

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/c 3T3, 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, 2001 より引用)

4-2) Balb/c 3T3 細胞を用い、Neutral red 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: 田中憲穂

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、Crystal violet 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 (Ohno *et al.*, 1998a, 1998b, 1998c, Omori *et al.*, 1998a, 1998b, Tanaka *et al.*, 1998, Itagaki *et al.*, 1998a, 1998b) においては、Neutral red の細胞内取り込みを指標とする細胞毒

性試験法（NR 法）は比較的感度が高く、安定した結果が得られる試験法であると評価した。NR 法は、Borenfreund と Puerner によって報告（Borenfreund *et al.*, 1985）された試験法で、生細胞では赤色素 Neutral red 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 主催）が実施され（Spielman 1994, 1998a, 1998b）、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た。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、Neutral red 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 日という短時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。

引用文献

Ohno, T., Asakura, M., Awago, T., Futamura, Y., Harihara, A., Hatao, M., Hattori, C., Hayasaka, A., Hayashi, M., Yahashi, T., Hirata, Z., Hori, H., Hoshi, H., Imai, K.,

- Imazeki, I., Ishibashi, T., Itagaki, H., Iwata, T., Kakuma, M., Kaneda, S., Kato, I., Kato, M., Kawahatsu, T., Kawakami, A., Kazama, A., Kido, A., Kimura, S., Kitazawa, M., Kogiso, S., Kojima, H., Kotani, M., Kuramochi, M., Maki, D., Matsuda, M., Mitsuoka, C., Miyazaki, S., Mizuno, F., Mori, M., Morimoto, K., Moriysu, M., Nakajima, K., Nakajima, M., Nakamura, M., Nakamura, M., Nakano, N., Nakamura, S., Inegami, A., Nishino, M., Nishitomi, T., Ohkoshi, K., Okamoto, Y., Omori, T., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saijo, K., Sano, Y., Saotome, K., Sasaki, K., Sasaki, T., Sato, H., Sato, S., Shimada, H., Shimogo, S., Shimono, K., Shionoya, H., Sugawara, H., Sugiki, Y., Sugimoto, S., Sugimoto, S., Suzuki, J., Takagaki, K., Takahashi, K., Takizawa, M., Tamaki, C., Tanaka, N., Taniya, J., Teramoto, N., Torishima, H., Tsuchiya, T., Uejima, M., Ueno, H., Ugai, Y., Wada, S., Wakuri, S., Wang, X., Watanabe, I., Watanabe, M., Yajima, S., Yamagata, Y., Yamaguchi, Y., Yamakita, O., Yamamoto, R., Yoshida, M., Yoshimura, I., Yuhki, K., Yukiya, Y. (1998a) 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.
- Omori, T., Saijo, K., Kato, M., Itagaki, H., Hayashi, M., Miyazaki, S., Ohno, T., Sugawara, H., Teramoto, N., Tanaka, N., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (1998a) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-II. Stastical Analysis, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 39-58.
- Omori, T., Saijo, K., Kato, M., Itagaki, H., Hayashi, M., Miyazaki, S., Ohno, T., Sugawara, H., Teramoto, T., Tanaka, T., Wakuri, S., and Yoshimura, I. (1998b) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-III. Quality of Collected Data Files, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 59-73.
- Tanaka, T., Asakura, M., Hattori, C., Hayasaka, A., Hayashi, M., Yahashi, T., Hori, H., Hoshi, H., Imazeki, I., Ishibashi, T., Itagaki, H., Kakuma, M., Kaneda, S., Kato, M., Kawakami, A., Kido, A., Kitazawa, M., Kojima, H., Maki, D., Mitsuoka, C., Miyazaki, S., Mizuno, F., Moriysu, M., Nakajima, M., Nakano, N., Nakamura, S., Nishitomi, T., Ohno, T., Omori, M., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saijo, K., Sasaki, T., Sato, H., Sato, S., Shimada, H., Shimono, K., Sugawara, H., Sugiki, Y., Sugimoto, S., Sugimoto, S., Suzuki, J., Takahashi, K., Takizawa, M., Taniya, J., Teramoto, N., Tsuchiya, T., Uejima, M., Ueno, H., Ugai, Y., Wakuri, S., Wang, X., Yoshida, M., Yoshimura, I. and Yuhki, K. (1998) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-IV. Details of the Colony Formation Assay, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 74-86.
- Itagaki, H., Ohno, T., Hatao, M., Hayashi, M., Imazeki, I., Kakuma, M., Kato, M., Kawakami, A., Kimura, S., Kojima, H., Kotani, M., Kuramochi, M., Maki, D., Mitsuoka, C., Miyazaki, S., Moriysu, M., Nakano, N., Nakamura, S., Omori, T., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saijo, K., Saotome, K., Sasaki, T., Sato, H., Sato, S., Shimogo, S., Sugawara, H., Sugimoto, S., Suzuki, J., Takizawa, M., Tanaka, N., Teramoto, N., Wakuri, S., Wang, X., Yajima, S., Yamaguchi, Y. and Yoshimura, I. (1998a) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-V. Details of the Crystal Violet Staining Assay, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 87-98.
- Ohno, T., Futamura, Y., Harihara, A., Hatao, M., Hayashi, M., Hirata, Z., Imai, K., Itagaki, H., Kato, M., Kawahatsu, T., Kogiso, S., Miyazaki, S., Nakamura, M., Nakamura, M., Omori, T., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saijo, K., Sano, Y., Sasaki, K., Sasaki, T., Sato, S., Shimogo, S., Shionoya, H., Sugawara, H., Takagaki, K., Tamaki, C., Tanaka, N., Teramoto, N., Wada, S., Wakuri, S., Wang, X. and Yoshimura, I. (1998b) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-VI. Details of the LDH Release Assay, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 99-118.

- Itagaki, H., Ohno, T., Hatao, M., Hattori, C., Hayasaka, A., Hayashi, M., Hori, H., Imai, K., Imazeki, I., Ishibashi, T., Kakuma, M., Kato, M., Kawakami, A., Kitazawa, M., Kogiso, S., Miyazaki, S., Mori, M., Nakajima, K., Nakajima, M., Nakamura, M., Omori, T., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saiji, K., Sano, Y., Sasaki, T., Sato, S., Shimada, H., Shimogo, S., Sugawara, H., Sugimoto, S., Takizawa, M., Tamaki, C., Tanaka, N., Teramoto, N., Tsuchiya, T., Ueno, H., Ugai, Y., Wada, S., Wakuri, S., Wang, X., Watanabe, I., Yamakita, O., Yoshida, M., Yoshimura, I. and Yukiya, S. (1998b) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-VII. Details of the MTT Assay, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 119-130.
- Ohno, T., Futamura, Y., Harihara, A., Hatao, M., Hayasaka, A., Hayashi, M., Hirata, Z., Imazeki, I., Itagaki, H., Iwata, T., Kakuma, M., Kato, I., Kato, M., Kawakami, A., Kazama, A., Kido, A., Maki, D., Matsuda, M., Mitsuoka, C., Miyazaki, S., Mizuno, F., Mori, M., Morimoto, K., Moriysu, M., Nakajima, K., Nakamura, M., Nakano, N., Nishitomi, T., Ohkoshi, K., Okamoto, Y., Omori, T., Ono, H., Ono, M., Osanai, Y., Saiji, K., Sasaki, K., Sasaki, T., Sato, S., Shimogo, S., Shionoya, H., Sugawara, H., Sugimoto, S., Takagaki, K., Takizawa, M., Tanaka, N., Teramoto, N., Torishima, H., Tsuchiya, T., Wada, S., Wakuri, S., Wang, X., Watanabe, I., Ymagata, Y., Yamakita, O., Yamamoto, R., Yoshimura, I. and Yukiya, S. (1998c) Validation Study of Five Cytotoxicity Assays by JSAAE-VIII. Details of the Neutral Red Uptake Assay, *Altern. Animal Test. Experiment.*, 5, 87-98.
- Borenfreund, E. and Puerner J.A. (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red, *Toxicol Lett.*, 24, 119-24
- Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G. L., Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T. F., Moldenhauer, F., Moore, L., Papa, W.J.W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994) EEC/COLIPA Project on *In Vitro* Phototoxicity Testing : First Results Obtained with a BALB/c 3T3 Cell Phototoxicity Assay, *Toxicology in Vitro*, 8, 793-796.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Papa, W.J., Pechovitch, G., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, R., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J.M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W. and Brantom, P. (1998a) 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.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Papa, W.J., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W. and Pfannenbecker, U. (1998b) 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) バリデーションデータの評価（バリデーションとしての妥当性、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