

#### 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ポーザブル製品について、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、各種ディスポーザブル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) 3 R s 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、3Rs<sup>10)</sup> 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., Kumazaka, 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<sup>1)</sup>、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<sup>2, 3)</sup>。その後、1994-1996 に実施されたバリデーション (Phase II)<sup>4)</sup> 及び 1997-1998 に実施された紫外線吸収剤(Phase III)<sup>5)</sup> 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<sup>6)</sup>、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<sup>7)</sup>。

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<sup>8)</sup>。

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<sup>9)</sup>。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<sup>8)</sup>。

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/cm<sup>2</sup> (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<sup>8, 10)</sup>。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/cm<sup>2</sup> で10分間照射することにより照射量を5 J/cm<sup>2</sup> としている。一方、EU/COLIPA では1.7 mW/cm<sup>2</sup> で50分間照射することにより照射量5 J/cm<sup>2</sup> としているため、照射量が同じ5 J/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup>とした場合についても、照射強度を1.7 mW/cm<sup>2</sup>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)	5 < PIF 0.15 < MPE	5 ≤ PIF	5 ≤ Cmax(-UV) Cmax(+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)<sup>4)</sup> 及び 1997-1998 に実施された紫外線吸収剤(Phase III)<sup>5)</sup> 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<sup>1)</sup>。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<sup>11)</sup>。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<sup>11)・12)</sup>。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合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<sup>8, 9)</sup>。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<sup>11)</sup>。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.
- 1) 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).
- 1) 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).

## 第 5 章

### 推奨する試験プロトコール

## 第5章 推奨する試験プロトコール

担当：田中憲穂、若栗忍

### 5-1) 試験法の実際

#### 5-1-1) はじめに

光細胞毒性試験は被験物質による細胞毒性を光（特に紫外線）照射下と非照射下のそれぞれの条件下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、照射条件や用いる細胞株、試験の方法など、試験の実施にあたって特に留意すべき諸事項を整理し、推奨試験プロトコールを記載する。

#### 5-1-2) 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。原則として、UV 吸収のないものについては光毒性はないものとして、試験は行わない。（注：OECD 試験法ガイドライン 101 に準じて試験を行い、molar extinction/absorption coefficient 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。なお、通常、適切な溶解溶媒のない物質や培養液と混和しても直ぐに分離してしまう物質への適用は困難であるし、着色物質では正しい評価が出来ない場合がある。また、揮発性の高い物質についても試験系への適応に際しては注意が必要である。なお、地球に到達する紫外線のうち、UV-A は皮膚への透過度が高く光毒性もでやすく、より短波長である UV-B は皮膚への透過度は低いとその生物学的な作用は強い。一方、本来 UV-B は生体内の内因性の光増感物質と反応して皮膚傷害を起こすため、臨床的にも UV-B による外因性化学物質の光毒性そのものだけを特定することは難しいと考えられる。よって、本試験系でも UV-B 吸収が原因となる反応はとらえ難い可能性がある。

#### 5-1-3) 使用細胞

代表的なものとして Balb/c 3T3, clone A31 細胞（以下、Balb 3T3 細胞）があげられる。細胞の特性は継代過程で変化する可能性があるため、解凍後の使用細胞の継代数を限定する（Balb/c 3T3 細胞の場合は少ない方がよい）。細胞の UV に対する反応性や光毒性の検出に有利であることがバリデーションにより示されれば、他の細胞を用いてもよい。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事を予め確認しておく。培地や培養方法は細胞に適した条件で行う。細胞は対数増殖期にあるものを試験に使用する。

#### 5-1-4) 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 3T3 細胞の場合、 $1 \times 10^4 / 0.1 \text{ mL}$  /ウェル程度）。照射群と非照射群で一組とする。プ

レートの辺縁部には培養液のみで細胞は播かず、実験に供しない方がよい。

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  $\mu$ L)でウェルを洗浄後、緩衝液に種々の濃度の被験物質を溶かした処理液(100  $\mu$ L)を加えて前処理し、非照射群は室温暗所で、照射群は光照射下で処理する。この時の前培養時間、照射時間および照射強度は、陽性対照を用いたそれぞれの実施機関での背景データを参考にして決定する。(例：EU/COLIPA のバリデーションスタディの条件：Balb/c 3T3 細胞を用いて水銀メタルハライドランプを照射する系においては、1 時間被験物質とともに前処理し、UV 照射群は 1.67 mW/cm<sup>2</sup> で 50 分照射する(= 5 J/cm<sup>2</sup>)。一方、非照射群では室温暗所 50 分放置する。処理後ウェルを緩衝液(100-200  $\mu$ L)で洗浄し、新しい培地を加えて更に 1 日培養する。

3日目：

細胞の増殖状態や形態などを顕微鏡で観察し記録する。細胞毒性試験としてニュートラルレッド取り込み法による場合は、培養終了 2-3 時間前に、ニュートラルレッド (例、50  $\mu$ g/mL 培地を 150  $\mu$ L)を加えて生細胞に取り込ませる。培養終了後、ニュートラルレッド含培地をのぞき、ウェルを緩衝液等で洗浄する。色素抽出液 (例、水(49 容)：エタノール(50 容)：酢酸(1 容))を用いて、色素を抽出する。プレートリーダ等で吸光度 (540 nm) を測定し、細胞毒性を算出する。試験は濃度設定試験を含めて最低 2 回行う。

注：EU/COLIPA のバリデーショ及び OECD のガイドライン案では、下記のような条件で行う。(この項の位置については後に検討する。)

細胞： Balb 3T3 細胞 (培地：DMEM+10% NBCS)。他の細胞の場合は妥当性を記載する。また細胞の UV に対する感受性を調べておく。

培養条件： 37°C、5-7.5%CO<sub>2</sub> (バリデーションでは 7.5%CO<sub>2</sub>)

播種細胞数： 試験の最後に細胞がコンフルエントにならないような密度で播種する。Balb 3T3 細胞の場合は 10<sup>4</sup> cells/well

照射装置： バリデーションでは UV-sun simulator: type SOL 500, filter type H1,

Dr. Honle 社, Germany に全て統一。OECD のガイドラインでは、太陽光の波長に類似したサンシュミレータ (フィルター装着とされており、キセノンランプでも水銀メタルハライドランプでもよい。

照射量： 1.7mW/cm<sup>2</sup> で 50 分 (5J/cm<sup>2</sup>)

推奨試験法では、基本的には OECD のガイドライン案に準じるが、それにこだわらず、十分な背景データがありそれに基づく妥当性がバリデーショで示してあれば他の試験条件でもよい。用いる細胞は Balb 3T3 細胞をあげたが、特にこの細胞のみに限定しない。培地や血清のロットも十分に増殖する事が確認されていればどれを用いてもよい。照射装置や照射線量等の条件も、十分な背景データに従って条件が設定されていること。但し、ランプの種類によって、照射条件とその生物学的影響も大きく異なるので注意を要す。

#### 5-1-5) 被験物質の調製

被験物質は EBSS や PBS などの緩衝液に溶解する。培養に用いる培地は、pH 指示薬やビタミンなど UV 吸収する物質が含まれているため、被験物質処理には使用しない。被験物質が直接緩衝液に溶けない場合は、他の溶媒に溶解後、緩衝液に添加する。使用する溶媒は水、エタノール、DMSO などがあげられるが、試験に影響を与えない濃度で使用する。また、懸濁/浮遊/析出するような被験物質、もしくは、着色しているような場合は、真の値が得られないことがあるので注意する。これらの被験物質の

性状は、被験物質を緩衝液や溶媒に添加した際や、光照射直前に確認する。現時点では、S9mix に含まれる UV 吸収物質の存在により、代謝活性化の系を適用することは難しい。被験物質処理により培養環境が非生理的条件になる場合（pH や浸透圧など）は、試験結果に影響を及ぼす可能性があるため注意する。また、被験物質の調製および試験を行う際は、室内の光環境にも注意する。

#### 5-1-6) 用量段階

予め、本試験の濃度を設定する為の予備試験を実施し、どの程度の濃度域で（UV 照射・非照射下において）毒性を示すかを調べる。本試験の処理濃度は適切な間隔（公比 $\sqrt{10}$ 以下）を設定する。適用する濃度範囲は、ほとんど毒性を示さない領域からほとんど生存細胞が認められない濃度までを含み、20～80% の間に 2 点以上とれるようにするのが望ましいが、物質によっては困難なこともあり、光毒性の判定が明確な場合はこの限りではない。精度良い用量作用曲線に基づいて光毒性を判定するための用量数については 8 段階程度が望ましい。本試験濃度は、非照射と照射下のそれぞれの条件下で得られた予備試験結果により決定するが、別々に行うと正しい判定が下せない場合があるので、照射と非照射は同時に試験する。

毒性が見られない場合の最高濃度の上限は、OECD 及び厚生省などのガイドラインにあわせて、5 mg/mL または 10 mM（いずれか低い方）とする。ただし、本試験系は沈殿する化学物質の試験には適さないため、沈殿が見られない限界濃度まで適用する。例として、96 ウェルプレートであれば、1 プレートあたり 1 濃度につき 3-6 ウェル、8 濃度とすることで 1 プレート 1~2 検体の処理ができる。照射、非照射群、それぞれ一度に複数のプレートを用いる必要はない。

注：EU/COLIPA のバリデーションでは、広い濃度域をカバーして予備試験を実施している。やり方は本試験と同様に光照射と非照射を同時に試験する。最高濃度での pH を調べ、極端な酸性もしくはアルカリ性の場合は pH を調整して用いる。1 回目、2 回目ともに 8 濃度設けている。1 回目のバリデーションでは、その濃度範囲は 0.5-5mg/mL、1 濃度で 3-6 ウェル使用していた（1-2 物質/プレート）。試験は濃度設定試験を含め、2 回実施する。また、10-90%に 3 点以上はっていない場合は、より狭い範囲で再試験を行うとしている。

OECD のガイドライン案では、試験を開始する前に UV/Vis 吸収スペクトラムを OECD ガイドライン 101 に従って測定する、その際、molar extension/absorption coefficient が  $10 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  より小さければ試験は行わなくても良い。また、被験物質の処理液を細胞に添加した際の pH は 6.5-7.8 の範囲とする。検体の溶解性にもよるが、最高濃度は  $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  としている。公比または公差などの希釈段階で 8 濃度設定するとしている。

#### 5-1-7) 陽性対照

陽性対照物質としては、chlorpromazine HCl (CPZ)等があげられる。Balb/c 3T3 細胞を用いて水銀メタルハイドランプを照射する系で CPZ を使用する場合は、照射下での IC50 値 = 0.1 - 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、非照射下での IC50 値 = 7.0 - 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Photo Irritation Factor (PIF=IC50 (-UV)/IC50 (+UV)) > 6 を目安とする。陽性対照は、光照射、非照射の両方で IC50 値を測定できる物質であることが望ましい。陽性対照は本試験において必ず必要であるが、陽性対照と被験物質を同一プレート上におく必要はない。光照射と非照射については独立したプレートを用いる。

本推奨試験法では、OECD ガイドライン案を採用し CPZ で得られた IC50 値は参考値として示す。

注：EU/COLIPA のバリデーションと OECD のガイドライン案では、下記のように設定された。

陰性対照：検体を溶解もしくは懸濁した溶媒を使用する。

陽性対照：chlorpromazine (CPZ)を使用する。この試験条件下では照射下での IC50 値は 0.1-2  $\mu$ g/mL,非照射下での IC50 値は 7.0-90.0  $\mu$ g/mL, PIF > 6 となる。

#### 5-1-8) 照射条件

\* 照射光源としては太陽光類似のソーラーシミュレーターが適している。一般的に、キセノンランプと水銀メタルハライドランプの両方がソーラーシミュレーターとして使われている。UVB を減少させるためにフィルターを使用する(注：自然太陽光では UVA:UVB = 約 20:1)。試験に用いるランプやフィルターの機種やメーカー、その波長特性については予め調べて記録しておく。また、購入した新しいランプは照射強度が安定するまで、暫らく使用した後試験に用いる。

\* 照射線量は細胞に毒性を示さない線量で、光毒性物質が十分に反応する条件でなければならないので、細胞の光反応性と陽性対照物質に対する反応性から決める。光照射下でのコントロール値が非照射下のコントロール値に対して 80%以上の生存率を示す条件で試験を行うこと。照射量を定めるための対照物質は EU/COLIPA のバリデーションスタディで用いられた、陽性、陰性の明確な物質を使用するとよい。

\* 照射エネルギーや照射時間などの照射条件は生物学的な反応を基に確認・調整する必要がある。

\* 照射むらによるデータのバラツキが起り得ることから、照射装置毎に、また、ランプを交換する毎に照射むらの程度を確認しておく必要がある。照射の平面的な照射むらによるバラツキを防止するためには一定時間毎に位置をずらすことも有用である。

\* UV 線量計についても同様に機種、メーカーを特定しておく。同一照射条件でも、用いる個々の UV メーターの特性によって示す値が異なるので、常に同じ UV 線量計を使用し、定期的に校正して使用する必要がある。試験時の UV 照射はプレートにプラスチックのフタをかけた状態で行うため、線量の測定は、使用するプラスチックのフタを通して測定する。

①EU/COLIPA のバリデーションと同一条件の水銀メタルハライドランプを用いる場合は、線量や照射時間などはほぼ OECD のガイドライン案に示す試験条件に準じて実施する事ができるが、線量の確認は行う。

②キセノンなど他の光源を用いる場合は、予備実験により適切な照射条件を設定する必要がある。

#### 5-1-9) 細胞毒性の測定

光細胞毒性を調べる方法としては、原則としてニュートラルレッド法を用いる OECD のガイドライン案に従う。ニュートラルレッド法以外にも、MTT 法、クリスタルバイオレット法、コロニー形成法など、各種の方法が適用可能であるが、本格的なバリデーションスタディが実施されているのはニュートラルレッド法のみである。その他の方法を用いる場合においてはその妥当性を確認する。

#### 5-1-10) 結果の判定

結果は光照射および非照射における IC50 値の比、もしくは照射および非照射における反応性の比較によって判定する。前者は PIF、後者は Mean Photo Effect (MPE)として算出される (H-G. Holzhütter, ATLA 25, pp445-462, 1997)。どちらの場合も、最終的には照射量に依存するので、陽性対照物質等を用いた照射量の設定が重要となる。

照射、非照射それぞれの IC50 値を算出し、その比である  $PIF = IC50(-UV) / IC50(+UV)$  を求める。PIF < 2 で陰性、 $2 < PIF < 5$  で疑陽性、PIF > 5 で陽性と判定する。照射、非照射どちらかで IC50 値が求められない場合は、PIF 値は求められない。非照射群で最高濃度でも IC50 値に達しない場合は、最高濃度と照射群での IC50 値との比を求め、PIF 値はその値以上 (<PIF) とする。また、MPE の場合、MPE < 0.1 で陰性、 $0.1 < MPE < 0.15$  で疑陽性、MPE > 0.15 で陽性と判定する。可能ならば、PIF および MPE の両方で判定し、強い判定結果が得られた方を被験物質の光毒性についての判定とする。OECD のガイドラインに示された方法以外の系で試験を行った場合は、十分な評価試験結果に基づき、カットオフ値を決める必要がある。

明らかに陰性または陽性の結果が得られた場合は、光毒性の有無に関する確認試験を行う必要はない。明確に陰性、陽性が結論づけられない場合は、濃度の幅や前培養時間や照射量を変えるなど、適切な条件下で確認試験を行う。

注：EU/COLIPA が実施したバリデーションでは、1 回目、2 回目ともに試験方法はほぼ同じであるが、2 回目は評価基準として、PIF だけでなく、濃度依存性を考慮した MPE の値を評価の基準に加えた。

A. 照射、非照射それぞれの IC50 値を算出し、その比である  $PIF = IC50(-UV) / IC50(+UV)$  が 5 より大きい場合に陽性と判定する。

B. 照射下で細胞毒性があり非照射下で細胞毒性が弱く IC50 値を求められない場合、結果は陽性であるが、">factor" の形で表す。

C. 照射、非照射ともに試験した最高濃度で細胞毒性がない場合、陰性と判定する。

\* MPE 値： IC50 値が求められないような場合でも使える。MPE は非照射と照射における濃度依存曲線に共通な濃度域から濃度を選んで比較する方法である。第 i 番目の濃度(Ci)における光効果(photo effect: PEi) は濃度効果(concentration effect: CEi) と反応効果(response effect: REi) から得られる。MPE はすべての PEi 値の平均から得られる。MPE = 0.1 が cut-off 値となる。

### 5-1-11) 結果の報告

被験物質の処理群、陰性および陽性対照群について、測定した各ウェルの吸光度、吸光度の平均、相対生存率、用量作用曲線、IC50 値を表示する。非照射下の IC50 値と照射下の IC50 値の比である PIF 値が求められる場合は算出する。または照射下、非照射下で得られたそれぞれの用量作用曲線を比較し、MPE を求める。

注：バリデーションスタディおよび OECD のガイドライン案では、化学物質の光毒性作用に対し IC50 値をもとめ、それを基準に PIF 値を出し、PIF 値により光毒性を評価している。加えて、光存在下と非存在下での生存率に関する用量依存曲線から、MPE 値を求め光毒性の評価を行っている。この推奨試験法でもそれに準じて評価を行うこととした。

### 5-2) 試験法プロトコールの精密度と完全性

ここで推奨する方法では、重要な点は押えつつ、かなり自由度を持たせて記載した。先にも記載したように、本試験で結果に大きな影響を及ぼす可能性のある要因（光源の種類や照射線量、細胞の UV 感受性の問題）があり、実施施設の条件下での背景データを保持していないと、得られた結果を正当に評価できない。従って、必ずそれぞれの施設での背景データを保有しておくことが重要である。

### 5-3) 本試験系の限界

この試験系は動物を用いる光毒性試験の代替法として開発され、評価が行われてきた。その結果、動物で得られる結果と極めて相関性が高く、簡便で再現性も高いことから、代替法として推奨されている。



しかしながら、限界として幾つかの問題点が挙げられる。第一に、この方法は薬物代謝の系、すなわち代謝活性化の系が組み込めない事である。その理由として S9mix による光の吸収・散乱や補酵素による光の吸収や蛍光による妨害があげられる。一般的な培養細胞の系の限界ではあるが、培養液に溶解しない化学物質に関しては、毒性を適正に調べることができない場合がある。また得られた結果から、光毒性があると判定された場合、その原因として、単純に細胞の傷害だけでなく、光毒性に派生する DNA に対する傷害や光発がん、光アレルギーなどについて、メカニズムに特定した更なる試験を実施しなくてはならない。また、光毒性物質を使用する際の適切な使用用量・濃度については in vivo 試験で確認する必要がある。一方、試験を実施する立場から、通常の培養装置だけでなく、太陽類似光線を光源とする照射装置が必要である事もネックになる。そして、用いる光源の種類によって、生物反応が変わってくる事も大きな問題点である。

また、現時点では本試験系に S9 mix 添加による代謝活性化系を適用できないことから、体内での代謝を経て光毒性物質に変換されるような物質の評価はできない可能性がある。

#### 5-4) 結論

動物を用いる光毒性試験の代替法の候補として、数多くの方法が開発されているが、ここで推奨した培養細胞を用いる試験方法は、1994 年に EU/COLIPA 主催で多施設によるバリデーションがスタートし、十分な評価がなされてきた唯一の方法を基本としている。この基本となった in vitro 光毒性試験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。但し、得られた結果は、hazard identification に関するものであり、in vivo での用量作用性を示すものではないことに留意する必要がある。なお、光アレルギー性物質のスクリーニングにおける本方法の有用性は確認されていない。また、メカニズムに関する情報をもたらすことを直接の目的とするものではない。EU/COLIPA のバリデーション結果を踏まえ、現在 OECD のガイドライン作成も進行中の段階であることから、ここではあえて OECD のガイドライン案に抵触しない範囲で、なるべく自由度を持たせ、試験を実施できるような推奨プロトコルを記載したが、OECD 法と異なる試験プロトコルを採用した場合は別途その妥当性をバリデーションで確認しておく必要がある。

# 第 6 章

## ま と め

## 第6章 まとめ

担当：大野泰雄

文献的情報および ZEBET より提供された個別データに基づいて光毒性試験とその代替法について調査した。その結果は以下のように要約できる。

### 6-1) 動物での光毒性試験について

in vivo で光毒性を評価する方法については、かなり古くから研究がなされてきたが、ガイドラインとして正式に認められたものは未だ存在していない。この理由としては動物愛護運動への配慮もあるが、古くから様々な試験法が検討されてきたため、一つの試験法に集約すること、もしくは一つの試験法を選択することが困難なためと考えられる。しかし、経皮投与による試験法についてはモルモットを用いた森川らの方法(1975)を基礎とした方法が化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブックに記載され、化粧品および化粧品原料の光毒性評価に広く用いられており、大卒のコンセンサスが得られていると考えられる。動物を用いる最新の光毒性評価法としては OECD ガイドライン案が提案されている。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。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。これらの方法は、施設内の再現性は高いと考えられるが、試験法の施設間バリデーションは実施されていないため、施設間の再現性については考察できない。また、ヒトと動物との結果の対応性に関する情報は充分とは言えず、in vivo 光毒性試験について false positive や false negative の頻度についての考察は困難である。

### 6-2) In vitro 光毒性試験一般について

in vitro で光毒性を評価する方法には単層培養細胞を用いる方法や培養皮膚モデルを用いる方法、溶血性試験、蛋白変成試験など様々な方法が試みられている。しかし、施設間バリデーションが実施されたものは 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)のみである。この方法は 96 ウェルプレートに播種した Balb/c 3T3 細胞を被験物質で 60 分間前処理後、50 分間光照射した後、新鮮な培地に交換し、更に 24 時間培養した後、ニュートラルレッド取り込み法により細胞毒性を検討するものである。一般に、この 3T3-NR 法には次のような長所および短所があげられる。

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。

短所：

- i) 太陽類似光の光源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っており、エネルギー値のみで照射条件を設定することは危険である。
- iii) 緩衝液に溶けないような被験物質については、正確なデータを得にくい可能性がある。
- iv) 現時点では代謝活性化の過程を含む光毒性試験が組めない。
- v) 光毒性の有無を定性的に判断するための試験系であり、生体での用量・濃度反応関係については必ずしも評価できない。

### 6-3) 3T3-NR 法の施設間バリデーションについての Spielmann らの報告結果について

#### 6-3-1) バリデーションデータの質について

3T3-NR 法についての EU/COLIPA による施設間バリデーションの報告データの信頼性について Spielmann らの文献報告から検討した。その結果、比較的データの質に関する情報が記述されていた Phase II 試験の報告を除き、OECD で示された代替法のバリデーション基準(1996)を満足しているか否かを判断するために必要な情報が十分に提供されているとは言えなかった。なお、文献レベルでのバリデーション研究の質を評価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記載されているかをチェックするためのチェックリストを作成した。もちろん、こ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には限界がある。別途、詳細なバリデーションデータ情報を入手して再評価する必要があると考えた。そこで、Dr Spielmann に依頼して、バリデーションデータを手し、個別データのレベルから論文データの質を検討した。その結果、論文データの裏付け、用量作用曲線の検討、及び評価結果の施設間のバラツキに関する基礎データを得ることができた（補足1）。

#### 6-3-2) 被験物質の選択について

評価の対象となった被験物質数は 44 化学物質であり、in vivo での光毒性の有無が明らかで