Altern. Animal Test. EXperiment. 10 (2), 120- 125 (2004)

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被験物質による細胞毒性を検出し、それらの毒性を比較することよって、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Neutral red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10L × mol^{-1} × cm^{-1}よりも低い場合、試験は実施しない）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が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ので、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良い）。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良い。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 × 10^4/0.1mL/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良い。

2日目：

Presented by Medical*Online

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(100-200μL)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（100μL）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/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1.67mW/cm^{2}で50分照射する(＝5J/cm^2)一方、非照射群では室温暗所で50分放置する。処理後ウェルを緩衝液（100-200μL）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Neutral red取り込み法による場合は、培養終了2-3時間前に、Neutral red（例：50μg/mL培地を150μL）を加えて生細胞に取り込ませる。培養終了後、Neutral red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）：Etanol（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（540nm）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のバリデーション及び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℃、5-7.5％ CO_2（バリデーションでは7.5％ CO_2）

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10^4cells/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、水銀メタハライドランプであるがキセノンランプを用いてもよい）

照射量：1.7mW/cm^{2}で50分（5J/cm^2）

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ンで示してあれば他の試験条件でも良い。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良い。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を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、Etanol、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、S9 mix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

Presented by Medical*Online

など）は、試験結果に影響を及ぼす可能性があるので注意する。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、5mg/mLまたは10mM（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ので、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ウエル使用していた（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点以上はいっていない場合は、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$10L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$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1000μg/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/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でCPZを使用する場合は、照射下でのIC50値＝0.1-2.0μg/mL、非照射下でのIC50値＝7.0-90μg/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。

Presented by Medical*Online

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：CPZ を使用する。この試験条件下では照射下での IC50 値は 0.1-2μg/mL, 非照射下での IC50 値は 7.0-90.0μg/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。照射量を決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、陰性の明らか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こり得ることから、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。

① EU/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 OECD のガイドライン案に従い Neutral red 法を用いる。Neutral red 法以外にも、MTT 法、Crystal violet 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 Neutral red 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

Presented by Medical*Online

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。

Presented by Medical*Online

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事から、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S9 mix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ールを記載したが、OECD法と異なる試験プロトコー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。

Presented by Medical*Online