

- human serum albumin: A simple in vitro methods for screening potential photoallergens. *Toxicol. Lett.* 24, 1-6
- 26) Lovell, W.W. (1993) A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicol. in Vitro*, 7, 95-102
- 27) 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.
- 28) Lovell, W.W. and D. J. (1990) Sanderd Screening test for phototoxins using solutions of simple biochemicals *Toxicol. in Vitro*, 4, 318-320
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) Pape, W.J.W., M. Brandt and U. Pfannenbecker (1994a) Combined in vitro assay for photohaemolysis and haemoglobin oxidation as part of a phototoxicity test system assessed with various phototoxic substances. *Toxicol. in Vitro*, 8, 755-757
- 32) Sugiyama M., H. Itagaki and S. Kato (1994b) Photohemolysis test and Yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of chemicals. In : A. Rougier, A.M. Goldberg and H. Maibach (Eds), *Alternative Methods in Toxicology vol.10, In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization*, Mary Ann Liebert, New York, pp. 213-221
- 33) Lovell WW, Jones PA. (2000) Evaluation of mechanistic in vitro tests for the discrimination of photoallergic and photoirritant potential. *Altern. Lab Anim.* 28(5) 707-724.

4-4) 考慮すべき事項

担当：今井弘一・板垣 宏

4-4-1) 試験法の普及性

In Vitro の光毒性試験として 3T3-NR 法が広く普及するに至る条件として、試験法の簡便性や実験方法自体がフレキシブルで、試験担当者による若干の修正に対しても十分な頑健性があることが必要である。しかも、実験プロトコール全体に技術的な難易度が低く、試験担当者の教育訓練及び専門性についても、背景となる細胞培養の基礎的知識の個人差が結果に影響を及ぼすことが少なく、短時間の教育訓練で実施可能である点が重要である。また、一方で必要な装置や材料の入手も比較的容易であり、一般に普及している安価な器材で実施可能であることも広く普及に至る鍵を握る大きな因子となり得ると考えられる。

4-4-1-1) 若干の修正に対する頑健性

3T3-NR 法で実験条件を変更する場合には以下の各項目が想定できる。実験時はプロトコールに忠実に従うべきであるが、通常プロトコールに記載されないピペットの取扱い方や培養液の加温方法など、テクニカル面で若干の個人差があり、担当者が気付かないで細胞に多少のダメージを与えてしまう場合も考えられる。

(1) 細胞

Balb/c 3T3 細胞はマウス由来の株細胞である。細胞因子として、a. 播種細胞数、b. 継代数・継代方法、c. 細胞周期が考えられる。3T3-NR 法では、この細胞の利用が最も基本的な条件の1つである。同じ Balb/c 3T3 細胞でも、各研究室あるいは継代歴の差によって、その性質や特徴にかなりの違いがあり注意を要することも指摘されている¹⁾。Balb/c 3T3 細胞以外の細胞や亜株である 3T3-E₁ 細胞や NIH 3T3 細胞などの利用は始めから想定外と考えるものである。もし、これらの細胞を使用した場合には、Balb/c 3T3 細胞と細胞周期や栄養要求などが異なっていると考えられるため、当然のことながら結果に影響する可能性があり、光毒性評価法として使用するためには、妥当性が示されていないとまではならない。

a. 播種細胞数

96 ウェルマイクロプレートで1ウェルあたり 1×10^4 個の細胞播種が必要である。播種細胞数の変動は大きく結果に影響すると考えられる^{2,3)}。播種細胞数が極端に多い場合には細胞は恒温器内で早期に confluent に達する。confluent に達した細胞はその感受性に及ぼす影響が異なる可能性が考えられる⁴⁾。細胞が均一にウェル内に播種される必要があり、ウェル内部で部分的に細胞数の変動が大きいと結果に与える影響も考えられる。しかし、血球計算盤での算定誤差程度の播種細胞のバラツキであれば結果に大きな差はないと考えられる。

b. 継代数・継代方法

Spielmann らによる報告⁵⁾から、継代数 70~80 代の細胞を用いた5機関では、光照射量に対してほぼ同じ反応曲線を示したが、130~140 代の細胞を用いた2機関では、低照射量に対して細胞生存率が著しく低下し、細胞の継代数が結果に大きな影響を及ぼすことを指摘している。また、継代方法についても、常時 sub confluent に達するまでに継代している場合とそうでない場合には当然細胞自体に差が生じる可能性が考えられる。

c. 細胞周期

細胞増殖期の細胞を用いることが規定されているが、前述のように接触抑制がかかって細胞が D₀ 期に移行しないようにすべきであるが、継代されている細胞株は増殖調節に関してはす

でに正常でないとの指摘もあり、細胞密度や実験に用いる細胞の取扱いについては、普段の継代方法を含めて十分な注意が必要であると考えられる。なお、細胞周期が光毒性に影響を及ぼすことはすでに指摘されている⁶⁾。

(2) 培養液

細胞培養における培養液の変更は大きな因子となる。培養液はその基盤となる浸透圧の調整はもちろんのこと、pH の緩衝作用や細胞に必要な無機イオンの供給源となる様々な緩衝塩類溶液が使用される。Earle, Gey, Hanks, Dulbecco などが利用されるが、培養液のメーカーやロットによってその成分が若干改変されているものも多い。さらに、ビタミン類、糖類やアミノ酸の添加量や種類が必ずしも一定していない。とくにアミノ酸の中でもグルタミンは熱に弱く培養液の保存状態による変動も大きいと考えられる。さらに、培養液の pH は炭酸ガス恒温器からの CO₂ 量に依存するため、炭酸ガス恒温器の種類や扉の開閉による影響などによる結果への影響も否定できない。3T3-NR 法では DMEM の使用が記載されているが、DMEM は培地メーカーによってその組成に多少の差があるものの MEM と比較してほとんどのアミノ酸などが倍量程度配合されている。そのため、細胞に与える影響も無視できない。しかし、MEM を用いても結果が逆転するような大きな影響はないものと考えられる。もちろん他種の培養液の転用は実験データに様々な影響を及ぼすことは周知の事実である。実験者はガイドライン記載の DMEM での結果と相関することが証明されない限り、これらの使用は避ける必要がある。さらに、細胞の取扱い方法として基本的なことであるが、通常の植継ぎ用の培養液と実験に使用する培養液が全く異なる場合には細胞に与える影響は大きいものと考えられる。また、細胞を凍結状態から通常の培養環境下に戻した場合に、時間的制約から細胞のコンディションを無視して直ちに実験に使用することはデータに大きく影響することは言うまでもない。さらに、血清については培養液の中でも最大の変動因子となりうる可能性がある。従来から血清の添加量、メーカーやロット差が細胞毒性の結果に影響を及ぼすことが知られている。また、血清タンパクが光毒性に影響を及ぼすことも報告⁶⁾され、その重要性は大きい。

細胞の種類によって栄養要求の程度や pH 変動に対する許容度が異なり、培養液の変動による影響も異なる。株化細胞である Balb/c 3T3 は初代細胞よりその影響は一般的に少ないものと考えられる。

(3) 試料調製法

被験物質を細胞に暴露するためには培養液に溶解することが条件となる。水溶性の被験物質では問題は少ないが、油溶性のものでは、一端溶媒を用いて溶解し、さらに培養液で希釈する方法が一般的である。しかし、難溶性または不溶性の試料では溶媒の種類や濃度によっては完全な溶解に至らず、培養液中でエマルジョン状態を呈する場合には IC₅₀ 値のバラツキの原因と

なることが考えられる。そのため、エタノールや DMSO などの他に少量の界面活性剤の添加も試みられている。これらはいずれもその細胞毒性が被検体の細胞毒性データに多少の影響があると考えるのは当然である。そのため溶媒の最終濃度は規定されている。しかし、溶媒によってはその純度やメーカーによって細胞毒性レベルが微妙に異なる。被験物質の溶解性や溶媒の種類は大きな変動因子となるため、溶解されたか否かは実験者の肉眼での判定によっている。しかし、血清が添加されている培養液はすでに多少の濁りがあるのは普通であり、試料添加による懸濁と区別することが實際上判定し難い場合も多い。さらに、恒温器内で気化する可能性のある試料、比重が培養液と著しく異なる試料、プラスチックディッシュ自体を溶解する試料、ディッシュ内面のコーティングに短時間で影響を与える試料、培養液の成分と徐々に化学反応して時間と共に沈殿する試料、pH が大きく異なる試料や強い着色のある試料などの場合については難しい対応となる。試験担当者が溶媒のメーカーやその純度に対する認識はもちろんのこと、試料を培養液へ溶解する行為に関しては十分な知識と経験を積むことが重要である。

(4) 照射光源

照射光源として Dr Honle 社製の機器が使用されている。光源には太陽光に近いスペクトル分布をもつ水銀蒸着メタルハライドランプなどを使用し、さらにフィルターで UVB を遮断する必要がある。また、実際の光の状態は補正済みの UVA メーターで検査することも必要である。Dr Honle 社は UV ランプとその関係機器では歴史的にも著名なメーカーで、フランス、米国、ドイツ、英国、シンガポールなどに関連会社を設立している。本邦には代理店が存在するのみであり、光源に関する基礎データの入手、検査やメンテナンスの容易性などの点から国内メーカー製のものを使用した方が便利な点が多い。しかし、Dr Honle 社と国内メーカーの製品差についての基本的な情報、すなわち光源の安定性、波長分布や発熱などの様々な変動因子についての諸データについてはまったく未知数である。さらに、Dr Honle 社の製品についても改良などによって製品の種類や性能が時間とともに変化することが想定できる。光源の条件となる $1.6\text{mW}/\text{cm}^2$ の変動については、UVA の光源の強さや波長に影響を及ぼすランプの劣化や電源などの不良による電圧の変動などが考えられる。光源の強さなど、様々な因子の変動は、実際の実験データに大きな影響を及ぼすことも否定できない。また、同時に光源によっては、細胞、培養液や培養容器への熱障害^{7,8)}にも十分な注意を払う必要があると考えられる。なお、光源については使用機器やランプの種類が報告によって大きな差がある。また、環境光の影響も考えられるが、それらの詳細についての実験結果に及ぼす影響に関する報告は見当たらない。なお、光照射時間が多少変動することについての影響については、数分程度ではスクリーニング試験としては十分対応可能であると考えられる。

(5) 培養時間

24 時間の培養時間の変動については、被験物質の種類によっては、その洗浄後に新鮮培養液中で培養する時間が長いほど、細胞への障害が増大する場合と、逆に減少する場合があるが、時間経過に伴ってその傾向は大きくなる⁹⁾。したがって、その程度が問題であり、スクリーニングテストとして実験を実施する時に、恒温器から細胞を取り出す場合に数分あるいは数十分程度の時間誤差範囲であれば、特に問題とならない可能性が大きい。数時間に及ぶ時間差は結果への影響も無視できない可能性もある。

(6) 評価基準

OECD のガイドラインドラフト (2002 年 3 月 15 日) では、 $PIF > 5$ あるいは $MPE > 0.15$ を phototoxicity として定義している。この値は相対値として位置づけられており、絶対的評価基準ではない。境界の被験体の場合に probable phototoxicity あるいは phototoxicity のどちらに分類するかという点については難しい選択となる。実験データの n 数、すなわち繰り返し回数などによっては変動する可能性も考えられ、結果的には異なった評価が与えられる場合の可能性を否定できない。

(7) エンドポイント

赤色素であるニュートラルレッド(NR)が生細胞に取り込まれ、リソゾームに蓄積される性質を利用した NR 法はその簡便性や再現性の点から数多く利用されている。試験担当者が別のエンドポイントを便宜上採用する可能性も考えられるが、それぞれ細胞内での作用場所や機序が異なるものの実験結果に大きな差が見いだせない可能性もある。しかし、エンドポイントの変更については 3T3-NR 法との相関性や被験物質の光毒性評価に適していることを試験担当者が確認しておく必要がある。

4-4-1-2) 教育訓練及び専門性

細胞培養を実施するための、教育訓練と専門性については、まず、細胞の取扱い方法についての基本的知識が必要である。また、培養細胞自体に対する知識や培養液はもちろんのこと、継代培養、細胞増殖や凍結法などさまざまな知識が必要である。また、細胞培養に使用する器材の面から、ピペット、培養フラスコや遠沈管などのディスプレイ製品について、また、使用する機器についても若干の知識が必要である。使用する設備機器が、無菌設備、恒温器設備、器具洗浄設備、細胞観察・測定設備、細胞保存設備に至るまで多種類に及ぶ上に、それぞれの利用方法についての知識と専門性が必要である。とくに無菌操作については訓練も必要で、さらに安全面についての認識、廃棄物の取扱いについての認識も重要である。

さらに、光毒性試験を実施する必要から、上記の基本的知識を踏まえた上で、光照射装置の取扱いに関して、および 96 ウェルプレートやマルチピペットの取扱いなどに関する専門的知

識と経験が必要である。他方、前述の試料調整法に関しては、被検体についての知識やその溶解方法に関しては専門的知識と経験が必要となる。

4-4-1-3) 必要な装置や材料の入手

細胞培養に必要な器材の入手は比較的容易である。細胞は細胞バンクから容易に手に入れることが可能である。また、各種ディスプレイ製品についても特に入手が難しいものは見当たらない。太陽光に近いスペクトルを有している安定した光源の光照射装置については、水銀蒸着メタルハライドランプやキセノンランプが使用される。現在、この装置の入手が最も難しいと考えられる。

4-4-2) コストとそれに見合う有用性

一般的に培養細胞を使用する *in vitro* 試験法は実験動物を使用する *in vivo* の場合と比較して、実験に必要なコストは非常に低く経済面での有用性が大きい。実験動物でウサギは1匹2万円、モルモットは同じく4千円前後、比較的安価なマウスで1匹数百円程度である。しかし、餌や床敷が必要なことはもちろん、数多くの動物の飼育には衛生面や環境面でも十分配慮する必要があり、その設備面や汚物処理などに多大なコストが必要である。*In vitro* 試験法では動物実験と比べて、実験に必要な時間は短縮され、同一の時間で繰返し実験することが可能であり、実験例数の増加とともに統計的にも信頼性の高いものとなる可能性が大きい。さらに、動物を使用するという別次元でのリスクは金銭的には全く解決できない大きな問題であることは言うまでもない。

4-4-3) 試験法導入に要する時間

試験法導入に必要な時間として、一般的に設備の設置に要する時間、器材購入に要する時間および、試験担当者の教育訓練に必要な時間が考えられる。設備の設置に要する時間と器材購入に要する時間は、購入先にもよるが、入手までには数日から数週間程度であると考えられる。ただし、光源設備を導入する場合に海外から輸入せざるを得ない場合には数ヶ月を要する場合も考えられる。一方、試験担当者の教育訓練に必要な時間については、細胞の継代練習を数回繰り返す場合を考慮すれば数ヶ月が必要となる。

4-4-4) 3Rsの面からの考察

動物実験代替法の見地から *in vitro* プロトコルを考えた場合に、3Rs¹⁰⁾ すなわち、Replacement, Refinement および Reduction に対しての有用性が認識される必要があると考えられる。

4-4-4-1) Replacement

本方法が EU/COLIPA でのバリディーションプロジェクトで光毒性物質と非光毒性物質を正しく検出可能であることが示されており、*in vitro* で光毒性物質を高い再現性で的確に見つけ出し、かつ光毒性物質の毒性機序についての解析ができる可能性が大きく、動物実験の代替に寄与するものと考えられる。動物実験については多くの研究者が始めは心理的にも躊躇する。しかし、時間の経過とともに多くの動物を取り扱うにつれて、いわゆる慣れによって動物を犠牲にすることによる心理的負担が低下する傾向が見受けられることも多い。*in vitro* 試験ではこのような点は全く発生しない。

4-4-4-2) Refinement

動物の痛みや苦痛および不快感を弱めたり最少限にし、動物の福祉を向上させるものであるが、3T3-NR 法の普及に伴って動物実験をする必要がなくなった場合には、この項目については完全に達成可能であると考えられる。

4-4-4-3) Reduction

現在、年に1万種以上の新しい化学物質が合成されており、化学構造から光毒性を有する可能性のある化学物質も多数開発されつつある。そのため、光毒性試験に供されるべき被検物質の数も非常に多いと想像される。しかし、これらのすべてを動物実験で評価することは不可能である。そのため、*in vitro* 試験法による信頼性の高いスクリーニング法が開発されることは使用動物数の削減に繋がるものと考えられる。

4-4-5) 結論

動物実験の縮小は世界の流れであり、*in vitro* 実験方法の発達によって動物実験が不可欠な研究分野を可及的に狭めることが必要である。しかも *in vitro* の代替法の採用により、化学物質の安全性を能率良く、経済的に推進できるようになることは、危険な化学物質暴露によるリスクを減少させることにつながり、我々の QOL 向上のためにはたす役割りも大きい。今回検討した 3T3-NR 法は、動物実験代替法の側面以外にも、時間的、経済的な面から有利な点も多く、本実験方法がリスクとベネフィットのトータルバランスの点からも優れたものであると考えられる。

4-4-6) 要望事項

光毒性試験は化粧品のみならず、医薬品や医薬部外品、また、一般化学物質の安全性評価に必要である。また、局所作用のみならず全身的作用、複合作用や代謝による影響などについても十分配慮する必要性も大きい。そのための諸因子を含めた幅広い *in vitro* 実験方法の開発に

ついて要望するものである。

今回の光毒性試験の導入で大きな問題は光源である。どのような光源が妥当であるかについてはさらに検討を加えなければならない。光毒性試験を普及させるためには、色々なメーカーの光源についてデータを蓄積する必要がある。

参考文献

- 1) 瀬野悍二, 小山秀機, 黒木登志夫編. (1993)研究テーマ別動物培養細胞マニュアル, 初版, pp.76-77, 共立出版, 東京, 76-77.
- 2) Wataha, J.C., Hanks, C.T., and Craig, R.G. (1993) The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal ions which are released from dental alloys, *Dent Mater*, **9**, 172-176.
- 3) Wieslander, A.P., Nordin, M.K., Hansson, B., Baldetorp, B. and Kjellstrand, P.T. (1993) *In vitro* toxicity of biomaterials determined with cell density, total protein, cell cycle distribution and adenine nucleotides, *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, **21**, 63-70.
- 4) Grosovsky, A.J. and Little, J.B. (1985) Confluent holding leads to a transient enhancement in mutagenesis in UV-light-irradiated xeroderma pigmentosum, Gardner's syndrome and normal human diploid fibroblasts, *Mutat Res*, **149**, 147-155.
- 5) Spielmann, H., Liebsch, M., Pape, W.J., Balls, M., Dupuis, J., Klecak, G., Lovell, W.W., Maurer, T., De Silva, O. and Steiling, W. (1995) EEC/COLIPA *in vitro* photoirritancy program: results of the first stage of validation, *Curr Probl Dermatol*, **23**, 256-264.
- 6) Yang, X.L., Fan, C.H. and Zhu, H.S. (2002) Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C(60)] fullerene derivatives and its mechanism, *Toxicol In Vitro*, **16**, 41-46.
- 7) Sheyhedin, I., Aizawa, K., Araake, M., Kumasaka, H., Okunaka, T. and Kato, H. (1998) The effects of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) *in vitro*, *Photochem Photobiol*, **68**, 110-114.
- 8) van den Biesen, P.R., Berenschot, T., Verdaasdonk, R.M., van Weelden, H. and van Norren, D. (2000) Endoillumination during vitrectomy and phototoxicity thresholds, *Br J Ophthalmol*, **84**, 1372-1375.
- 9) Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Bates, T.E., Dinotta, F., Micali, G. and Giuffrida Stella, A.M. (2001) Induction of heat shock protein synthesis in human skin fibroblasts in response to oxidative stress: regulation by a natural antioxidant from rosemary extract, *Int J Tissue React*, **23**, 51-58.
- 10) 松本良造, 今井弘一 (1993) 細胞回復度試験法の確立に関する基礎的検討 - 初期細胞数と細胞回復時間について -, 歯科材料・器械, **12**, 374-392.
- 11) Russell, W.H.S. and Burch, R.L.(1959) The principles of human experimental technique, Methen, London.

4-5) 関連項目

担当：板垣 宏、小島肇夫

4-5-1) EU/COLIPA 及び OECD により提案された試験プロトコールの一部変更について

本試験法(3T3 NRU 法)は、1992-1994 に実施された EU/COLIPA (欧州化粧品工業連合会) によるプレバリデーション (Phase I) に端を発する。このプレバリデーションでは、光毒性のスクリーニングを目的とした 8 種の試験法と作用機構の解析を目的とした 5 種の試験法について検討され¹⁾、その結果として本 3T3 NRU 法が選択され、それ以降のバリデーションが進行した理由となっている。しかし、このプレバリデーションでは、被験物質がブラインド化されずに試験機関に配布された。また、各試験法について何施設が参加し、3T3 NRU 法以外の試験法については個別にどのような結果が得られたかが不明である^{2, 3)}。その後、1994-1996 に実施されたバリデーション (Phase II)⁴⁾ 及び 1997-1998 に実施された紫外線吸収剤(Phase III)⁵⁾ の評価を通して本 3T3 NRU 法の有用性が確認されてきたという経緯を有している。

OECD ガイドラインのドラフトの公開以降で、本 3T3 NRU 法の改良について報告した論文はほとんど見当たらない。よって、本 3T3 NRU 法を構成する要因に分けてこれまでの知見を整理し、この項目に対する回答とする。

2002 年 3 月 15 日付の OECD ガイドライン案では、本 3T3 NRU 法は、Balb/c 3T3, clone 31 に被験物質を適用し、さらにソーラーシミュレーターによる照射後、ニュートラルレッド取り込み試験により細胞生存率を求める。また、光毒性のポテンシャルの評価は、Photo-Irritation Factor (PIF) または Mean Photo Effect (MPE) のいずれかの方法によることが記載されている。つまり、考えられる修正項目としては、上記の測定指標の他、用いる細胞種に関すること、光照射に関すること、及び評価方法に関することが挙げられる。以下に、現在提案されている OECD ガイドラインのドラフトを基本的に準拠し、これの変更点について記載した文献の結果を紹介する。

4-5-1-1) 細胞毒性評価指標の変更について

上記の試験法開発の経緯に示したように、光毒性試験代替法については、本 3T3 NRU 法に絞って光毒性の予測に適しているかという観点でバリデーションが進行してきた。そのため、細胞毒性の指標としてはニュートラルレッド取り込み法以外の細胞毒性指標に対する優位性や測定指標の変更の可否については全く議論がなされていない。ただ、光照射の無い系に関しては、Draize 眼刺激性試験代替法を検討した厚生科学研究班で、ニュートラルレッド取り込み試験、MTT 試験及びクリスタルバイオレット取り込み試験で測定指標による差は認められないことを報告しているが⁶⁾、光照射下では全く未検討である。

よって、本項目については、必要に応じて独自のバリデーションを設定する必要がある。

4-5-1-2) 細胞種の変更に関して

OECD ガイドラインのドラフトではパラグラフ 9 に『バリデーション study で使用された ATCC や ECACC より供給される Balb/c 3T3, clone 31 を推奨すること、他の細胞でも本プロトコールを用いれば問題のない可能性があること、及び細胞により特殊な培養条件を使用する場合は同等性の実証が必要であること』が記載されている。

本ガイドラインのドラフトに記載された方法に準拠し、細胞種差を検討した論文には、ヒト角化細胞やヒト皮膚線維芽細胞との比較を記述したものがある。

Clothier R.等(1999)は4名のボランティアの包皮から採取した初代培養の角化細胞(NHK)を用いて EU/COLIPA の Phase II で検討された被験物質及び紫外線吸収剤の評価で検討された被験物質の計45化合物について検討を行った。その結果、PIF を指標とした場合、Bithionol (3T3 NRU 法(陽性)、NHK NRU 法(陰性))を除き、Balb/c 3T3 細胞と NHK 細胞での光毒性の評価結果は一致しており、また、光毒性の有無の判別に関して4名から得た細胞に donor の特異性は認められなかったことを報告している⁷⁾。

一方、岡本(2001)は、殺菌剤や香料を含む計33化合物の評価では、3T3 NRU 法では陽性と評価されるが、ヒト皮膚線維芽細胞(NG1RGB)では捉えられない化合物が3種(8-Methoxypsoralen、5-Methoxypsoralen、5-Bromo-4'-chlorosalicylanilide)あり、Balb/c 3T3の方が感度の良いことを報告している⁸⁾。

杉山等(1999)は、Balb/c 3T3、NG1RGB、正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)を用いて、計23化合物を評価した結果、これらの細胞には大きな種差が認められず、香料である Phantolide や Galaxolide の光細胞毒性はこれらの細胞種ではいずれも捉えられないことを報告している⁹⁾。なお、これらの香料が3T3 NRU 法では捉えられないことは岡本も報告している⁸⁾。

ただ、光毒性の標的部位は皮膚であること、また皮膚細胞の種類によってはニュートラルレッドを取り込むリソゾーム活性が低い場合が考えられる。よって、これらの皮膚細胞を用いる場合は測定指標の妥当性も考慮し、必要に応じて独自のバリデーションを実施する必要がある。

4-5-1-3) 光照射に関すること

OECD ガイドラインのドラフトではパラグラフ21~24に『照射条件』が詳細に記載されている。基本的にはUVBをカットするフィルターを付けたソーラーシミュレーターにより5 J/cm²(UVA)照射すると記載されている。

EU/COLIPA のバリデーションでは、米国から参加した1研究機関を除き、照射装置は SOL500 (ドイツの Dr Honle 社製)、フィルターは H1 (Dr Honle 社製)、紫外線測定装置 (UVA-meter) は Type No.37 (Dr Honle 社製) とすべて同じであった。なお、米国から参加した研究施設も照射装置のみ Dr Honle 社製の SOL3 でその他は全く一緒であった。さらに EU/COLIPA のバリデーションでは照射装置の違いによる影響を検討していないので、この点に関しては議論できない。

照射装置等の条件が EU/COLIPA と最も異なるのは岡本等の報告である^{8)、10)}。岡本等は、Bio-Solar simulator WXS-50C-5UV(Wacom 社製、キセノンランプ)を使用し、8.3 mW/cm² で10分間照射することにより照射量を5 J/cm²としている。一方、EU/COLIPA では1.7 mW/cm² で50分間照射することにより照射量5 J/cm²としているため、照射量が同じ5 J/cm²でも、照射強度と反応時間が異なるので同一レベルとしての比較には注意を要する。以上の点から、EU/COLIPA のバリデーションでは、その装置を含め非常にコントロールされた照射条件であることが判明した。そのため、Dr Honle 社製の機器を使用しない場合は、その妥当性を検証する必要がある。また、照射量5 J/cm²とした場合についても、照射強度を1.7 mW/cm²から変更する場合は、照射強度と反応時間の影響を検討しておく必要がある。

4-5-1-4) 光毒性の有無を判定するためのパラメーターとカットオフ値について

評価に関する項目に関して、2002年3月15日付のOECDガイドライン案とそれ以前のドラフトを比較して以下に記す。表から明らかなように、大きな変更点は投与すべき最高濃度、IC50が求められなかった場合の処置、光毒性評価における境界領域及びMPEの基準である。

Table 4-21.

| 作成年月日 | 2002年3月15日 | 2000年2月 | |
|-------------------------------------|---|---|----------------------------|
| 投与すべき最高濃度 | 1000 µg/mL以下 | 100 µg/mL以下 | |
| IC50が求められなかった場合の対応 | PIFを算出しない | 求められた場合は以下の基準を適用 | 投与した最高濃度Cmaxを使用する |
| 光毒性無し (no phototoxicity) | PIF<2 MPE<0.1 | PIF<5 | Cmax(-UV) = 1 Cmax(-UV) |
| 光毒性の可能性 (probable phototoxicity) | 2<PIF<5 0.1<MPE<0.15 | 記述なし | |
| 光毒性有り (phototoxicity) | PIF>5 MPE>0.15 | PIF≥5 | Cmax(-UV) ≥5 IC50(+UV) |
| 最高濃度のみで陽性結果が得られた場合 | 光毒性の評価には、被験物質の皮膚への浸透性、吸収・蓄積性、あるいは他の試験結果等による更なる考察が必要 | | |
| 照射系及び非照射系で毒性が認められず、溶解性に制限があった場合 | 溶解性のため試験可能な濃度が制限されている場合、本試験法における被験物質の適合性に疑問があり、確認試験の実施を考慮すべきである | 水に対する溶解性が100 µg/mL以下の物質では、本試験法における被験物質の適合性に疑問があり、確認試験の実施を考慮すべきである | |

なお、1994-1996に実施されたバリデーション (Phase II)⁴⁾及び1997-1998に実施された紫外線吸収剤(Phase III)⁵⁾の評価では、投与すべき最高濃度を含め、光毒性の評価に関しては、2001年11月以前のドラフトの基準により実施されている。そのため、2001年11月16日付のOECDガイドライン案との整合性については、生データから再度検討する必要がある。

4-5-2) ワークショップとバリデーションの必要性とその内容

4-5-2-1) 概要

ECVAMの光毒性に関するワークショップは、過去2回開催されている。第1回ワークショップは1993年12月13日~17日にAngera (Italy)で開催され、その主題は、動物実験代替法として行政に受け入れられることを目的として、EU/COLIPAのプレバリデーションの結果を踏まえて当時報告されていた光増感作用を予測する*in vivo*及び*in vitro*試験の評価であった¹⁾。なお、当時は光化学反応に基づき、光毒性と光アレルギー性の両者を含め光増感作用としていた。このワークショップにおいて、3T3 NRU法の妥当性が評価され、その結果バリデーション (Phase II)が進行し、さらには紫外線吸収剤(Phase III)の評価に発展していったものと考え

られる。

第2回は1999年6月22日～27日にBerlin (Germany)で開催され、その主題は、*in vivo* 及び *in vitro* 光毒性試験に関する現状のとりまとめであった¹¹⁾。個別の検討項目としては、用語の整理、光増感物質の作用機構、光毒性、光パッチ試験、光アレルギー性及び光遺伝毒性・光発がん性であった。

一方、ICCVAMは1999年4月28日にPhototoxicity Working Group (PWG)を設置し、OECD ガイドライン案をreviewするとともに、3T3 NRU法のpeer reviewに必要な情報の入手を行っている模様である。

4-5-2-2) 試験条件の最適化

『1. EU/COLIPA 及び OECD により提案された試験プロトコールの一部変更について』に記述したように、OECD ガイドラインのドラフトの公開以降で、本 3T3 NRU 法の改良について報告した論文はほとんど見当たらない。よって、本 3T3 NRU 法に関しては、試験条件の最適化の検討は不可能である。

4-5-2-3) 他の試験法における活用

EU では、本 3T3 NR 法を光化学反応に基づき光増感作用を持つ化合物を捉える試験系と位置付け、光アレルギー性（光感作性）や光変異原性・光発がん性の第一次スクリーニングとして活用するという考え方がある^{11, 12)}。確かに本 3T3 NRU 法は、光増感作用を持つ物質を細胞の生死（ニュートラルレッドの取り込み）で捉える試験法であるが、この試験法で陰性の場合には、光アレルギー性や光変異原性・光発がん性の評価には進まないという考え方には反論もある。すなわち、一般に代替法は一つ以上の毒性発現機構に基づき被験物質を評価するものであり、この試験法で陽性のものはその機構により毒性を発現しているということである。また、変異原性物質の多くは急性の細胞毒性を起こさない量で遺伝子に影響を与えるものである。それ故、本 3T3 NR 法で陰性だからといって、光増感作用がないので光アレルギー性や光変異原性・光発がん性の評価には進まないという考え方には容易に同意できない。

4-5-3) 関連項目に関する要約

4-5-3-1) 将来検討すべき項目

EU/COLIPA のバリデーションは、細胞や光照射装置を含め非常にコントロールされた試験条件で実施されてきたため、OECD により作成された 3T3 NR 法のガイドライン案はそれらについても詳細に記述されている。そのため、上記バリデーションで用いられた Balb/c 3T3 (clone 31) や Dr Honle 社製の機器以外を使用する場合は、その妥当性を独自に検証する必要がある。

一方、*in vivo* において光刺激性発現の場は皮膚であることを考慮すると、皮膚細胞の活用や測定指標（ニュートラルレッドの取り込み）の見直しについては将来検討すべき項目と考える。

また、OECD ガイドラインのドラフトではパラグラフ 57 に『光源のスペクトル特性、フィルターの放射・吸収特性、紫外線測定装置の特性とその補正』が記載されている。バリデーションで使用された Dr Honle 社製の照射機器等を使用する場合、日本の代理店ではこれらの項

目に関して対応不可能なためドイツの Dr Honle 社に問い合わせるかまたは検定のため定期的に送付する必要がある。日本においてもこれらの課題を満足する照射光源や紫外線測定装置の開発や提供が望まれる。

さらに、評価パラメーターである PIF や MPE の cut-off 値については、「4-5-1) EU/COLIPA 及び OECD により提案された試験プロトコールの一部変更について」の項に記述したように変更されているが、実際にはバリデーションが実施されていない。これについては今後のデータの蓄積により再検討が必要となるかも知れない。

最後に、本 3T3 NRU 法のガイドライン案において採り上げられていない代謝活性化の検討については、検出感度向上の観点から将来検討すべき項目と考えられる。

4-5-3-2) 将来要望される Workshop

第一に、上記の「4-5-3-1) 将来検討すべき項目」に関しては、もしこれらの検討が成された場合、Workshop の開催は是非とも必要である。

第二に、過去に光刺激性を示した物質として、fluoroquinolone 系の抗生物質や殺菌剤等の薬剤の他、bergapten (bergamot oil 中の香料成分)等の香料が挙げられる。しかし、本 3T3 NRU 法が香料に対して感度が低いことは、杉山や岡本も指摘している^{8, 9)}。これは、香料成分が油性であるため、水系の培養細胞を用いる試験では正確に評価できないためかもしれない。こうした香料の光刺激性は、臨床でも確認されていることから、香料や油性の化合物の光刺激性を正確に評価する新たな *in vitro* 試験法の開発は是非とも必要であると考えられる。

第三に、光刺激性の考え方についてであるが、光感作性(光アレルギー性)や光変異原性・光発がん性に比較し、光刺激性は生体に対して重篤な傷害は少ないと考えられる。すなわち、光刺激性のポテンシャルを有する化合物であっても、製品への配合濃度が低ければ、生体に対する危険度は少ないと考えられる。今後、本 3T3 NRU 法によって光刺激性のポテンシャルを有する新規化合物をどこまで配合可能かを検討する試験法の研究が必要となると考えられる。この観点については、難溶性物質や製品を評価可能な 3次元皮膚モデルや他の *in vitro* 試験との battery が考えられるが、Workshop の開催を含め今後の研究の進展を期待したい。

第四に、3T3 NRU 法の行政面における有用性についてであるが、本試験法は化学物質が光毒性ポテンシャルがあるかどうかを判定する hazard identification として位置付けられるため、実際の皮膚反応に対する用量依存性やリスクアセスメントでの使用は困難である。3T3 NRU 法を行政的に使用するのであれば、化学物質単体の光毒性ポテンシャルの把握に用い、最終製品がヒトに使用されるものであれば、製品形態での実使用試験で確認することが望まれる。

最後に、市場にある製品の光毒性を見出すことができるのは医師である。ECVAM ではワークショップ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¹¹⁾。日本においても、医師と研究者が試験法やその結果について自由に討議できる場(ワークショップ)が必要と考える。このことが、試験法の改良を経て安全性の向上につながると期待できるからである。

参考文献

- 1) Spielmann H., et al., *In vitro* phototoxicity testing. ATLA, 22, 314-348 (1994).
- 2) Spielmann H., et al., EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: first

- results obtained with Balb/3T3 cell phototoxicity assay. *Toxicol. in vitro*, 8, 793-796 (1994).
- 3) Liebsch M., et al., In Alternative Methods in Toxicology Vol.10. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Edited by A. Rougier, et al. pp.243-254 (1994). Mary Ann Liebert. New York.
 - 4) Spielmann H., et al., The International EU/COLIPA in Vitro phototoxicity Validation Study: results of phase II (Blind trial). Part1: The 3T3 NRU phototoxicity Test. *Toxicol. in vitro*, 12, 305-327 (1998).
 - 5) Spielmann H., et al., A study on filter chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the In Vitro 3T3 phototoxicity Test. *ATLA*, 26, 679-708 (1998).
 - 6) Ohno Y., et al., Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. 1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicol. in vitro*, 13, 73-98 (1999).
 - 7) Clothier R., et al., The use of human keratinocytes in the EU/COLIPA international in vitro phototoxicity test validation study and the ECVAM/COLIPA study on UV filter chemicals. *ATLA*, 27, 247-259 (1999).
 - 8) 岡本裕子, 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 (2001).
 - 9) 杉山真理子 他, 光毒性試験における細胞種差の検討. *日本動物実験代替法学会第13回大会要旨集*, pp.97-98 (1999).
 - 10) Okamoto Y. et al., *ATLA*, 27, 639-664 (1999).
 - 11) Spielmann H., et al., The second ECVAM workshop on phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 42. *Altern Lab Anim.* 28, 777-814. *ATLA*, 28, 777-814 (2000).
 - 12) Spielmann H., Acute phototoxicity testing. *環境変異原研究*, 23, 53-64 (2001).

Table 4-14 その他の細胞を用いた試験法

| No. | 著者 | 課題 | 細胞 | 光源 | 評価方法 | chemicals | 要約 | 掲載誌 |
|-----|---|---|--------------------------------|-------------------|--|---------------------------------------|--|--|
| 13 | Daniels, F., J. | A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. | Organism (candida albicans) | UVA (black light) | 阻止ゾーン | furocoumarine, coal tar, | 試験法は、感度が高くfurocoumarine系の光毒性を検出できた。 | J. Invest. Dermatol., 44, 259-263 (1965) |
| 14 | Misra RB, Joshi PC. | Phototoxicity evaluation—Tetrahymena thermophila as an alternative model. | tetrahymena thermophila (原生動物) | UVA, B, C | DNA damage, oxidative stress sunlight, glutathione estimatione(GSH), glutathione-S-transferase(GST) activity | 46chemicals | tetrahymena thermophila (原生動物) の利用は光毒性物質の検出のほか、環境へのUVBの影響の評価やDNA損傷や酸化ストレスの評価系としても有用。 | Indian J Exp Biol. 1999 Aug;37(8):750-7. Review. |
| 15 | Ojala T, Vuorela P, Kiviranta J, Vuorela H, Hiltunen R. | A bioassay using Artemia salina for detecting phototoxicity of plant coumarins. | Artemia salina (brine shrimp) | UVA(366nm) | 生存数のカウント | psoralen, xanthotoxin, bergapten etc. | 簡便で安価な大規模な光毒性スクリーニング法として有用。70%以上のみでなく他の化学物質にも適用できる。 | Planta Med. 1999 Dec;65(8):715-8. |

Table 4-15 培養皮膚モデルを用いた試験法

| No. | 著者 | 課題 | 細胞 | 光源 | 評価方法 | chemicals | 要約 | 掲載誌 |
|-----|---|--|---|----------------------------|-----------------------------------|-------------|---|---|
| 16 | Augustin C, Collobel C, Damour O. | Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro. | DE(normal human fibroblastsの3T3-インゲンガル培養株) SE(Demodex human keratinocytesを挿入した) | UVA(O-50J/cm2:最悪なのは3J/cm2) | MTTassay, IL-1alpha release assay | 5chemicals | 2の行いで1) UVAの影響, 2) in vivo との対応性を比較した。UVAへの耐性はSEmodelの方が高い。In vivoとの対応性は良好であった。 | Photodermatol Photodermatol Photomed. 1997 Feb-Apr;13(1-2):27-36. |
| 17 | Edwards S.M., T.A. Donnelly, R.M. Sayra and L.A. Rheins | Quantitative in vitro assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin TM . | skin2(フィロパグに培養) | UVA: 2.9J/cm2 | MTTassay | 20chemicals | COLIPAのtask forceで使用したもの。In vitro とin vivoの結果の相関は良好。 | Photodermatol. Photodermatol. Photomed., 10, 111-117 (1994) |

Table 4-16 生体膜損傷を指標とした試験法 (photohaemolysis)

| No. | 著者 | 課題 | 細胞 | 光源 | 評価方法 | chemicals | 要約 | 参考文献 |
|-----|---|--|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---|---|--|
| 18 | Kahn G, Fleischaker B. | Evaluation of phototoxicity of salicylanilides and similar compounds by photohaemolysis. | human red blood cells | UVA and UVB.(290-370 or 320-400) | photohaemolysis | anthracene,bithionol, griseofulvin, hexachlorophene, protoporphyrin, psoralen,tertacycline etc. | カリン、ナリカリン等はnegative. anthracene,bithionol等はpositive. | J Invest Dermatol. 1971 Feb;56(2):91-7. No abstract available. |
| 19 | Hetherington, A.H. and B.E. Johnson | Photohemolysis. | human red blood cells | UVA and UVB, | photohaemolysis, Drabkin solution | plant extracts | psoralen等のDNA損との光毒性は評価できないが膜損傷によるものは検出できる。試験法の記述が主体。 | Photodermatology, 1, 255-260 (1984) |
| 20 | Pape W.J, Maurer T, Pfannenbecker U, Steiling W. | The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation program on phototoxicity (phase II). | human red blood cells | UVA | photohaemolysis, PHF | 31 chemicals | EU/COLIPAプログラムの3行中の1つ。赤血球とメチレンブルー形成の2つのエンドポイントを組み合わせた試験法。 | Altern Lab Anim. 2001 Mar-Apr;29(2):145-62. |
| 21 | Sugiyama, M., H. Itagaki, T. Hayashi, N. Murakami and S. Kato | In vitro assay to predict phototoxicity of chemicals: (1) Red blood cell hemolysis assay. | human red blood cells | UVA and UVB.(290-370,320-400) | photohaemolysis | fragrances,UV filters,RB,CPZ,TCC,TBSA (23種) | モルモットの結果との相関を評価。結果の一致性は73% | AATEX, 2, 183-191 (1994a) |
| 22 | Vargas F, Mendez H. | Study of the photochemical and in vitro phototoxicity of chlorthalidone [2-chloro-5-(1-hydroxy-3-oxo-1-isindolyl)benzene sulfonamide]. | human red blood cells | UVB | photohaemolysis | chlorthalidone | chlorthalidoneは、酸存在下で photohaemolysis | Pharmazie. 1999 Dec;54(12):920-2. |
| 23 | Traynor, N.J., B.E. Johnson and N.K. Gibbs | Photohaemolysis assay for drugs phototoxicity complicated by bleaching of released haemoglobin. | human red blood cells | UVA(320-400nm: 19J/CM2) | photohaemolysis, Drabkin solution | NSAIDs (anti-inflammatory drugs) | 溶出したヘモグロビンの測定に対する酸の影響を小さくするため、Drabkin solutionを加えて試験精度を確保した試験法。 | Toxicol. in Vitro, 10, 619-624 (1996) |

Table 4-17 タンパク質に対する作用を指標とした試験法

| No. | 著者 | 標題 | 細胞 | 光源 | 評価方法 | chemicals | 要約 | 掲載誌 |
|-----|-----------------------------------|---|---|-----|----------------------|-------------|---|---|
| 24 | Pendington, R.U. and M.D. Barratt | Molecular basis of photocontact allergy. | HSA (human serum albumin) | UVA | photoprotein binding | 10chemicals | 光感作性物質によるカバゲ結合は、7-メチルカバゲによって生じる。今回の試験中の5種に | Int. J. Cosmet. Sci., 12, 91-103 (1990) |
| 25 | Barratt, M.D. and K.R. Brown | Photochemical binding of photoallergens to human serum albumin: A simple in vitro methods for screening potential photoallergens. | HSA (human serum albumin) | UVA | photoprotein binding | 8chemicals | 光感作性に7-メチルカバゲ法として有用。 | Toxicol. Lett., 24, 1-6 (1985) |
| 26 | Lovell, W.W. | A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential. | serum albumin, gamma-globulin, insulin, | UVA | photoprotein binding | 13chemicals | 光感作性物質は一重項酸素を発生し、7-メチルカバゲを酸化する反応を生じるが、光感作性物質はカバゲ質との結合することが多い。 | Toxicol. in Vitro, 7, 95-102 (1993) |

Table 4-18 その他の化学物質を用いた試験法

| No. | 著者 | 標題 | 細胞 | 光源 | 評価方法 | chemicals | 要約 | 掲載誌 |
|-----|---|---|--|--------------|---|---|---|---|
| 27 | Kawada A, Hatanaka K, Gomi H, Matsuo I. | In vitro phototoxicity of new quinolones: production of active oxygen species and photosensitized lipid peroxidation. | histidine squalene, RNO(p-nitroso-n-n-dimethylamine)TBA(t-hiobarbituric acid)TEP(tetrathoxypropane | UVA: 20J/m2 | histidine のメチル-4位の過酸化による中間体によるRNOの脱色を440nm評価。TBA反応によりsqualeneの脂質過酸化を評価。 | quinolone, naldixic acid | quinoloneの光感作性のメカニズムを解明として活性酸素種の影響について評価した。特に一重項酸素の関与についてsqualeneの過酸化を指標として評価した。 | Photodermatol Photomunol Photomed. 1999 Dec;15(6):226-30. |
| 28 | Lovell, W.W. and D. J. Sanders | Screening test for phototoxins using solutions of simple biochemicals. | histidine, glutathione, tryptophan solution photooxidation | UVA | 基質の光過酸化を測定 | 8-MOP anthracene, rose bengal, TBS etc. | histidineはRS, anthracene, acridineについて反応した。8-MOPは低かった。 | Toxicol. in Vitro, 4, 318-320 (1990) |
| 29 | Yan C, Liao K, Hu Y, Xu Y. | Quantitative in vitro assessment of drug phototoxicity by a chemiluminescence method. | NADH, luminol | UVA(310-400) | NADH存在下でUVAを照射した場合のluminolによる化学発光を測定。 | doxycyclin, pipemidic acid, griseofulvin etc. | 化学発光NADHに薬物を添加しUVA照射し、メチルカバゲを加えて化学発光を測定する。(LVluminescent value) doxycyclin, pipemidic acid, griseofulvinの光感作性が検出できた。Chlorpromazine は検出できなかった。活性酸素とフリーラジカルによるものは検出できる。 | Chin Med J (Engl). 1999 Jun;112(6):501-3. |

Table 4-19 試験法の組み合わせによる評価

| No. | 著者 | 標題 | 細胞 | 光源 | 評価方法 | chemicals | 要約 | 掲載誌 |
|-----|---|---|---|-----------------|--|-------------------------|---|---|
| 30 | Bosca F, Carganico G, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Hernandez D, Mauleon D, Martinez LA, Miranda MA. | Evaluation of ketoprofen (R,S and R/S) phototoxicity by a battery of in vitro assays. | linoleic acid, red blood cells, MRC-5(human fibroblast) | UVA (300-600nm) | photoperoxidation of linoleic acid, photohaemolysis, cytotoxicity of hepatocytes or fibroblasts(LDH release) | ketoprofen | BHT,還元glutathionの添加で溶血・リンレン酸の過酸化は抑制された。 | J Photochem Photobiol B. 1995 Dec;31(3):133-8. No abstract available. |
| 31 | Pape, W.J.W., M. Brandt and U. Pfaffenbecker | Combined in vitro assay for photohaemolysis and haemoglobin oxidation as part of a phototoxicity test system assessed with various phototoxic substances. | red blood cells (calf blood) | UVA and UVB | photohaemolysis and photo oxidation of oxyhaemoglobin | 12chemicals(EU/COLI PA) | piroxicamと8-MOPは反応しなかった。それ以外はどちらかに反応した。 | Toxicol. in Vitro, 8, 755-757 (1994a) |
| 32 | Sugiyama M., H. Itagaki and S. Kato | Photohemolysis test and Yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of chemicals. | RBC (human), yeast | UVA | photohaemolysis yeast growth inhibition | 24chemicals | モルモットの結果と比較し、一致性は溶血73%、酵母は81%であった。2試験のbatteryではfalse negativeが減少し良好な結果が得られた。 | In: A.Rougier, A.M. Goldberg and H. Maibach (Eds), Alternative Methods in Toxicology vol.10, In Vitro Skin Toxicology - Irritation, Phototoxicity, Sensitization, Mary Ann Liebert, New York, pp. 213-221 (1994b) |
| 33 | Lovell WW, Jones PA. | Evaluation of mechanistic in vitro tests for the discrimination of photoallergic and photomirritant potential. | histidine, HSA (human serum albumin) | UVA | histidine photooxidation and photobinding to HSA | 30chemicals(EU/COLI PA) | histidineの光酸化は光刺激性のメカニズム評価のスクリーニングに有用。しかし光感作性物質のみが光タンパク結合を有することはなく、これらの識別には2つのbatteryが有用であった。 | Altern Lab Anim. 2000 Sep-Oct;28(5):707-24. |

第5章 標準的試験法の提案

担当：田中憲穂、若栗忍

5-1) 標準的試験法

光細胞毒性試験は化学物質等による細胞毒性が光存在下において増強されるかどうかを評価するための試験系で、光（特に紫外線）照射下と非照射下のそれぞれにおいて細胞毒性を検出し、それらの毒性を比較することによって、その物質が光毒性物質であるかどうかを判定する方法である。

第4章 2-2)②総合評価の項では、EU/COLIPA でバリデーションスタディがなされ、OECD のガイドライン案（2002年3月15日）として発表されている Balb/c 3T3, clone A31 細胞を用いたニュートラルレッド取り込み法による光毒性試験について文献的評価を行った。その結果、この細胞を用いる代替法はヒトや動物の光毒性データとの対応や施設間での再現性も良く、光毒性の評価に有効である事が示された。そこで本章では、基本的にはこの OECD のガイドライン案に準じた試験法を、データの信頼性を損なわないと思われる範囲で照射条件や用いる細胞株、試験の方法などに自由度を持たせて改変した方法を標準的試験法として提案する。

1) 目的

培養細胞を用いた *in vitro* 試験で被験物質の光細胞毒性を検出する。

2) 被験物質の試験への適用性

試験に先立ち、被験物質の UV/vis 吸収スペクトラムを確認する。UV 吸収のないものについては試験を行う必要はない。(注：OECD 試験法ガイドライン 101 に準じて試験を行い、分子吸光係数が $10 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ よりも低い場合、試験は実施しない。)

3) 使用細胞

代表的なものとして Balb/c 3T3, clone A31 細胞（以下、Balb/c 3T3 細胞）があげられる。細胞の UV に対する反応性や光毒性の検出に同等以上であることが示されれば、他の細胞を用いることができる。用いる細胞は、細菌やマイコプラズマに汚染されていないものを用いる。培地や培養方法は細胞に適した条件で行う。

細胞の特性は継代過程で変化する可能性があるので、使用細胞の継代数を設定する。細胞は対数増殖期にある状態で被験物質に曝露する。また、細胞の UV 照射量に対する反応性も調べる。

3) 試験法

1日目：

対数増殖期にある細胞を用い、96 ウェルプレートに3日目にサブコンフルエントになる程度の細胞数を播種する(注：Balb/c 3T3 細胞の場合、 1×10^4 cells/0.1mL/ウェル程度)。照射群と非照射群で一組とする。

2日目：

細胞播種の翌日、培地を除いて EBSS や PBS などの UV 吸収のない緩衝液(100-200 μ L)でウェル