

に関する PhaseⅢ研究では、測定されたデータを施設間、実験間、繰り返しの3つの要因に分け、変動係数が評価指標とされている。この係数も CV (coefficients of variation) として標記されているが、PhaseⅡ研究の CV とは本質的に異なる指標である。UV Filter 研究では、施設間と施設内の CV の比較がされており、一般に施設内の値に比べ、施設間の値の方が大きい (PIF、MPE のいずれも最高値は約 200%であった) という結果が得られている。物質によっては、PIF や MPE の値が 10 倍以上異なるものもあった。したがって、PIF や MPE の値での施設間再現性は低いと思われる。ところで、これらの指標とは離れて、光毒性の判定の食い違いに注目した場合、施設により食い違いが生じた被験物質の数は、11 施設で評価された PhaseⅡ研究では、判定不能とされた 1 物質を除いた 29 物質中 PIF で 13 物質、MPE で 11 物質である。このうち、3 施設以上食い違ったのは PIF で 3 物質、MPE で 1 物質であった。また、4 施設で評価された PhaseⅢ研究では、判定の食い違いが生じた被験物質の数は、20 物質中 PIF で 4 物質、MPE で 3 物質であった。以上の結果から、この結果は、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、光毒性の判定の施設間再現性という観点からは、再現性を有する試験法であると思われる。

#### E. 総合評価

以上より、文献上に記載された要約指標の値に基づき総合的に判断した場合、Balb/c 3T3 細胞を用いた NR 法は、感度、特異度、陽性予測力、陰性予測力、一致率は特異度以外は 90% 前後と高く、化学物質の光毒性ポテンシャルを予測する上で有効であり、かつ結果の判定の観点からはある程度の施設間再現性を有する試験法であるといえるだろう。

ただし、この結論はあくまでも文献上からの評価である。我々の検討では生データやデータ検討会や MT 会議の議事録等を得ているわけではない。したがって、データの質を十分に確かめることはできておらず、したがって、文献に試験結果が正しく反映されているか否かについての確認はできていない。また、3つの文献で評価された物質数は決して多くはなく、偽陰性が高めになる可能性があることを考慮すると、本方法のみで光毒性の有無を判定することにはリスクがあり、この試験法について更に検討する余地があると思われる。

よって、我々はこの試験法を代替法として、我が国で導入する場合には、大規模ではないにしてもこの結果を確認することを目的とした、質の高いデータに基づくバリデーション研究を実施する必要があると考える。

### 4-2-3) 光毒性評価パラメーターについて

担当：大森 崇

#### 4-2-3-1) はじめに

3T3 細胞を用いた NR 法の Phase II パリテーション研究では、Phase I 研究で用いられていた予測モデルである PIF (photo irritation factor) の他に、Holzhütter (1997) らにより新たに提案された MPE (mean photo effect) という予測モデルが導入され、これら 2 つの予測モデルによる評価が行われている。2 つの予測モデルは、どちらも照射の有無という 2 つの条件下での用量反応曲線の違いを表現する指標である。

ここでは、MPE がどのような指標であるのかを PIF と対比し解説することにする。

#### 4-2-3-2) PIF について

PIF は、非照射下における用量反応曲線から得られた ED50 を ED50(-UV)、照射下における ED50 を ED50(+UV)としたときに以下のように定義される。

$$PIF = \frac{ED50(-UV)}{ED50(+UV)} \quad (1)$$

実際の試験では、設定した用量の範囲に細胞毒性はみられず、反応の 50%を示すまでの結果を得られないことがある。このような場合には ED50 を得ることができず、このため(1)式として表現される PIF の値を求めることができない。このような状況には 2 つの場合が考えられ、通常、以下のように対処することにする。

1. もしも、ED50(+UV)は求めることができ、ED50(-UV)を求めることができなかった場合、光毒性が示唆されると思われる。この場合には、非照射下で実施された試験のもっとも高い濃度 (Cmax(-UV)) を用いた “>PIF” を PIF の値とする。ここで、“>PIF” の定義は、

$$>PIF = \frac{C \max(-UV)}{ED50(+UV)} \quad (2)$$

である。

2. ED50(-UV)、ED50(+UV)のどちらも求めることができなかった場合、光毒性がないということが示唆されると思われる。この場合には、PIF=\*1 とすることにする。

Phase II 研究では、以下のような判定ルールが SOP に定められていた。

(1)もしも、ED50(-UV)と ED50(+UV)を求めることができた場合、(1)式を用いて PIF を計算し、

PIF ≥ 5 ならば陽性

PIF < 5 ならば陰性

(2)もしも、ED50(-UV)が求められず、ED50(+UV)のみ求めることができた場合、(2)式を用いて PIF を計算し、

“>PIF” > 1 ならば陽性

“>PIF” ≤ 1 ならば陰性

(3)もしも、ED50 (-UV)と ED50 (+UV)のいずれも求めることができなかった場合、

PIF=\*1 で陰性

#### 4-2-3-3) MPE について

##### MPE の導出の背景

PIF は、基本的には照射下、非照射下の両方の ED50 が求めることができることが前提であり、“>PIF”の値を求めることや、値を「\*1」とすることは便宜的な対処にすぎない。また、“>PIF”の値は、その値が2つの ED50 の比でないことを示すために、計算値に「>」がつけられる。例えば、その値が3.1であるとしたら、表記として「>3.1」と記載される。このようなデータの表記法は、データ処理する際には非常に扱いにくい。困難さの例として、バリデーション研究における施設間差の評価を考えてみたい。被験物質ごとに PIF の値をプロットすることにしたとき、個々のプロットはある施設で得られたある物質の PIF の値となるが、データが「\*1」や「>3.1」というような値である場合にこの値を図の中でどのように示すべきであろうか。さらに、標準偏差を計算するとしたら、その計算をどのように行うべきだろうか。いずれにしろ難しい問題となる。したがって、データの処理という立場からすれば、両方の ED50 の値が求まらない場合であっても、定量的な値が求まる方が扱いやすい。

2つの ED50 の値の比として定義される PIF のもう一つの欠点は、用量反応曲線の形が考慮されないことである。PIF では、その定義から光毒性が示唆される物質は照射することにより用量反応曲線が左に併行移動することが前提となっているが、現実には得られたデータから描かれる用量反応曲線は必ずしもそうはなっていない。したがって、照射の有無により用量反応曲線の形が違う場合には、それにも対応できる指標が望ましい。

##### MPE の求め方

MPE は、上述した PIF の2つの特徴を克服することを考えて作られた指標である。

PIF の併行移動の考え方は、照射の有無が細胞毒性発現用量に影響を与えているという考え方である。一方、MPE では照射の有無が用量と反応のそれぞれに影響を与えると考える。また、MPE では、PIF のように各用量反応曲線の違いを ED50 で表される1点のみではなく、複数の点を用いる。このように考えることにより、用量反応曲線の形の相違が加味された指標となる。MPE の計算は、用量の影響は DE (dose effect)、反応の影響は RE (response effect) と呼ばれる2つの指標を複数の用量で求めることが基本となる。

##### ① DE (dose effect)

DE は、2つの用量反応曲線の水平方向の違いを評価する指標である。今、非照射下での用量反応曲線のある用量  $d$  における反応を  $r$  としたとき、照射下の用量反応曲線において、 $r$  の値に最も近くなるようにとった照射下での反応の値を  $r^*$  とする。そして  $r^*$  とする照射下での用量を  $d^*$  とする (図1)。このとき非照射下の用量  $d$  における DE を  $DE_d$  とし、以下のように定義する。

$$DE_d = \frac{d/d^* - 1}{d/d^* + 1} \quad (3)$$

##### ② RE (response effect)

RE は、2つの用量反応曲線の垂直方向の違いを評価する指標である。ある用量  $d$  における非照射下での反応を  $R_{(-UV)}[d]$ 、同じ用量での照射下での反応を  $R_{(+UV)}[d]$ 、反応の最大と最小を与える量の差を  $R_0$  とする。このとき、非照射下の用量  $d$  における RE を  $RE_d$  とし、以下のように定義する (図 2)。

$$RE_d = \frac{R_{(-UV)}[d] - R_{(+UV)}[d]}{R_0} \quad (4)$$

### ③ MPE (mean photo effect)

MPE は、2つの指標である DE と RE の積をいくつかの特定の用量について求めて、平均をとったものとなる。用量の数を  $N$  個とったとき、第  $i$  番目の用量を  $d_i$  とする ( $i=1 \dots N$ )。このとき、 $DE_{d_i}$  と  $RE_{d_i}$  の積を  $PE_{d_i}$  とすると

$$PE_{d_i} = DE_{d_i} \cdot RE_{d_i}$$

であり、MPE はその平均値として以下のように定義される。

$$MPE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N PE_{d_i} \quad (5)$$

原著である Holzhütter (1997) では、重み  $w(d_i)$  を用いて、次に示すようにより一般化した形で MPE を定義している。

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^N w(d_i) PE_{d_i}}{\sum_{i=1}^N w(d_i)} \quad (6)$$

(5)式は重みを 1 とした場合に相当する。

### ④ $N$ の決め方

(注：ここの記載は、最新の OECD ガイドライン案 (2002 年 3 月 15 日付け) のものと異なっている。ガイドラインはまだ案であるため、ここでは原著に従った。)

MPE は、 $N$  個の用量についての PE (DE と RE の積) の平均であるが、このときの  $N$  の数は試験で設定した用量の数とは異なることに注意が必要である。先に PIF は ED50 という一点について照射の有無について比較しており、MPE ではこの点を複数にすることで2つの用量反応曲線の形を考慮していると記載したが、このことが  $N$  の数と関係している。ED50 は 50%の反応を与える用量ということであるが、反応は 0%から 100%であるから 50%というのは、反応を均等に 2 分割する点となる。もし反応を均等に 3 分割する場合は、33.3%と 66.6%をとればよく、この2つの反応を与える用量は ED33.3、ED66.6 に相当する。同様に、均等に 4 分割

するならば、反応を 25%、50%、75%とすればよく、対応する用量は ED25、ED50、ED75 となる。MPE という N の数はこのように反応を均等に分割する数から 1 を減じた数を指しており、個々の DE や RE を求める用量は、分割に対応する用量となる。例えば、N=3 ならば ED25、ED50、ED75 に相当する点で DE と RE を求めればよい。このように求めることにしたときに、実際に N の数をいくつにするか、すなわち反応軸をいくつに分割して計算するかが問題になる。Holzhütter は、N の数を徐々に増やしたときに、試験から得られたデータと用量反応曲線とのあてはまりの変化の度合いを比べることで自動的に N の数を決める方法を採用している。

#### ⑤ カットオフ値

実際には、光毒性について、陽性または陰性の判断が必要になる。Phase II 研究では、このカットオフ値として 0.1 が採用されている。すなわち

MPE $\geq$ 0.1 ならば陽性

MPE $<$ 0.1 ならば陰性

#### 4-2-3-4) 用量反応曲線

より客観的に MPE や PIF を求めるためには、データから用量反応曲線を推定することが望ましいであろう。曲線の候補としては、ロジスティック曲線のような S 字型の曲線が利用できるであろうが、Holzhütter (1997) はより複雑なモデルの使用を提案している。ここでは、モデルの詳細には触れないが、彼が提案しているモデルは、データとして測定された各点をなめらかにつなぐ関数で結ぶもので、このときの関数として用量反応関係についてある種の理論的なモデルを導入している。この用量反応曲線を使うとかなり柔軟な形を表現することが可能である。

#### 4-2-3-5) 性能の比較

PIF と MPE による光毒性の判定の比較は、Holzhütter (1997) でも行なわれているが、Phase II 研究、UV Filter 研究で得られているデータが参考になるであろう。光毒性の有無の判定については、両者で極端に大きな違いがあるようには思えない。これは、単に陽性か陰性かを判定する場合には、PIF を用いた判定では、PIF の値そのものは求めることができなくても、用量反応曲線の関係の情報を利用した“>PIF”の値や「\*1」という表記を用いた判定で十分であることを意味している。Phase II 研究や UV Filter 研究では 3T3 細胞を用いた NR 法は良好な成績を示しているので、3T3 細胞を用いた NR 法により光毒性を判定する場合にはどちらの指標を用いてもよいであろう。

#### 5-3-3-6) 議論

ここでは 3T3 細胞を用いた NR 法のバリデーション研究で、予測モデルとして用いられた MPE を、従来より用いられてきた PIF と対比する形で解説した。

MPE は、光毒性の指標としてさまざまな用量反応曲線のパターンに対して具体的な数値が求められることができる。陽性と陰性の判定に関しては“>PIF”や「\*1」との併記により判定された PIF と大きな違いはないので、この点についてはどちらを用いても大差はないように思われる。光毒性の有無の判定が適切に行えることが指標にとって最も重要であるものの、陽性か陰性かの判定以外の検討を、指標を用いて行いたい場合には PIF に比べて使い勝手がよいと思われる。

たとえば、UV Filter 研究では、データのばらつきを施設間、施設内の試験間、繰り返しの3つの変動に分解した解析を行っているが、このような解析を行う場合は、MPE は扱いやすい。しかし、扱い易いことと、適切に光毒性を評価していることは異なる。あまり大きな問題は生じないと思われるが、極端な現象が生じた場合に、その値がどのような意味を持つのか、どのような値であるべきか、MPE が望ましい値に要約されているかどうかについては今後検討が必要であるかもしれない。

(6)式は重みを用いて MPE を定義しているが、実際に重みを客観的に与えるのは難しいように思われる。OECD ガイドライン案(2002年3月15日付け)では、この値の決め方について若干の記載が触れられているが、その妥当性については不明である。

Holzhütter (1997) は用量反応曲線として、非常に柔軟で興味深い曲線を採用しているが、極端に外れたデータがあるような場合に対する頑健性がやや気になる。幅広いデータに対応することができる反面、はずれ値のようなデータの影響を受けてしまうと思われる。MPE や PIF を求める際には、生データと用量反応曲線とのあてはまり度合いをチェックすることが必要であろう。

## 参考文献

- Holzhütter, H.G.,(1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose response curves and its use for predicting *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA* 25, 445-462.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., de Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W. & Pfannenbecker, U.(1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of European Union Directive 76/768/EEC, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679-708
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechocitch G., de Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J.M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., & Prantom, P.(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.

### 4-3) 3T3-NR 法以外の方法について

担当：岡本 裕子

Balb/c 3T3 細胞を用いた光刺激性試験代替法以外の *in vitro* 光毒性試験法について文献調査を実施した。その結果、現在までに報告されている *in vitro* 光毒性試験法は、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について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、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。また、一方で、*in vivo* 光毒性結果との対応性を高めるため、メカニズムの異なった試験法を組み合わせる (battery) 方法が報告されている。現在までに報告された各試験法の概要についてまとめた。

#### 4-3-1) 各種 *in vitro* 光毒性試験法のまとめ (文献調査)

文献調査の結果から得られた各種 *in vitro* 光毒性試験法について、スクリーニングを目的とした試験法及びメカニズム評価に重点をおいた試験法について、以下の7つの項目に分類した。

##### 4-3-1-1) 単層培養細胞を用いた試験法 (Table 4-14)

単層培養細胞を用いた *in vitro* 光刺激性試験法は、主にスクリーニングを目的として評価されている。使用している細胞は、すべて哺乳類由来の細胞であり、fibroblasts、keratinocytes、hepatocytes、macrophage、carcinoma 等様々の細胞種が利用されている<sup>11-12)</sup>が、fibroblasts、keratinocytes を用いた報告が多い。使用している光源は、UVA であった。評価の指標では、細胞内小器官の機能を指標とした方法 (MTT assay、NR-uptake 等)、細胞膜損傷 (LDH-leakage)、DNA 合成阻害および酸化傷害を指標とした方法が用いられている。各試験法の報告結果から、細胞による感受性の差が見られている。fibroblasts と keratinocytes との比較では、ヒト keratinocytes の感受性は Balb/c 3T3 と比較して高くないという報告がある<sup>8)</sup>。また、各種細胞の感受性の差を細胞内成分の差 (EGF レセプター発現、グルタチオン含量等) ではなく細胞内への化学物質の取り込み量の差によると考察している報告<sup>11)</sup>がある。このように細胞による感受性の差は報告されているが、各種細胞を用いた光刺激性予測は可能であると報告されている。

##### 4-3-1-2) その他の細胞を用いた試験法 (Table 4-15)

微生物を用いた試験法と哺乳類以外の細胞を用いた試験法がある。これらも主にスクリーニングを目的とした試験法と考えられる。使用されている微生物では酵母が主に用いられている。また、原生動物である *Tetrahymena thermophila* や *Artemia salina* (brine shrimp) 等が利用されている。光源は UVA が用いられている。評価の指標は、主に増殖抑制であった。試験法の特徴として、簡便で安価なことから大規模なスクリーニングに適している<sup>15)</sup>と報告されている。

##### 4-3-1-3) 培養皮膚モデルを用いた試験法 (Table 4-16)

3 次元培養皮膚モデルを用いた試験法は主にスクリーニングを目的とした試験法と考えられる。ヒト fibroblasts または、ヒト fibroblasts と keratinocytes を用いて作製した皮膚モデルを用いたものである。評価の指標は MTT assay が用いられている。in vivo 結果との対応は良好と報告されている。

#### 4-3-1-4) 生体膜損傷を指標とした試験法：光溶血性試験 (Table 4-17)

生体膜損傷を指標とした試験法では、赤血球を用いた光溶血試験法が使用されている。これは、生体膜脂質過酸化を中心とした膜損傷を評価する試験法であり、主に光毒性反応のメカニズム評価法として利用されている。評価の指標は溶血により放出されたヘモグロビン量の測定である。使用している赤血球はヒト赤血球がほとんどである。光源は UVA が主体であるが、一部 UVB または UVA と UVB の併用が報告されている。試験法の報告からはソラレン等の DNA 関与の光毒性反応は検出できないが、分子状酸素の関与する反応は評価できる<sup>18,19)</sup>と報告されており、反応メカニズムによる差別化が可能という結果が得られている。また、in vivo 光毒性結果との対応評価からスクリーニング法としても有用であるという報告<sup>21)</sup>もある。

#### 4-3-1-5) タンパク質に対する作用を指標とした試験法 (Table 4-18)

タンパク質に対する作用を評価する試験法は、メカニズム評価に重点を置いた試験法として報告されている。タンパクに対する作用は、光によるタンパク質の過酸化と光によるタンパク質への共有結合が評価されている。光タンパク過酸化では、ヘモグロビンの光過酸化反応を利用したものが報告されている。また、光タンパク結合ではヒト血清アルブミン、 $\gamma$ -グロブリン、インシュリンが用いられ、それらに対する光結合能について評価している。光源は UVA が主体である。光タンパク結合は、in vitro 光感作性試験法として評価されている。ヘモグロビンの光過酸化反応は単独での報告は少なく、光溶血性試験と併用で報告されている。これらの報告のなかで、光毒性物質のタンパクへの作用について、光刺激性物質は一重項酸素を発生することからアミノ酸残基を酸化するが、光感作性物質はタンパクと結合するものが多いという報告<sup>26)</sup>があり、光刺激性反応と光感作性反応の識別への利用の可能性を示唆している。

#### 4-3-1-6) その他の化学物質を用いた試験法 (Table 4-19)

メカニズム評価に重点を置いた試験法として、分子状酸素の関与を評価するため、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。脂質過酸化反応では、リノレン酸、スクワレンが利用されている。活性酸素種の補足剤としては、ヒスチジン、トリプトファン、グルタチオン、NADH の利用が報告されている。光源は UVA である。これらの評価法は単独での報告は、NADH によるもののみであり、その他はいくつかの評価法を組み合わせで報告されている。これらの試験法は、光毒性メカニズム評価への利用が中心で、広範囲の化学物質に対する in vivo 結果との対応性について検討した報告はなかった。

#### 4-3-1-7) 試験法の組み合わせ (battery) による評価 (Table 4-20)

各種 in vitro 試験法の予測精度を高めるため、試験法を組み合わせで評価している報告が見られた。これらは DNA に対する作用を確認できる真核細胞を用いた試験法と生体膜損傷を指



標とした方法の組み合わせや、異なったメカニズム評価を組み合わせたものであった。この中では、光溶血性試験法と酵母を用いた試験法の組み合わせでモルモットによる光毒性結果との一致性が高まったという報告<sup>32)</sup>が見られた。

#### 4-3-2) 各種 in vitro 光毒性試験法の評価

文献調査の結果、各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たが、スクリーニング評価では単層培養系での報告が多かった。使用されている光源は UVA がほとんどであり、UVB 単独での評価報告は少なかった。メカニズム評価では、赤血球溶血性試験法の報告が多かった。化学物質を用いた評価法は単独での利用はほとんど見られず battery 試験として評価されていた。また、各試験法の中で、プレバリレーションを含むバリレーション評価が実施されたものは、ヒト keratinocytes による試験法<sup>8)</sup>、皮膚モデルを用いた試験法<sup>17)</sup>、赤血球溶血性試験法<sup>20, 31)</sup>が挙げられる。これらの評価結果はいずれも良好であったと報告されている。また、試験法の組み合わせによる評価では、スクリーニングを目的とした試験法とメカニズム評価法の組み合わせや、一定の化学物質の光毒性反応を詳細に検討するための組み合わせがあり、それぞれの用途に応じた battery が検討されている。このような組み合わせ評価は試験法の精度を高めるための有効な手段であると考えられる。特に光溶血性試験法は、脂質膜過酸化のメカニズム評価法として広く利用されていることから battery を考える場合には有用な試験法であると考えられる。また、HSA 等を用いた光タンパク結合反応とヒスチジンの光過酸化反応の組み合わせは、光刺激性反応と光感作性反応の簡易識別に有用であることが示唆されている。したがって、Balb/c 3T3 細胞を用いた光刺激性試験代替法以外の代替試験法としてこれらの代替試験法が有望であると考察される。

#### 参考文献

- 1) 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.
- 2) Freeman RG, Murtishaw W, Knox JM. (1970) Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity. *J. Invest. Dermatol.* 54(2) 164-9.
- 3) Lasarow, R.M., R.R. Isseroff and E. Gomez. (1992) Quantitative in vitro assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay. *J. Invest. Dermatol.* 98, 725-729
- 4) Lock, S.O. and J.V. Friend. (1986) Phototoxicity testing in vitro: Evaluation of mammalian cell culture techniques. *Food Chem. Toxicol.*, 24, 789-793
- 5) Maier, K., R. Schmitt-Landgraf and B. Siegemund, (1991) Development of an in vitro test system with human skin cells for evaluation of phototoxicity. *Toxicol. in Vitro*, 5, 457-461
- 6) Traynor NJ, Barratt MD, Lovell WW, Ferguson J, Gibbs NK. (2000) Comparison of an in vitro cellular phototoxicity model against controlled clinical trials of fluoroquinolone skin phototoxicity. *Toxicol. In Vitro.* 14(3) 275-83.
- 7) Wilhelm KP, Biel S, Siegers CP. (2001) Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine.* 8(4) 306-9.

- 8) Clothier R., Willshaw A., (1999) The Use of Human Keratinocytes in the EU/COLIPA Study on UV Filter Chemicals, ATLA 27 247-259
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Vandenberghe 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.
- 12) 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.
- 13) Daniels, F., J. (1965) A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J. Invest. Dermatol.* 44, 259-263
- 14) Misra RB, Joshi PC. (1999) Phototoxicity evaluation--*Tetrahymena thermophila* as an alternative model. *Indian J. Exp. Biol.* (8) 750-7.
- 15) 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.
- 16) Augustin C, Collombel C, Damour O. (1997) Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 13(1-2) 27-36.
- 17) Edwards S.M., T.A. Donnelly, R.M. Sayra and L.A. Rheins, (1994) Quantitative in vitro assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin2TM. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10, 111-117
- 18) Kahn G, Fleischaker B.E. (1971) valuation of phototoxicity of salicylanilides and similar compounds by photohemolysis. *J. Invest. Dermatol.* 56(2) 91-97.
- 19) Hetherington, A.H. and B.E. Johnson, (1984) Photohemolysis. *Photodermatology*, 1, 255-260
- 20) Pape WJ, Maurer T, Pfannenbecker U, Steiling W. (2001) The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation program on phototoxicity (phase II). *Altern Lab Anim.* 29(2) 145-162.
- 21) Sugiyama, M., H. Itagaki, T. Hayashi, N. Murakami and S. Kato (1994a) In vitro assay to predict phototoxicity of chemicals: (1) Red blood cell hemolysis assay. *AATEX*, 2, 183-191
- 22) 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.
- 23) Traynor, N.J., B.E. Johnson and N.K. Gibbs, (1996) Photohaemolysis assay for drugs

- phototoxicity complicated by 'bleaching' of released haemoglobin. *Toxicol. in Vitro*, 10, 619-624
- 24) Pendlington, R.U. and M.D. Barratt, (1990) Molecular basis of photocontact allergy. *Int. J. Cosmet. Sci.*, 12, 91-103
  - 25) Barratt, M.D. and K.R. Brown, (1985) Photochemical binding of photoallergens to 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.

Table 4-13 単層培養細胞を用いた試験法

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
1	Colombain M, Goll V, Muyard F, Girard C, Bevalot F, Richert L.	A bioassay using the human hepatoblastoma cell line HepG2 for detecting phototoxicity of furcoumarins.	HepG2 (hepatoblastoma)	UVA or UVB	MTT assay	5 furcoumarins (heraclenol, xanthotoxin, trichoclin, imperatorin)	HepG2は、70ナノワットのin vitro光毒性評価に適している。	Planta Med. 2001 Oct;67(7):644-6.
2	Freeman RG, Murtishaw W, Knox JM.	Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity.	4 cell lines (Hep-2, monkey kidney cells, rabbit kidney cell rabbit skin fibroblasts)	UVA (300nm <) or visible light	NR-uptake	13 photosensitizers	単層培養細胞での光照射による毒性は確認できた。8-MOPでは10 <sup>-5</sup> の濃度でも反応が確認できた。	J Invest Dermatol. 1970 Feb;54(2):164-9. No abstract available.
3	Lasarow, R.M., R.R. Isseroff and E. Gomez	Quantitative in vitro assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay.	normal human fibroblasts	UVA	NR-uptake	doxycycline, minocycline, demeclocycline, tetracycline, naidixic acid, ofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, chlorpromazine	非ナノワット系及び/或系抗生物質等の光毒性を繊維芽細胞で評価。	J. Invest. Dermatol., 98, 725-729 (1992)
4	Lock, S.O. and J.V. Friend	Phototoxicity testing in vitro: Evaluation of mammalian cell culture techniques.	red blood cells, MPM(mouse peritoneal macrophages), CHV79	UVA	haemolysis, LDH leakage, beta-glucuronidase, DNA-synthesis,	6 chemicals	CHV79細胞のUVA感度は高い。哺乳類の培養細胞は光毒性物質に対する感度が高い。	Food Chem. Toxicol., 24, 789-793 (1986)
5	Maier, K., R. Schmitt-Landgraf and B. Siegemund	Development of an in vitro test system with human skin cells for evaluation of phototoxicity	normal human skin fibroblast, keratinocytes	UVA	NR-uptake, kenacid blue assay, MTT assay, 70ナノワット取り込み, fluorometric assay	26 chemicals	代替試験法として開発。4種の指標について評価した。ヒトの正常細胞はUVAに対して感度は高い。スクリーニング法として適している。	Toxicol. in Vitro, 5, 457-461 (1991)
6	Traynor NJ, Barratt MD, Lovell IWW, Ferguson J, Gibbs NK.	Comparison of an in vitro cellular phototoxicity model against controlled clinical trials of fluoroquinolone skin phototoxicity.	CHV79 (chinese hamster fibroblasts)	UVA	MTT assay, NR-uptake assay,	14 chemicals ( 8fluoroquinolone antibiotics)	全身投与における臨床光毒性結果とin vitro光毒性結果との対応を評価した。Quinolone系抗生物質の光毒性予測に利用可能。	Toxicol In Vitro. 2000 Jun;14(3):275-83.
7	Wilhelm KP, Biel S, Siegers CP.	Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of Hypericum perforatum extracts.	HaCaT cells (human keratinocyte),	UVA	NR-uptake	5-mop, chlorpromazine, psoralenes, Hypericum perforatum extracts	ヒトkeratinocyteを用いたNR-uptake法はバイオレットと異なる化学物質を検出できた。	Phytomedicine. 2001 Jul;8(4):306-9.
8	Clothier R., Willshaw A.,	The Use of Human Keratinocytes in the EU/COLIPA Study on UV Filter Chemicals	NHK cells foreskins (human keratinocyte)	UVA: 5J/cm2	NR-UPTAKE PIF and MPE	50 chemicals	EU/COLIPAでのphase 2 で使用した30品およびECVAM/COLIPAでの紫外線吸収剤20品を含む試料について4名の男性から得られた初代培養ヒトケラチノサイトで評価したがそれらの感度は3T3を用いた場合と比較して感度は高くなかった。	ATLA 27 247-259(1999)
9	Van Graft M, Boot, JH.	Photodynamic effects of protoporphyrin on the cellular level- an in vitro approach.	isolated hepatocytes(Wistar Rat)	UVA (420nm)	LDH leakage	protoporphyrin	protoporphyrinの光毒性メカニズムの評価：細胞膜へ取り込まれたprotoporphyrinが5α-βや5α-β7を傷害する。その取り込みは拡散と能動輸送による。脂質過酸化が主な役割を演じている。	In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1996 Jul-Aug;32(7):394-8.
10	Rosen JE, Prahald AK, Schluter G, Chen D, Williams GM.	Quinolone antibiotic photodynamic production of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cultured liver epithelial cells.	ARL-18cell (Adult Rat Liver)	UVA: 20J/cm2	8-oxo-dG formation	quinolons (lomefloxacin, ciprofloxacin,	70ナノワット系照射で活性酸素を放出するため光毒性を生じている。活性酸素によるDNA傷害の指標として8-OXO-dGを用いて光毒性を評価した。	Photochem Photobiol. 1997 Jun;65(6):990-6.
11	Vandenbogaerde AL, Cuveele JF, Proot P, Himpsens BE, Merlievede WJ, de Witte PA.	Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin.	7 cells (A431, ME-180, HeLa, DUT 45, PC-3, MCF7, Hs913T, 3T3)	UVA	NR-uptake	hypericin	各細胞でhypericinによる光毒性が検出された。この差は細胞内のEGFReceptorやp170glycoproteinの発現とは無関係。細胞内glutathion濃度にも関係していなかった。しかし細胞内への取り込みがことが影響している。	J Photochem Photobiol B. 1997 Apr;38(2-3):136-42.
12	Morgan J, Potter WR, Oseroff AR.	Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative.	2008, 2008ET3 (human ovarian carcinoma cell lines)	red light fluorescent lamp	MTT assay	VBBO, photofrin NBA	光毒性反応による細胞死のメカニズムではミトコトノリが主要な役割が主であると考えられている。これに光増感剤を投与し当該細胞で毒性を比較した。	Photochem Photobiol. 2000 Jun;71(6):747-57.

Table 4-14 その他の細胞を用いた試験法

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
13	Daniels, F., J.	A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds.	Organism (candida albicans)	UVA (black light)	阻止剤-,	furocoumarine, coal tar,	試験法は、感度が高く furocoumarine系の光刺激性を検出できた。	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	DNAdamage, oxidative stress sunlight, glutathion 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stress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	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
16	Augustin C, Collombel C, Damour O.	Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro.	DE(normal human fibroblastsの3-T-3細胞培養) SE(Demodex human keratinocytesを播種した)	UVA(O-50J/cm2:最適なのは3J/cm2)	MTTassay, IL-1 alpha release assay	5chemicals	2の好みで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 Photoimmunol Photomed. 1997 Feb-Apr;13(1-2):27-36.
17	Edwards S.M., T.A. Donnelly, R.M. Sayra and L.A. Rheims	Quantitative in vitro assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin <sup>2</sup> ™.	skin2(40%メカニカル培養)	UVA: 2.9J/cm2	MTTassay	20chemicals	COLIPAのtask forceで使用したもので、In vitro とin vivoの結果の相関は良好。	Photodermatol. Photoimmunol. 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	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
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.	カハ、フレイシャー等は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	Photohaemolysis.	human red blood cells	UVA and UVB,	photohaemolysis, Drabkin solution	plant extracts	psoralen等のDNA関与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, Stelling 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1つの。溶血と膜損傷の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-isoindolinyl)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薬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 4-19 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. Pfannenbecker	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 photoirritant 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、これらの鑑別には2つのbatteryが有用であった。	Altern Lab Anim. 2000 Sep-Oct;28(5):707-24.



## 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。実験時はプロトコルに忠実に従うべきであるが、通常プロトコ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<sup>1)</sup>。Balb/c 3T3 細胞以外の細胞や亜株である 3T3-E<sub>1</sub> 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くてはならない。

#### 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  $1 \times 10^4$  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<sup>2,3)</sup>。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<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>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 D<sub>0</sub> 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<sup>6)</sup>。

### (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 CO<sub>2</sub> 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<sup>6)</sup>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 IC<sub>50</sub> 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<sup>7,8)</sup>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<sup>9)</sup>。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、 $\text{PIF}>5$  あるいは  $\text{MPE}>0.15$  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。