出感度が変化していることが考えられる。しかし、FCA を用いない光感作性試験法では光毒性を評価可能と考えられる。Buehler ら(1985)は、閉塞パッチ試験と光照射を組み合わせた光感作性試験法を開発した²⁷⁾。試験法の概略を以下に記述する。

- ・モルモットの詳細な記述はない（感作性試験の Buehler 法と同一と考えると、Hartley 系モルモットで体重は 250g)²⁸⁾。
- ・誘導は 1 群 10 匹。
- ・適用面積や適用量の記述なし（感作性試験の Buehler 法と同一と考えると、7/8 x 1 inch のパッチに被験物質 0.5mL を適用)²⁸⁾。
- ・被験物質は musk ambrette, 6-MC, TCSA, 8-MOP, Triton X-15。
- ・パッチの 18 時間前に脱毛処理を実施。
- ・modified Hill Top Chamber を使用し、被験物質を閉塞パッチ。
- ・パッチは 1 日 4 時間閉塞で、1 週間に 3 回、3 週間連続実施。
- ・各パッチ除去後に、2 時間光照射。
- ・光源は 12 本の blacklight lamps (UVA)、ただし、6-MC の場合はその内 1 本を sunlamp (UVB)に交換して使用。
- ・誘発は最終誘導から 10~14 日後に実施し、4 時間閉塞パッチ後、2 時間光照射。
- ・判定は 24, 48 時間後に皮膚反応を肉眼観察（0. 5 : パッチによる紅斑、1 : 弱い紅斑、2 : 中程度の紅斑、4 : 強度の紅斑）。

その他の試験法については、まだ検討段階にあり、被験物質の特性や評価の目的により選択して行くことが必要と考えられる。

3-6) ヒトを用いる試験法

ヒトにおいては、光アレルギー性を検討する光パッチテストは存在しているが、光毒性を評価する試験法はまだない。現在、EU では光パッチテスト研究グループが、光毒性を評価するプロトコルを検討している。彼らが共通のプロトコルとして提案した手順は以下の通りである²⁹⁾。

- ・被験物質は Finn Chamber を用いて背中に 24 時間貼付。
- ・照射は 10 J /cm² UVA (320~400nm)。
- ・判定は、直後、24, 48, 72 時間。
- ・対照は非照射の Patch test 群。

その他、抗生物質の光毒性をヒトを用いて検討している論文が幾つかある。Vousden ら (1999)は、quinolone 系抗生物質(Gemifloxacin)を健常ボランティア (1群10名)に、連続7日間内服させ、モノクロメーターを使用し投与前及び投与5日目にMED(最小紅斑量)を測定した。光毒性の評価は、 $PI = \text{MED}(\text{pre drug}) / \text{MED}(\text{on drug})$ により以下の区分で行っている³⁰⁾。

$1.4 < PI < 3$: mild phototoxicity, $3 < PI < 6$: moderate phototoxicity,

$PI > 8$: severe phototoxicity

この方法は、光毒性物質がMEDを低下させることを指標としており、抗生物質の評価に使用されている³¹⁾。

また抗生物質内服後、光照射し、その後の皮膚反応を観察する方法も報告されている。Bjellerup ら(1994)は、tetracycline 系抗生物質 (Lymecycline) を健常ボランティア (1群5名)に、連続3日間服用させ、服用3日目の服用2時間後に、UVA Sun 3000 apparatusを用いてUVAを25, 50, 75, 100 J/cm²の4段階で照射した。観察は照射6時間後に実施し、紅斑と浮腫の程度を、1. 紅斑、2. 著しい紅斑、3. 紅斑と浮腫で評価している³²⁾。

ヒトを用いる試験法については、世界的にもガイドライン化されたものはなくまだ検討段階にあると思われる。本邦においてもこれらの研究の進展を注目して行く必要があると思われる。

3-7) おわりに

これまで報告されてきた in vivo で光毒性を評価する方法について調査した。その結果、光毒性を評価する方法についてはかなり古くから検討がなされ、非常に多くの試験法のあることが明らかとなった。また、その一部である経皮投与による試験法については大卒のコンセンサスが得られガイドライン案が提案されている。

in vivo で光毒性を評価する方法については、ヒトでの傷害が明らかになった物質を見出すことを目的に、その投与経路や毒性発現機構を考慮して多くの試験法が開発されてきたものと考えられる。そのため、検討する物質により各施設が独自の試験法を選択し、長期間使用しているため、施設内の再現性は高いと考えられる。しかし、試験法の施設間 validation は実施されていないため、施設間の再現性については議論することはできない。また、false positive や false negative についてであるが、false positive は、in vivo 試験で陽性を示した物質がヒトでは陰性であるということである。通常、in vivo 試験で陽性を示した物質をヒトで確認するということは、特殊な場合を除いて考え難く、データの入手も困難と思われる。一方、false negative は、in vivo 試験で陰性と評価された物質がヒトでは毒性を示したということである。この点に関しては、市場でトラブルを起こした物質や臨床で問題となった物質が in vivo 試験で捉えられるかによって判断可能である。この作業は過去に in vivo の光毒性試験を開発してきた過程と全く同じである。問題はこの作業により開発された試験法がどこまで適用可能かを示すことである。この問題を解決するためには、ヒ

トでの光毒性データベースを確立し、in vivo 試験により評価することが必要である。つまり、現状では、in vivo で光毒性を評価する方法については、false positive や false negative の議論は不可能ということである。

ECVAM では Workshop に医師の参加を呼びかけ、過去に光毒性を示した化合物のとりまとめ、光パッチテスト法により光毒性を実証してきたようである²⁹⁾。本邦においても、医師と研究者が連携し、ヒトでの光毒性データベースを作成し、さらには in vivo や in vitro で光毒性を評価する試験法やその結果について自由に討議できる場(Workshop)が必要と考える。このことが、試験法の精度向上、または新たな試験法の開発、さらには安全性評価の向上につながることを期待したい。

引用文献

1. 黒川雄二他、新化粧品等安全性評価指針班報告書、1990年。
2. 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)。
3. 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)。
4. Marzulli F.N., et al, J. Soc. Cosmet. Chem., 21, 695-715 (1970)。
5. Girard J., et al, Dermatologica, 158, 229-243 (1979)。
6. Morikawa F., et al, Techniques for evaluation of phototoxicity and photoallergy in laboratory animals and man, Sunlight and Man, 529-557 (1974)。
7. 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)。
8. 中山 靖久他、香粧会誌, 9, 47-54 (1985)。
9. 門馬 純子他、衛生試験所報告, 第111号, 18-24 (1993)。
10. Kim Y.O., et al, Arch. Pharm. Res., 22, 143-150 (1999)。
11. Kobayashi I., et al, J. Toxicol. Sci., 24, 103-112 (1999)。
12. Lovell W.W., et al, Food Chem. Toxicol., 30, 155-160 (1992)。
13. Morikawa F., et al, J. Dermatol., 3, 59-67 (1976)。
14. Ison A., et al, J. Invest. Dermatol., 49, 508-511 (1967)。
15. Sams W.M., et al, J. Invest. Dermatol., 48, 89-94 (1967)。
16. Sams W.M., et al, Arch. Dermatol., 94, 773-777 (1966)。
17. Wagai N. et al, Toxicol. Lett., 54, 299-308 (1990)。
18. Shimoda K., et al, Toxicol. Pathol., 21, 554-561 (1993)。
19. Mayne J.T., et al, J. Antimicrob. Chemother., 39, 67-73 (1997)。

20. Horio T., et al, *J. Dermatol. Sci.*, 7, 130-135 (1994).
21. Ljunggren B., *Photodermatol.*, 1, 96-100 (1984).
22. Ljunggren B., et al, *Acta Derm. Venereol.*, 57, 325-329 (1977).
23. Gerberick G.F., et al, *Food Chem. Toxicol.*, 27, 813-819 (1989).
24. Scott C.W., et al, *J. Invest. Dermatol.*, 55, 335-338 (1970).
25. Selvaag E., et al, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 13, 4-8 (1997).
26. Selvaag E., et al, *In Vivo*, 11, 103-107 (1997).
27. Buehler E.V., et al, *Food Chem. Toxicol.*, 23, 689-694 (1985).
28. Buehler E.V., *Arch. Dermatol.*, 91, 171-177 (1965).
29. Spielman H., et al, *ATLA*, 28, 777-814 (2000).
30. Vousden M., et al, *Chemotherapy*, 45, 512-520 (1999).
31. Man I., et al, *J. Antimicrob. Chemother.*, 43, 77-82 (1999).
32. Bjellerup M., et al, *Br. J. Dermatol.*, 130, 356-360 (1994).

第4章 光毒性試験代替法について

4-1) はじめに

担当：岡本 裕子

光毒性発現の主要因としては、化学物質に光を照射した際、照射により化学物質が励起状態となり、そのエネルギーが何らかの形で放出される時に、細胞膜、DNA 等を中心に細胞全体を傷害することで発現すると考えられている。これらの光毒性反応には分子状酸素の関与が大きいことが知られている。この様な光毒性発現のメカニズムを踏まえて多様な *in vitro* 光毒性試験法が開発されている。文献調査の結果から得られた各種 *in vitro* 光毒性試験法のまとめを Table 4-1 に示した¹⁻¹⁴⁾。現在までに報告されている *in vitro* 光毒性試験法は、主にスクリーニングを目的とした試験法とメカニズム評価に重点を置いた方法に大別されている。スクリーニングを目的とした試験法では、細胞や微生物等の致死や増殖阻害等を指標とした評価が主体であり、細胞の種類、培養形態や毒性の指標の異なる様々な試験法が評価されている。また、メカニズム評価に重点を置いた試験法では、光毒性の発現メカニズムの考察から光毒性反応の標的と想定される生体膜の損傷やタンパク質に対する作用を評価する試験法が報告されている。さらに、光毒性反応に対する分子状酸素の関与が高いことから、脂質の過酸化反応を評価する方法や発生する活性酸素種を化学物質で捕捉する方法等が報告されている。

これらの試験法のうち Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とする方法が EU/COLIPA のバリデーションで光毒性試験代替法としての妥当性が検討されている¹⁵⁻¹⁷⁾。

参考文献

- 1) 岡本裕子 (2001) *In vitro* 光毒性評価における活性酸素種の影響。環境変異原研究 23, 73-81.
- 2) Colombain M, Goll V, Muyard F, Girard C, Bevalot F, Richert L. (2001) A bioassay using the human hepatoblastoma cell line HepG2 for detecting phototoxicity of furocoumarins. *Planta Med.* 67(7) 644-6.
- 3) Wilhelm KP, Biel S, Siegers CP. (2001) Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine.* 8(4) 306-9.
- 4) Clothier R., Willshaw A., (1999) The Use of Human Keratinocytes in the EU/COLIPA Study on UV Filter Chemicals, *ATLA* 27 247-259
- 5) Van Graft M, Boot JH. (1996) Photodynamic effects of protoporphyrin on the cellular level-an *in vitro* approach. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 32(7) 394-8.
- 6) Rosen JE, Prahalad AK, Schluter G, Chen D, Williams GM. (1997) Quinolone antibiotic photodynamic production of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cultured

- liver epithelial cells. *Photochem. Photobiol.* 65(6) 990-6.
- 7) Vandenberg AL, Cuveele JF, Proot P, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA. (1997) Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. *J. Photochem. Photobiol. B.* 38(2-3) 136-42.
 - 8) Morgan J, Potter WR, Oseroff AR. (2000) Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative. *Photochem. Photobiol.* 71(6) 747-57.
 - 9) Misra RB, Joshi PC. (1999) Phototoxicity evaluation--*Tetrahymena thermophila* as an alternative model. *Indian J. Exp. Biol.* (8) 750-7.
 - 10) Ojala T, Vuorela P, Kiviranta J, Vuorela H, Hiltunen R. (1999) A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Med.* 65(8) 715-718.
 - 11) Vargas F, Mendez H. (1999) Study of the photochemical and in vitro phototoxicity of chlorthalidone [2-chloro-5-(1-hydroxy-3-oxo-1-isoindolinyl)benzene sulfonamide]. *Pharmazie.* 54(12) 920-922.
 - 12) Kawada A, Hatanaka K, Gomi H, Matsuo I. (1999) In vitro phototoxicity of new quinolones: production of active oxygen species and photosensitized lipid peroxidation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 15(6) 226-30.
 - 13) Yan C, Liao K, Hu Y, Xu Y. (1999) Quantitative in vitro assessment of drug phototoxicity by a chemiluminescence method. *Chin Med J.* 112(6) 501-503.
 - 14) Bosca F, Carganico G, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Hernandez D, Mauleon D, Martinez LA, Miranda MA. (1995) Evaluation of ketoprofen (R,S and R/S) phototoxicity by a battery of in vitro assays. *J. Photochem. Photobiol. B.* 31(3) 133-8.
 - 15) Spielmann 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.
 - 16) Spielmann et al. (1998) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1 :The 3T3 NRU Phototoxicity Test, *Toxicology in Vitro* 12, 305-327.
 - 17) Spielmann et al. (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, *ATLA* 26, 679-708.

Table 4-1 *in vitro* 光毒性試験法

1 スクリーニングを目的とした試験法

1) 単層培養細胞を用いた試験法

①細胞の種類

Human keratinocytes (A431 human epidermal cell line, HaCaT cells, NHK cells)

Human fibroblasts (normal human fibroblasts)

Hepatocytes (HepG2)

Human carcinoma cells (2008, 2008ET3)

Human lymphocytes

Animal fibroblasts (Balb/c3T3, Rabbit CHV79: hamster)

Animal cells (monkey and rabbit kidney cells, mouse macrophages, rat hepatocytes)

②評価の指標

Neutral red uptake assay

MTT reduction assay

DNA synthesis assay (tritium uptake, 8-oxo-dG formation)

LDH leakage assay

Colony formation assay

2) その他の細胞を用いた試験法

微生物: *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*

その他: *Tetrahymena thermophila* (原生動物), *Artemia Salina* (brine shrimp)

3) 培養皮膚モデルを用いた試験法

市販モデル及び再構築モデル

2 メカニズム評価を目的とした試験法

1) 生体膜損傷を指標とした試験法

Photohaemolysis (human red blood cells, calf red blood cells)

2) タンパク質に対する作用を評価する試験法

Haemoglobin photooxidation

Photobinding to protein (human serum albumin, gamma-globulin, insulin)

3) その他化学物質を用いた試験法

Linoleic acid peroxidation

Histidine, Tryptophan, Glutathione (photooxidation)

岡本裕子 (2001) 環境変異原研究 23, 73-81.

4-2) Balb/c 3T3 細胞を用い、ニュートラルレッド取り込みを指標とする光毒性試験方法(3T3-NR 法)の評価

4-2-1) 3T3-NR 法を選択した理由

担当：田中憲徳

培養細胞を用いた光毒性試験代替法は、基本的には従来からある細胞毒性試験方法に光照射を組み合わせた試験方法である。この系の基本となる細胞毒性試験としては、コロニー形成試験や MTT 法、クリスタルバイオレット法など多くの方法があるが、わが国の日本動物実験代替法学会で実施された細胞毒性試験のバリデーションスタディ¹⁻⁸⁾においては、ニュートラルレッドの細胞内取り込みを指標とする細胞毒性試験法(NR 法)を比較的感度が高く安定した結果が得られると評価した。NR 法は、Borenfreund と Puerner によって報告⁹⁾された試験法で、生細胞では赤色素ニュートラルレッドがリソゾームに取り込まれて蓄積する事を利用した方法で、一般的によく用いられている方法である。

この Balb/c 3T3 細胞を用いる NR 法による光毒性試験(3T3-NR 法)は、ヨーロッパで数回にわたってバリデーションスタディ (EU/COLIPA) が実施され¹⁰⁻¹²⁾、その結果、*in vivo* 光毒性のデータと極めて相関が高い事が示されている。逆にいえば、ガイドラインへの採用を意識して施設間バリデーションスタディが実施されたのはこの試験系しかないといえる。そこで本法については次章 4-2-2) において、さまざまな角度から文献的に評価をおこなった。

試験の手順としては、先ず細胞を 96 ウェルプレートに播種する。翌日、被験物質を緩衝液に溶解して種々の濃度の処理溶液を調製し、60 分間前処理、引き続き、50 分間光照射後新鮮な培地に交換し、更に 24 時間培養する。その後、ニュートラルレッドを加えて細胞に取り込ませ培養を終了する。生細胞に取り込まれた色素を抽出し、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定して細胞毒性を算出する。

3T3-NR 法には次のような長所、短所があげられる。

長所：

- i) 試験法が比較的簡単である。
- ii) 細胞播種して結果が得られるまで 3 日という短期間で試験が終了する。
- iii) 96 ウェルプレートを用いるので、インキュベータのスペースをとらない。
- iv) マイクロプレートリーダーを用いて測定するので、測定が簡単である。
- v) 再現性の高い安定した結果が得られる。
- vi) バリデーションの結果より、OECD ガイドライン案では Balb/c 3T3 細胞を推奨しているが、原理的にはどのような細胞でも用いることができる。接着細胞だけでなく、工夫する事で浮遊細胞にも適用する事が可能である。

短所：

- i) 太陽類似光による光源を用いなければならないが、ランプの種類によって波長特性が異なる為、化学物質との光化学反応や毒性として発現してくる生物学的な反応も変ってくる。そのため、ランプの波長特性を予め把握しておくと同時に、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とっておく必要がある。
- ii) UV 測定器についても同様に、UV強度を検出する為の波長ウィンドウがメーカーによって異なるので、絶対照度を測定する事が難しい。
- iii) 照射時に緩衝液に溶けないような被験物質については、正確なデータが得にくい可能性がある。
- iv) 現時点では S9 mix 中の補酵素などの妨害により、代謝活性化の過程を含む光毒性試験が組めない。
- v) 光毒性の発現にはいくつかのメカニズムがあると考えられる。化学物質そのものの光化学反応により発生したラジカルなどによる傷害や、光で分解した二次産物による毒作用など、細胞死にいたる原因は化学物質の特性によってさまざまであるが、そのメカニズムの特定は本試験から得られた結果のみでは難しい。

参考文献

- 1) Ohno, T. et al. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-I. Overview of the Study and Analyses of Variations of ED50 Values. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 1-38.
- 2) Omori, T. et al. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-II. Stastical Analysis. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 39-58.
- 3) Omori, T. et al. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-III. Quality of Collected Data Files. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 59-73.
- 4) Tanaka, N. et al. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-IV. Details of the Colony Formation Assay. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 74-86.
- 5) Itagaki, H. et al. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-V. Details of the Crystal Violet Staining Assay. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 87-98.
- 6) Ohno, T. et al. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-VI. Details of the LDH Release Assay. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 99-118.
- 7) Itagaki, H. et al. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-VII. Details of the MTT Assay. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 119-130.
- 8) Ohno, T. et al. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-VIII. Details of the Neutral Red Uptake Assay. *Altern. Animal Test. Experiment.* 5, 87-98.
- 9) Borenfreund E, Puermer JA. (1985) Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red. *Toxicol Lett* 24, 119-24
- 10) 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.

- 11) Spielmann, H. et al., (1998) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test, Toxicology in Vitro 12, 305-327.
- 12) Spielmann, H. et al., (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, ATLA 26, 679-708.

4-2-2) バリデーショングデータの評価 (バリデーショングとしての妥当性、結果の従来法との相関性、統計解析の妥当性)

4-2-2-1) バリデーショングデータの質

担当：大森 崇、小島肇夫

A. はじめに

バリデーショングは特定の代替法の妥当性を評価する上で欠かせないステップである。特に代替法が行政的に受け入れられるか否かを判断するためには当該行政上の対象とする物質群について複数の施設でその妥当性が示されなくてはならない。この施設間バリデーショングにおいては、明確に定められた同一のプロトコルを用いて複数の施設で試験を実施するものであり、個々の施設ではプロトコルに厳格に従って試験を実施する必要がある。その際、必要に応じて SOP を充実させることが重要であり、定められた SOP の遵守状況は研究の結果に大きな影響を与える。また、各施設で実施された試験データの収集方法や状況、評価時に計算から除外されるデータの取り扱い等も、施設間バリデーショング研究の質を評価する上で重要な要素である。

このようなデータの質を第三者がチェックするためには、プロトコル、生データ、データの修正記録、データ検討会の議事録等を確認する必要がある。しかし、公表論文からこれらをチェックすることは、一般に非常に難しい作業である。しかしながら、データの質に関する記述が公表論文中にまったくないわけではない。ここでは、今回の評価の対象となった EC/COLIPA で実施された Balb/c 3T3 細胞を用いた光刺激性試験代替法の施設間バリデーショング研究結果が記載されている文献¹⁻³⁾に基づき、このバリデーショング研究の質について検討した。

通常、施設間バリデーショング研究は、事前の予備的な検討とそれによって作成されたプロトコルを検証する段階の2つの相で行われる。EC/COLIPA で実施された施設間バリデーショング研究の場合も、予備的な検討として Phase I 研究¹⁾が、検証段階として Phase II 研究²⁾が実施された。さらに、陰性物質の評価に関する情報を得るために、Phase III 研究³⁾として UV filter chemicals を被験物質に加え、追加研究が実施され、その結果が報告されている。Balb/c 3T3 細胞を用いニュートラルレッドの取り込みを指標とする光毒性試験法(3T3-NR 法)の施設間バリデーショングについて報告している文献はこの3報のみであったことからここでは、この3つの報告の内容について評価を行う。我々が評価した文献は下記の3報である。

・ Phase I 研究

EEC/COLIPA Project on In Vitro Phototoxicity Testing: First Results Obtained with A BALB/C 3T3 Cell Phototoxicity Assay, H. Spielmann et al., Toxicology in Vitro 8 (1994) 793-796.

・ Phase II 研究

The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1 : The 3T3 NRU Phototoxicity Test, H. Spielmann et al., Toxicology in Vitro 12 (1998) 305-327.

・ Phase III 研究

A Study on UV Filter Chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, H. Spielmann et al., ATLA 26 (1998), 679-708.

また、ここでは、3報のデータの質について評価を行う上で我々が注目した点をチェックリストとしてまとめた。このリストは、まだ十分な検討を必要とするものであるが、今後の代替法バリデーション研究のデータの質をチェックする上での参考になるであろう。

B. 質を確保するためのプロトコルや SOP の工夫

3つの研究のいずれについても、実施されたプロトコルの詳細は不明であった。また、どのような SOP に基づくのかも文献には明確に示されてはいなかった。文献に記載された範囲において、データの質を確保する上で工夫がなされていたと思われる点を以下に示した。

B -1 Phase I 研究

- ・すべての施設で同じ UVA 照射器 (SOL500) が用いられた。
- ・細胞の継代数の標準化が行われた。しかし、これは実施前に行われたことかどうか不明であった。
- ・試験における最高用量 (濃度) が定められ、その用量で光照射しても毒性が見られない場合には光毒性を無しと判断した。

B -2 Phase II 研究

- ・用いられる UV 照射器は同一のもの (SOL 500) に統一された。(実際には1施設が異なる照射器を使用した。)
- ・SOP は主施設がドラフトを作成し、すべての施設で確認され、必要に応じて改訂され、承認されたものが統一 SOP として使用された。(細部が施設ごとに独自の方法を用いる可能性があったかどうかは不明である。)
- ・被験物質は試験に関与しない第三者によりブラインド化され配布された。
- ・Phase I で用いられていた予測モデルである PIF は、照射の有無による2つの用量反応曲線から得られる IC50 から算出されるが、用量反応曲線の形により IC50 が得られない場合には値として PIF を得ることができないため、そのような場合においても計量値としての得ることが

できる MPE も予測モデルとして評価尺度に加えられた。

- ・各施設における個々の被試験物質評価は、同一の試験を独立に 2 回行うことによるとされた。

B -3 Phase III 研究

- ・基本的に Phase II 研究の SOP に従い試験が実施された。
- ・被験物質溶解のための溶媒の使用法と被験物質の適切な濃度に関する SOP が新たに作成された。
- ・被験物質はブラインド化された。(Phase II と同じ)

C. パリデーション研究期間中のプロトコールの変更や逸脱

試験結果を評価する時、プロトコール違反や SOP 違反、また、データの不整合がないことに越したことはないが、どのようにプロトコールや SOP を工夫しても、施設間パリデーションにおける誤りや誤解の発生の可能性を完全になくすことはできないであろう。また、試験実施前にプロトコールに不備等が見つかった場合にプロトコールの変更がなされることもあるだろう。プロトコールの変更、誤り・不明な点・記録不足などに対するデータの扱い、結果としての防止できなかった逸脱状況を調べることは、研究結果の質を評価する際に重要な点の一つであり、OECD の報告⁴⁾でも GLP 基準に準じて試験結果の作成、実施、記録が必要とされている。

3つの研究の中で、この点について詳細な記載をしていたのは、Phase II 研究のみであった。これは Phase II 研究が検証試験として位置付けられた研究であったためかもしれない。しかし、施設間パリデーション研究は複数施設で試験が実施される研究であり、施設間の違いを評価することが研究の目的の一つであることを考慮すると、各施設から得られたデータの取扱いについての記載がなされていることが望ましい。以下に3つの研究におけるプロトコールの変更、データ収集時の手続き、プロトコールの逸脱について記載されている点をまとめた。

C -1 Phase I 研究

- ・除外されたのか、求められなかったのかは不明であるが、用量当たりの例数が物質によって異なっていた。
- ・評価尺度 (PIF) を計算できた物質は 20 物質中 15 物質であった。

C -2 Phase II 研究

- ・MS EXCEL スプレッドシートによりデータの提出がされた。(詳細なフォーマット形式が指定されていたかどうかは不明)
- ・規定通りのデータが完全に得られているかどうかチェックされた。
- ・すべてのデータシートに記入されている数値の形式がチェックされた。
- ・濃度単位誤入力の有無のチェックがされた。
- ・SOP からの逸脱の有無と結果への影響がチェックされた。
- ・評価した 9 施設中 1 施設について、30 物質中 14 物質が、照射の有無についての 2 つの試験が同時に行われなかったため、SOP 不適合となった。

- ・ vivo データの質が不十分であるとみなされたため、1物質のデータが vivo データとの対応性の評価の計算から除外された。(この物質を評価した施設が8施設あったため、256 データ中8 データが除外された。)
- ・ 被験物質の溶媒として、SOP には EBSS を使用することが勧められていたが、必要な場合にはエタノール等の溶媒を用いることが記載されていたため、施設により使用された溶媒に差が生じた。(結果は大きな違いがなかったと考察された。)
- ・ UV 照射器に SOL 3 を用いた一施設あった。(両者のスペクトルは非常に似ているため違いは小さいと考察された。)
- ・ 試験の最適な濃度の選択について SOP に規定されていたが、低い濃度を選択したラボがあった。
- ・ 同一実験を2回施行することになっていたが、2回の施行で異なる溶媒を用いた施設があった。

C -3 Phase III 研究

- ・ 2回の試験のうち PIF または MPE が求まらないデータはなかった。
- ・ PIF と MPE の値は各施設で同一のソフトを用いて求められた。

D. 研究間の違い

3つの研究は一連の研究であるために、基本的には同一の試験方法で実施されている。しかし、研究が進むことにより、新たな進展が見られる。以下に研究間の違いをまとめた。

- ・ 予測モデルとして、Phase I 研究では PIF を用い、Phase II 試験以降は PIF と共に MPE も用いられている。
- ・ Phase III 研究では被験物質はブラインド化されているが、ブラインド化の各物質について適切な溶媒や濃度範囲が指定されている。

E. データの監査

実施された試験のデータの質を確保することは、データの信頼性、再現性、客観性を保証することになる。そのためには、評価に用いるデータの源となる各施設に対する規範と第三者による監査が必要となるであろう。ここでは、文献による評価について議論を進めているが、文献による評価ではこの作業を我々が行うのは実際上不可能である。また、今回検討したいずれの文献にも監査が、第三者により行われたという記載はなかった。また、文献には、PIF や MPE を求めるために使用された生データ、試験情報までは示されておらず、このレベルにおける質の評価は不可能であった。

F. 質の評価

ここでは、EC/COLIPA で実施された Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法のバリデーション研

究結果が記載されている文献に基づき、質の評価を行った。3つの研究を比べると、特に主要なバリデーション研究となった Phase II 研究は、データの質を確保するためにどのようなことが行われていたのかがよく記載されている文献であるといえよう。他の2つの研究は、質について判断するために必要な情報に関してあまり詳細な記載がない。このことは、質が良いとか悪いということではなく、質について評価ができないということの意味する。その意味では、Phase II 研究は、他の2つの研究に比べて信頼性の高い結果といえるであろう。代替法のバリデーションやその行政的受け入れのための基準については OECD⁴⁾で示されているが、バリデーション研究を文献評価のみで行う際に報告される文献中にどのような記載が必要であるかを明確に記述した文書はない。後述するように、ここでは、これについてわずかながらの提言をしている。

また、項目 E で記述したように、文献による質の評価は、生データがどのように得られたかについてまでのことを知ることはできない。今後、動物実験代替法が化学物質の評価方法の一つとして行政的に受け入れられるようになるためには、バリデーション研究のデータの質を保証するために、何らかの形で第三者が生データや、試験の実施状況や研究の進行状況を確認するための記録等が必要となるかもしれない。

G. 提言

試験の結果を評価する上で、データの質を論じることは重要であるが、文献評価の場合には、記載がされてなければ、どのようなことが行われているかは不明となってしまう。記述されていないことは、質がよいことを保証しているわけではなく、不明であるというだけであるので、第三者が文献を評価する場合には、その部分は不明であると判断するほかは無い。しかし、例えば、データの一致性のチェックが、その研究の中で行われているということが研究結果を報告する文献中に記載されていればチェックがされたことは知ることができる。このような記載がないものとあるものとは、質の評価を変えるべきであろう。我々が今回評価を行う際には、文献レベルでのバリデーション研究の質の評価法を構築する必要性が生じた。これらを解決する一つの方法として、データの質に関する記述がどこまでされているかをチェックするためのチェックリストの使用があげられる。その際に問題になるのはどのような項目を用いるかであるが、参考にすべきものが特になかったため、Phase II 研究を参考にチェックリストを作成した。これを付録に示す。Phase II 研究を参考にした理由は、この研究の報告が、データの質という点に関してよく記載されていたためである。このようなチェックリストを利用した時にチェックができない項目が多い場合は、試験の質について言及できない試験ということになるであろうし、そうでない場合は、試験の質が配慮された試験ということになるであろう。このチェックリストはまだ改善される余地が十分にあるが、リストが公になり、ここで記載されている項目が注意して論文に記載されるようになれば、試験の質はおのずと高くなるであろうし、求められる研究のあり方だと思われる。

上記のようなチェックリストを用いたとしても、文献のみによる質の検討は限界がある。例

えば、各施設のそれぞれの用量反応曲線を得るための生データまで文献に記載されることはないであろう。つまり、文献による質の検討では、この本当に記載されている予測モデルの値等が正しいかどうかを確認するというような評価は不可能である。

H. 結論

文献のみによる質の評価は十分には行えない。従って必要に応じて独自のバリデーションを行い、試験法の妥当性を確認する必要がある。このバリデーションの規模と内容は事前に得られているデータの質の評価結果に依存している。

参考文献

- 1) 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.
- 2) Spielmann, H. et al., (1998) The International EU/COLIPA In Vitro Phototoxicity Validation Study: Results of Phase II (Blind Trial). Part 1: The 3T3 NRU Phototoxicity Test, *Toxicology in Vitro* 12, 305-327.
- 3) Spielmann, H. et al., (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, *ATLA* 26, 679-708.
- 4) OECD, Final report of the OECD workshop on harmonization of validation and acceptance criteria for alternative toxicological test methods. ENV/MC/CHEM/TG(96)9