Altern. Animal Test. EXperiment. 10 (2), 143- 157 (2004)

ZEBET/ECVAM/COLIPA SOP
In Vitro 3T3 NRU phototoxicity Test

目次

1 序 …… 144
2 原理 …… 144
3 基本的操作法 …… 144
4 試験材料 …… 144
4.1 細胞株 144
4.2 器材 144
4.3 試薬、培養液、血清 145
4.4 調製 145
4.4.1 培養液 145
4.4.2 Neutral Red（NR）保存液 146
4.4.3 Neutral Red（NR）溶液 146
4.4.4 Ethanol / 酢酸溶液（Neutral Red Desorb） 146
4.4.5 被験物質の調製 146
5 実験方法 …… 147
5.1 太陽光シミュレーターのキャリブレーション 147
5.2 細胞の品質チェック：UVA 感受性 148
5.3 試験系の質チェック（I）：陽性対照 148
5.4 試験系の質チェック（II）：陰性対照 148
5.5 被験物質濃度 148
5.5.1 用量探索試験 148
5.5.2 主試験 149
5.6 試験操作（付録 A 参照） 149
6 データ解析 …… 150
6.1 PIF（7.1）計算のための EC50 値の測定 150
6.2 MPE（7.2）計算のための濃度・反応曲線の比較 150
7 予測モデル（prediction model） …… 150
7.1 Photo-inhibition factor（PIF）に基づく予測モデルの従来法 150
7.2 MEAN PHOTO EFFECT（MPE）に基づく予測モデルの改良法 151
8 引用文献 …… 152
9 付録 A NRU PT TEST：フローチャート …… 154
10 付録 B 96- ウェルプレートの構成 …… 155
11 付録 C 細胞の維持と培養操作法 …… 156
11.1 BALB/C 3T3 細胞のルーチン培養法 156
11.2 細胞数の計数 156
11.3 二次培養 156
11.4 凍結法 156
11.5 融解法 156
12 付録 D 小数幾何級数濃度系列 …… 156
13 付録 E 溶媒選択方法 ……

1 序

今回の *in vitro* 試験プロトコールは COLIPA の作業グループ "*In vitro* 光刺激性" が ECVAM および ZEBET と協力し、EU/COLIPA の *in vitro* 光毒性試験バリデーションプロジェクトの枠組みのなかで作成した。基となる試験デザインは 1991 年にハンブルクの Beiersdorf AG で開発された。最初の SOP は 1992 年にベルリンの ZEBET により起案され、参加研究室の承認後、EU/COLIPA の合同イニシアチブでのプレバリデーションを通じて、テストされた。SOP は改良された後、1994 年に再び承認され、INVITTOX Protocol No. 78, として整理され、正式なバリデーションにより再びテストされた。バリデーションを通じて得られた経験を基に、SOP は 1997 年に更度改善された。試験プロトコールに加え、今回の版では溶媒使用の基準（strategy）と被験物質の最高濃度についての助言が含まれている。この SOP は" ECVAM Special Study 1997"，においても使用され、予知モデル（prediction model）に関する 2 つの方法が適用され、成功した。

2 原理

この SOP において光毒性（光刺激性）とは皮膚が特定の化学物質による初めて曝露とそれに引き続く光曝露によって誘起される毒性応答、あるいは化学物質の全身投与後に皮膚への照射によって同じように誘起される毒性応答と定義される (Spielmann *et al.*, 1994c)。

ここで示す方法はマウス線維芽細胞由来の細胞株である Balb/c 3T3 細胞を用いた *in vitro* の細胞毒性試験を応用して、化学物質の光毒性を検出するようにデザインされた。本試験法の原理は細胞毒性を起こさないようなレベルで光照射を行い、その有無の間での化学物質の細胞毒性を比較することにある。細胞毒性は処置 1 日後に細胞の生存率を示す色素、Neutral Red の取り込み（Borenfreund & Pruener 1985）を測定し、その濃度依存的な減少として示される。

3 基本的操作法

Balb/c 3T3 細胞を 24 時間培養し、単層を形成させる。二つの 96 ウェルプレートを用い、1 被験物質あたり 8 段階の濃度勾配の化学物質とともに 1 時間培養する。一つのプレートに 5J/cm² の UVA（＋ UV experiment）を照射する。一方、他のプレートは暗下に置く（－ UV experiment）。次いで、処置液を培養液に置換し、24 時間培養後に細胞の生細胞率を 3 時間の Neutral Red 取り込み法で測定する。8 段階の濃度系列のそれぞれについて得られた生細胞率を無処置対照群と比較し、阻害％を計算する。光毒性の予知のためには光照射の有無による濃度－反応関係を、通常 EC50 値、つまり無処置対照の生細胞率を 50％阻害する濃度で比較する。

4 試験材料

4.1 細胞株

Balb/c 3T3 cells, clone 31. 例えば . ECACC # # 86110401
European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 OJG, UK
註：ATCC Balb/c 3T3, Clone 31, 163 CCL は EU/COLIPA のバリデーション研究および ECVAM の" Special Study において同等の結果が得られた。
註：UV- 感受性はエイジングとともに増加することから、低継代数（＜ 100）の細胞を播種・凍結保存しておくことにより、十分な量の細胞ストックを作成しておくべきである。

4.2 器材

・UV- 太陽光シミュレータ，型式 SOL-500（Dr. Hönle, D-82152 Planegg）

・UVA- メータ , 型式 No. 37（Dr. Hönle, D-82152 Planegg）
・フィルター , 型式 H1（Dr. Hönle, D-82152 Planegg）
・SOL-500 固定器（可動で三脚式のように安定なもので、適切なもの）
・インキュベータ（37℃ , 加湿 , 7.5% CO_2/ 空気）
・クリーンベンチ（基準：Laminar flow でバイオハザード対応レベル）
・水浴バス（37℃）
・位相差顕微鏡
・実験室用バーナー
・遠心器（なるべくマイクロタイタープレート用のロータを備えたもの）
・実験室用秤量器
・96- ウェル用光度計（540nm フィルター装着）
・マイクロタイタープレート用振とう器
・細胞計数器あるいは血球計算板
・ピペットエイド
・ピペット、8 チャンネルピペット、希釈用ブロック
・冷凍保存用チューブ
・組織培養フラスコ（80cm²）またはペトリ皿
・96- ウェルマイクロタイタープレート（例 . Nunc, # 167 008）

4.3 試薬、培養液、血清
・L-Glutamine を含まない Dulbecco's Modification of Eagle's Medium（DMEM）（ICN-Flow, Cat. No. 12-332-54）
・L-Glutamine 200mM（e.g. ICN-Flow, # 16-801-49）
・新生牛血清（NBCS）（例：.Biochrom, # SO 125）
　註：NBCS にはロット差があることから、その 3T3 細胞の生育刺激活性をチェックし、倍化時間が 20-25 時間となるものを十分量確保する。
・Trypsine/EDTA s 溶液（例 . ICN-Flow, # 16891-49）
・Phosphate buffered saline（PBS）
　Ca^{++}および Mg^{++}を含まない（トリプシン処置のため）
・食塩リン酸緩衝液（PBS）
　Ca^{++} and Mg^{++}を含有（化学物質の処理輸液）
・Earle's Balanced 塩類溶液（EBSS）
　phenol red を含まない（例 . ICN-Flow, # .18-002-54）
・Penicillin/Streptomycin 輸液（例 . ICN-Flow, # 16-700-49）
・Neutral Red
・DMSO（分析用）
・Ethanol（分析用）
・氷酢酸（分析用）
・細胞培養に適した蒸留水あるいは精製水

4.4 調製
註：全ての溶液（Neutral Red 保存液、Neutral Red 溶液および Neutral Red Desorb を除く）, ガラス器具等は滅菌したものを用いる。また、全ての実験操作は無菌的に laminar flow cabinet（生物学的ハザード）の無菌環境で遂行する。

4.4.1 培養液
DMEM（炭酸水素ナトリウムで緩衝）に以下の薬剤を補填：（DMEM 溶液中での最終濃度を現す）

(A) 通常の培養用

10% NBCS
4mM Glutamine
100IU Penicillin
100μg/mL Streptomycin

(B) 凍結用

20% NBCS
7-10% DMSO

(C) Neutral Red 溶液用

10% NBCS
4mM Glutamine
100IU Penicillin
100μg/mL Streptomycin

完成液は4℃で保管する。保管期間は2週間以内。

4.4.2 Neutral Red (NR) 保存液

0.4g　Neutral Red 色素
100mL　H_2O

用事調製。保存は室温・暗下2ヶ月以内。

4.4.3 Neutral Red (NR) 溶液

1mL Neutral Red 保存液
79mL DMEM

NR 溶液は37℃で一晩インキュベートし、細胞に加える前に600×gで10分間遠心し、NR の結晶を除く。但し、その他の方法(例えば Millipore による濾過)でも NR 溶液から結晶を完全に除くことができるならば使用しても構わない。

4.4.4 Ethanol/Acetic Acid 溶液 (Neutral Red Desorb)

1%氷酢酸水溶液
50% Ethanol
49% H_2O

用事調製、1時間以上保管しない。

4.4.5 被験物質の調製

細胞の被験物質への暴露と引き続く光照射は緩衝液中で行う。これは上記の処置液は蛋白質と pH 指示薬を含んでいないことによる。被験物質は EBSS あるいは PBS に溶解する。被験物質の最終最高濃度は100μg/mL をこえない(Spielmann *et al.* 1998)。

被験物質の溶解性はアッセイの前に評価し、最適溶媒、つまり、保存液を EBSS, PBS あるいは organic solvent で作成するか否かを決めておく。溶解性の予備試験のために付録 E に示した段階的な方法を使用することが薦められる。

・水で 100μg/mL まで溶解可能な被験物質は滅菌し、事前に暖めた（37℃）EBSS あるいは PBS に溶解する。
・水溶性が低い（＜0.1mg/mL）被験物質は Dimethyl sulfoxide（DMSO）で最終希望濃度の 100 倍に溶解させる。エタノール（ETOH）は第三オプションの溶液と考えられる。溶媒は陰性対照およびすべての被験物質の濃度勾配（8 段階）において一定量 1%（v/v）とする。つまり、被験物質は DMSO あるいは ETOH に溶解し、この保存液 1 容量を 99 容量の加温（37℃）EBSS または PBS に混ぜる。

被験物質の最高濃度における pH を測定する。強酸、強塩基は EBSS or PBS の緩衝能に影響する可能性があることから、それらは 0.1N NaOH or 0.1N HCl で中和しておく。この場合、化学物質の最高濃度溶液を必要な量の約 80%の EBSS/PBS で調製し、pH を測定し、中和し、その後 EBSS あるいは PBS を加え、最終容量にする。

溶解補助のために、必要な場合には、Vortex での攪拌と超音波処理、あるいは 37℃での加温を行う。比較的不溶性の化学物質における濃度は溶解可能な濃度から沈殿生成濃度の間とする。

被験物質は使用直前に調製した新鮮なもので無くてはならない。もし、急速に光分解すると思われる場合においては、赤色光下での調製が必要である。

5 実験方法

5.1 太陽光シミュレーターのキャリブレーション

SOL-500 は個々の光毒性試験を行う前に下に示した方法でキャリブレーションすべきである。

1. H1-filter を装着した SOL-500 を暴露距離の微細な調節の可能な、適切な安定な三脚に取り付ける。
2. SOL-500 を約 60Cm の距離に調整する。
3. 同じシリアル番号の UVA センサーを備え、キャリブレートした UV radiometer（Dr. Hönle # 0037）を用いて照射量を測定する。
4. UVA 照射量が 1.7mW/cm²（照射用量：1J/cm²/10 分暴露）になるように SOL-500 の距離を詳細に合わせる。暴露するプレートの数に応じて照射分布が均一になるように暴露域をチェックする：1.6-1.8mW/cm² の範囲が許容される。もし、プレートの位置を高低間で照射の半分の時間（25 分）で交換するならば、最大で 1.5-1.9mW/cm² の差でも許容される。

註：EU/COLIPA においては太陽光シミュレーター SOL-3（Dr. Hönle）を SOL-500 の代わりに用いてうまくいった。SOL-3 と SOL-500 のスペクトルは 550nm まで短波長ではほとんど同じである。可視光のより長波長側（＞550nm-700nm）では SOL-500 の照射量は低下する。一方、SOL-3 の照射量は同じレベルで維持される。
註：新しい金属水銀ハライドバーナーの発光スペクトルを安定化させるためには、最初に使用する前に 100 時間燃焼させるべきである。
註：UV 照射量測定装置の 9V 電池が十分な容量を持つことを確認すべきである。電池が弱いと警告表示無しに読みとり値の正確差に影響する。
註：UV 照射量測定装置が予想外の結果を示す場合においては、バーナーの寿命が来ているか、あるいは UV 照射量測定装置がいくつかの理由により、脱キャリブレートしてしまったことによる。この場合、日常使用せず、暗下に保管した同じ型の

UV 照射量測定装置をクロスチェックのために使用すべきである。

5.2 細胞の品質チェック：UVA 感受性

註：3T3 NRU PT 試験を最初に立ち上げる時には 3T3 細胞の UV 感受性をチェックしておくことが最も重要である。一度確立した後では、UV 感受性のチェックを定期的に、例えば、6 ヶ月毎に行うことで十分である。

ウェルあたり 1 × 10^4 cells/100μL の細胞を入れた 10 ヶのマイクロタイタープレートを準備し、一晩生育させる。次の日、溶液を EBSS または PBS に換える。一つのプレートを室温・暗下に置き、他の 9plate に 1.7mW/cm^2 UVA を照射する。最初のプレートを 10 分（＝ 1J/cm^2），二番目を 20 分（＝ 2J/cm^2）等、9 番目のプレートまで。EBSS または PBS を DMEM に換え、全てのプレートを更に一晩インキュベート。9 プレートのそれぞれについて細胞の viability を NRU 取り込み法で 5.6 章の方法に従って測定し、暗下においた対照プレート（＝ 100％）のそれと比較する。UVA の用量と viability の関係をプロットする。

UVA 用量 5J/cm^2（光毒性試験で用いる UVA 用量）で照射後の細胞が非照射の少なくとも 80％であるとき、細胞は合格基準を満たしたとする。また、9J/cm^2 での viability は 50％を超えない。

5.3 試験系の質チェック（I）：陽性対照

Chlorpromazine（CPZ）を陽性対照として、二つのプレート上で 5.6 で示した方法に従い、被試験物質と同時に、フルスケールの光毒性試験において試験する。照射（5J/cm^2）の有（＋ UVA）無（－ UVA）で NRU を測定する：

試験系の合格基準、CPZ の結果が EC50 ＋ UVA が 0.1-2.0μg/mL の間 EC50 － UVA が 7.0-90.0μg/mL の間 二つの EC50 値の比（PIF）が少なくとも 6 以上

5.4 試験系の質チェック（II）：陰性対照

無処置の陰性対照の吸光度の絶対値（OD540 of NRU）がウェルあたり 1 × 10^4 細胞播いた細胞が 2 日間正常のダブリング時間で対数的に増殖していること示しているか否か：

もし、無処置対照群の平均の OD540 が ≥0.3 であるならば、合格基準を満たす。

体系的な誤差をチェックするためには、無処置の陰性対照を 96 ウェルプレートの左側（2 列）および右側（11 列）の両方に置く。（付録 B 参照）：

もし、左右の無処置対照群の値が全ての対照群の平均値から 15％以上異ならなければ試験系は合格基準を満たす（平均± 15％）。

5.5 被験物質濃度

5.5.1 用量探索試験

被験物質の＋ UVA および－ UVA それぞれの 8 段階の濃度を保存液 EBSS/PBS で一定の公比で希釈することにより広い範囲をカバーするように調整する（例、101/2 ＝ 3.16, 付録 D 参照）。

例えば：
1 ⇨⇨ 3.16 ⇨⇨ 10 ⇨⇨ 31.6 ⇨⇨ 100 ⇨⇨ 316 ⇨⇨ 1,000 ⇨⇨ 3,160 μg/mL

5.5.2 主試験

用量探索試験の結果に基づいて推定される濃度－応答カーブの勾配に依存して主試験の濃度系列の希釈係数を小さくする（e.g. $6\sqrt{10} = 1.47$）：非細胞毒性濃度や100％細胞毒性濃度をあまり多く含まず、適切な濃度範囲をカバーするようにする。10％と90％の間の細胞毒性を現す濃度が3つより少ない実験は、可能ならば、より小さな希釈係数を用いて、繰り返すべきである。

5.6 試験操作（付録A参照）

第1日目

凍結保存細胞を増殖後以下の作業を行う

1. 培養液中に 1×10^5/mL の細胞懸濁液を調製する。多チャンネルピペットを用い100μLの培養液を96-well plateの周辺部に入れる（＝blanks）．残りのウェルに100μLの細胞懸濁液（1×10^5 cells/mL（＝ 1×10^4 cells/well）を入れる。一被験物質あたり二つのplateを用意し、それぞれ細胞毒性（－UVA）検討用と光毒性（＋UVA）検討用とする。
2. 単層培養で半コンフルエント状態になるまで、24h（7.5％ $C0_2$, 37℃）培養する。この培養期間に細胞を回復させ、接着させる。

第2日目

1. 培養後培養液をデカントし、EBSS/PBS 150μLで二回洗う。適切な濃度の被験物質を含む100μLのEBSS/PBSを加える。1時間（7.5％ $C0_2$, 37℃）培養する。
2. ＋UVA実験では室温で50min間96-ウェルプレートの蓋を介して1.7mW/cm²（＝5J/cm²）照射する。蓋の下に H_2O の凝集を防止するためにファンで換気する。もう一つのプレート（－UVA）を暗箱中で50分間（＝UVA照射時間）放置。
3. 試験液をデカントしたのち、150μL EBSS/PBSで二回洗う。次いでEBSS/PBSを培養液に交換し、37℃で一晩培養（18-22h）。

第3日目

A）顕微鏡での評価

位相差顕微鏡で細胞を観察し、被験物質の細胞毒性による形態変化を記録する。このチェックは実験的なエラーを避けるために行うものであり、この記録は細胞毒性や光毒性の評価に使用するものではない。

B）Neutral Red取り込み（NRU）の測定

この試験方法はEllen Borenfreund（Borenfreund and Puerner, 1985）の報告に基づくものである。生きている細胞のリソソーム/エンドソームや空胞（vacuoles）へのNeutral Redの取り込みは細胞数やviabilityの定量的な指標として用いられている。

1. 事前に暖めた150μLのEBSS/PBSで細胞を洗う。洗浄液を優しくタッピングすることにより除く。100μL Neutral Red（NR）を加え、37℃の加湿した7.5％ $C0_2$ 気中で3時間インキュベートする。
2. インキュベーション後NR溶液を除き、細胞を150μLのEBSS/PBSで洗う。
3. デカントし、EBSS/PBS液を完全に除く。（プレートを逆置して遠心しても良い。）
4. 正確に150μLのNR Desorb（ethanol/acetic acid）溶液を加える。
5. 速やかにマイクロタイタープレートをNRが細胞から抽出され、一様な溶液となるまで、マイクロタイタープレート振盪器で10分間攪拌する。
6. 得られた着色液の吸光度を540nmのマイクロタイタープレートを用い測定する。その際、ブランクを対照とする。ファイルをStandard ASCII様式で保存する。

6 データ解析

光毒性能力を予測する上でのルール（予測モデル，PM 7 章参照）を適用するためには、濃度と細胞毒性応答カーブを UV 照射の有無（＋ UV と－ UV）において同時に分析する必要がある。PM は二つある。一つは対応する一つの濃度の比較によるもの（PIF, 7.1 章参照）および他の一つは二つのカーブの比較によるもの（MPE, 7.2 参照）である。PIF モデルを適用するために、適切などのような方法でも EC50 値、つまり、細胞の viability を 50％低下させる濃度を計算するために使用することができる。MPE モデルを適用するためには特別のソフトウェアプログラムが必要とされる。

6.1 PIF（7.1）計算のための EC50 値の測定

可能な限り、細胞の viability を 50％抑制する被験物質濃度（EC50）を決める。これは以下のどちらかの方法で行える。

- なんらかの適正な非線形回帰法（Hill function かロジスティック回帰法が望ましい）を濃度－作用データに適用する。EC50 値を用いて更に計算を進める前に回帰曲線がデータにきちんと合っているか否かの程度を適切にチェックする。

または、

- 単純なグラフフィッティング法を用いる。この場合、x 軸を対数スケールとし、y 軸をプロビットスケールとした確率紙を用いるのが望ましい。これは多くの場合、濃度と反応関係はこの変換によりほぼ直線になるからである。

6.2 MPE（7.2）計算のための濃度・反応曲線の比較

改善した MPE 予測モデルで解析するためには特別なソフトウェアを用いなくてはならない。このソフトウェアは Holzhütter（1997）が報告したアルゴリズムを用いている。現在、このソフトウェアは MS Windows 3.x（“PHOTO16”）用のものが入手できる。後に Windows 95（“PHOTO32”）用のものも入手できるようになる。

マイクロプレートリーダーで作成した吸光度（OD_{540}）データファイルは ASCII ファイルとして NRU-PIT2 に導入する。これによりデータは標準的な方法で蓄えられ、単調変化でない曲線（Holzhütter & Quedenau 1995）のために特別に開発された FitGraph 法で濃度－反応曲線にフィットさせられる。更に、このプログラムは対応する（＋ UV）と（－ UV）実験データを比較し、PIF モデルおよび MPE モデルの両方を用いて、光毒性強度を予測する。そして、カットオフ値に近い結果に基づく予測が実験内および実験間のばらつきにより影響されるかについて考慮して毒性の可能性を計算する。

7 予測モデル

註：*in vitro* データから *in vivo* での毒性強度を予測するための数学的規則は予測モデル（Prediction Model：PM）と呼ばれる（詳細は Archer *et al.*, 1997 参照）.

今回の試験においては、UMA 照射の有（＋ UVA）および無（－ UVA）の条件下で同時に得られた二つの濃度作用曲線を比較することにより、光毒性強度の予測が行われている。これは二つの濃度作用曲線上で同じ強さの抑制を現す阻害濃度を比較することにより（オリジナル PM, 7.1 参照）、或いは＋ UV および－ UV の条件下での二つのの濃度作用曲線を同じ濃度で作用を比較することにより（改良 PM, 7.2 参照）実施可能である（改良 PM、7.2 参照）。

7.1 Photo-Irritancy Factor（PIF）に基づく原法

PM は EU/COLIPA のプレバリデーション研究で得られた多施設データに基づき開発され（Spielmann *et al.*, 1994a,b）、正式なバリデーション研究に利用された（Spielmann *et al.*, 1997）. この方法は UVA 照射の有（＋ UV）と無（－ UV）の条件下での同時実験で同じ細胞毒性を起こす化学物質のそれぞれの濃度（EC50 values）

を比較することに基礎をおいている。これらの値から photo-irritancy factor（PIF）を以下のようにして計算する：

(1)　PIF ＝ EC 50（－ UV）/ EC50（＋ UV）

プレバリデーション研究で得られた PIF データの解析から光毒性の識別値として PIF ＝ 5 が示された（Liebsch *et al.*, 1994）. 分類ルールは

PIF ＜ 5：光毒性無し。PIF ≥ 5：光毒性あり

濃度－応答曲線が UV 存在下で対照の 50％以下まで低下した時のみ EC50 values（－ UVA and ＋ UVA）が計算でき、PIF 値を得ることができる。従って、PM は二つの追加の分類ルールを組み入れている。

もし、化学物質が＋ UV でのみ細胞毒性を示し、－ UV では細胞毒性を示さないことは、光毒性の存在を示しているが、この場合、PIF 値を計算できない。このような場合、－ UV での細胞毒性試験を最高濃度まで実行している場合には、その濃度を使用し＞ PIF を計算する。

(2)　＞ PIF ＝ Cmax（－ UV）/ EC50（＋ UV）

“＞ PIF” は正確な数値では無いことから、生物統計学的な手法を適用して最適な識別値を決めることはできない。結果として、分類規則は：

もし “＞ PIF” のみ得られた場合には、どんな値でも＞ 1 ならば、光毒性の存在を示す。

もし、被験物質が最高濃度まで細胞毒性を現さず、EC50（－ UV）と EC50（＋ UV）のいずれも計算できない場合には、光毒性は無いことを意味する。このような場合は、” PIF ＝ *1” をそのような状況を示すのに使用される：

(3)　PIF ＝ *1 ＝ Cmax（－ UV）/ Cmax（＋ UV）

“PIF ＝ *1” は光毒性が無いとする。

註：(2) と (3) の場合到達しえた絶対濃度を考慮する。

7.2 Mean Photo Effect（MPE）に基づく新しく改善された予知モデル

PIF 値を用いる予知モデルの主たる限界は PIF が明と暗の条件下で同等の作用を現す濃度（EC50）の比較に基づくが、この値は常に求まるものでは無いことによる。この限界を克服するために、化学物質の光毒性を評価する新しい方法、mean photo effect（MPE）が最近提案された（Holzhütter, 1997）。これは UV 照射の有無の条件下での二つの用量作用曲線上、同じ被験物質濃度 Ci（i ＝ 1,...,N）での応答値の比較に根拠をおいている。

濃度 Ci における photo effect 値（PEi）は concentration effect 値（CEi）と response effect 値（REi）の積として計算される。mean photo effect（MPE）は全ての PEi 値の平均として得られる。

PIF と類似し、MPE を臨界識別値である MPEc 値と比較することにより、化学物質の光毒性作用を予知するという予知モデルにおいて使用される。識別値 MPEc ＝ 0.1 は FRAME/ ノッチンガム大学の研究所で遂行された EU/COLIPA の研究の phase II で

得られたデータにMPEに基礎をおく予知モデルを始めて適用することにより得られた。この研究では今回と同じデザインだが、使用した細胞は3T3細胞では無く、ヒトケラチノサイトの初代培養細胞である（Holzhütter, 1997）。

MPE	*In vivo* 光毒性のMPE値による予測
＜0.1	光毒性無し
≧0.1	光毒性あり

註：PIFとは異なり、MPEは特別のソフトウェアを使用しなければ誰でも簡単に計算できるものではない。Holzhütter博士による特殊なプログラム"PHOTO16"（for MS Windows 3.11）あるいは"PHOTO32"（for Windows 95）の開発はECVAMとZEBETの資金によるものであり、（今回のバリデーションのためには）無料で供給される。上記のSOPとソフトウェアはZEBETからe-mailを通じて、または3.5インチのフロッピーディスクで入手できる。

Dr. Manfred Liebsch / Dr. Horst Spielmann
BgVV-ZEBET Diedersdorfer Weg 1 12277 Berlin, Germany
（＋49-30-8412-2275 /2270 Fax ＋49-30-8412-2958
e-mail liebsch.zebet@bgvv.de or：zebet@bgvv.de

更に、1998年の間にECVAMはSOPをINVITTOX protocol No.78の改訂版としてインターネットを通じてダウンロードできるよう計画している。

8 引用文献

Anon (1997) Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre, ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997

Archer, G., Balls, M., Bruner, L. H., Curren, R. C., Fentem, J. H., Holzhütter, H. G., Liebsch, M., Lovell, D. and Southee, J. (1997) The nature, relevance and validation of prediction models. ATLA 25, 505-516.

Borenfreund, E. and Puerner, J. A. (1985) Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Letters 24, 119-124.

Holzhütter, H.G. and Quedenau, J. (1995) Mathematical modelling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

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.

INVITTOX (1994) INVITTOX protocol No. 78："3T3 NRU Phototoxicity Assay" INVITTOX Data Bank, Nottingham, UK.

Liebsch, M., Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Doering, B., Dupuis, J., Holzhütter, H. G., Klecak, G., L' Eplattenier, H., Lovell, W. W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W. J. W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., Willshaw, A. (1994). First results of the EC/COLIPA validation project "in vitro phototoxicity testing". In Alternative Methods in Toxicology, Vol. 10：*In vitro* Skin Toxicology - Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Edited by A. Rougier, A. M. Goldberg & H. I. Maibach, Mary Ann Liebert Publ., pp. 243-254, New York.

Nilsson, R., Maurer, T. and Redmont, N. (1993) A standard protocol for phototoxicity testing. Results from an interlaboratory study. Contact Dermatitis 28, 285-290.

OECD ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY DIVISION (1991) Ad hoc meeting on tests for effects on the skin : phototoxicity OECD Publications Office, Paris, France, p. 3.

OECD ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY DIVISION (1995) Acute dermal phototoxicity screening test ; draft proposal for a new guideline. OECD Publications Office, Paris, France, p. 10.

OECD ENVIRONMENTAL HEALTH AND SAFETY DIVISION (1995) Acute dermal phototoxicity dose response test ; draft proposal for a new guideline. OECD Publications Office, Paris, France, p. 10.

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., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W. J. W., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W. and Willshaw, A. (1994a) EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing : first results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxicol. *in vitro* 8, 793-796.

Spielmann, H., Liebsch, M., Döring, B. and Moldenhauer, F. (1994b) Erste Ergebnisse der Validierung von *in vitro* Phototoxizitätstests im Rahmen des EG/COLIPA Projektes. ALTEX (Alternativen zu Tierexperimenten) 19, 22-31.

Spielmann, H.; Lovell, W. W., Hoelzle, E., Johnson, B. E., Maurer, T., Miranda, M. A., Pape, W. J. W., Sapora, O. and Sladowski, D. (1994c) *In vitro* phototoxicity testing. The report and recommendations of ECVAM workshop 2. ATLA 22, 314-348.

Spielmann, H., Liebsch, M., Pape, W. J. W., Balls, M., Dupuis, J., Klecak, G., Lovell, W. W., Maurer, T., De Silva, O. and Steiling, W. (1995) The EEC/COLIPA *in vitro* photoirritancy program : results of the first stage of validation. In Irritant Dermatitis : New clinical and experimental aspects. Edited by P. Elsner & H. I. Maibach, pp. 256-264.

Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W. J. W., Pechovitch, 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 and Brantom, P. (1998) 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., Pape, W. J. W., De Silva, O., Holzhütter, H. G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W. W., Pfannenbecker (1998) A Study on the Phototoxic Potential of UV Filter Chemicals from Annex VII of the EU Directive 76/768/EEC in the 3T3 NRU *In Vitro* Phototoxicity Test. ATLA 26, 679-708

9 付録 A NRU PT 試験：フローチャート

時間(h)	操作
0.00 h	98ウェルプレートに細胞播種： 1x10^4 cells / 100 µl DMEM 培養液/ウェル インキュベート (37 °C / 7.5% CO_2 / 24 h)
	⇩
24.00 h	培養液を除去し、EBSSで一回洗滌
	⇩
24.00 h	8段階濃度系列のEBSSに溶解した被験物質100µl処置 (無処置対照はEBSSのみ添加)
	⇩
24.00 h	インキュベート (37 °C / 7.5% CO_2 / 1 h)
	⇩
25.00 h	光毒性： 室温でUVA 1.67 mW/cmに50 min (= 5 J/cm) 曝露
	細胞毒性： 室温で二つのプレートを暗下で 50min 処置
	⇩
25.50 h	処置溶液を除去し、EBSSで２回洗滌 EBSSを培養液に置き換える インキュベート (37 °C / 7.5% CO_2 / 一夜)
	⇩
48.00 h	形態変化を顕微鏡観察 培養液を除去し、100 µl Neutral Red溶液を添加 インキュベート (37 °C / 7.5% CO_2 / 3 h)
	⇩
51.00 h	Neutral Red溶液を廃棄 150 µl EBSSで一回洗滌 150 µl 固定液 (Ethanol/Acetic Acid溶液)を添加
	⇩
51.40 h	10 minプレートを振とう
	⇩
51.50 h	Neutral Redの吸収を540 nm で測定 (細胞のviability測定)

10 付録 B 96 ウェルプレートの構成

註：下に示したプレートの構成を推奨する。データ解析のために NRU-PIT2 ソフトを使用する場合は正確に以下の構成に従うこと。

註：周辺のウェルでは培養液が揮発することから、これらのウェルは Neutral Red 測定のための光をプレートが吸収する可能性を除去するための補正用ブランクとしてのみ用いることを勧める。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b
B	b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
C	b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
D	b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
E	b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
F	b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
G	b	UC	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	UC	b
H	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b	b

UC ＝無処置対照（viability の平均を 100％とする）

C1 － C8 ＝ 8 濃度段階の被験物質

（C1 ＝最も低濃度 , C8 ＝最も高濃度）

b ＝ブランク（細胞を含まないが、Neutral Red 溶液と NR Desorb 溶液で処置する。

11 付録 C 細胞の維持と培養操作

Balb/c 3T3 細胞の通常の培養においては 80cm² の培養フラスコを用い、加湿 7.5% CO_2 気中、37℃、単層培養で増殖させる。細胞を毎日位相差顕微鏡で観察し、その形態や接着状況に変化があった場合は、どのようなものでも記録する。

11.1 Balb/c 3T3 細胞の通常の培養

細胞がコンフルエントになった時にトリプシン処置によりフラスコから細胞をはがす。

・培養溶液を捨て、培養細胞を Ca^{++}/Mg^{++}を含まない PBS でリンスする。
(25cm² フラスコの場合、約 5mL を用いる)。
・ゆっくりと揺らすことにより細胞を洗い、トリプシンの作用を阻害するかも知れない残留血清を除く。
・洗滌液を捨てる。
・1-2mL Trypsin-EDTA 溶液を数秒かけて単層細胞に加える。
・過剰の Trypsin-EDTA 液を除き、37℃で培養。
・2-3 分後、フラスコを軽くたたき、細胞をはがし、単細胞懸濁液にする。

11.2 細胞の計数

細胞を剥離した後、フラスコ 1cm² あたり 0.1-0.2mL（2.5mL/25cm²）の通常の培養液を加える。緩やかに分散することにより単層細胞を分散する。正確な計数のためには一つずつに分離した細胞懸濁液を得ることが重要である。細胞懸濁液を血球計測器あるいは細胞計数器を用いて計数する。

11.3 二次培養

細胞数を測定した後、培養細胞を他のフラスコで予備培養するか、あるいは 96 ウェルのマイクロプレートに播種する。通常、Balb/c 3T3 細胞は 80cm² フラスコに 1×10^6 cells の密度で 3-4 日毎に継代する（平均倍加時間は 20-24 時間)。
註：細胞毒性試験の為に回収するときは細胞が対数増殖期にあることが重要である。

11.4 凍結

保管用の Balb/c 3T3 は滅菌した、凍結管で液体窒素中に保管する。凍結保護剤としては Dimethyl sulfoxide を用いる。

・トリプシン処理した細胞を 200G で遠心する。
・細胞を通常の 20% NBCS を含む培養液を用い $1\text{-}5 \times 10^6$ cells/mL の濃度で懸濁する。
・冷却した 120-180μL の DMSO を凍結管に入れ、細胞懸濁液を加え 1.8mL にする。
・凍結管を -80℃のフリーザーに 24h 入れる。この場合の冷却速度は 1℃ /min である。
・凍結管を液体窒素中に保管する。

11.5 融解

アンプルを 37℃の水浴に入れて細胞を融解する。この時間はなるべく短くする。

・細胞を再懸濁し、通常の培養液中に細胞を移す。
・加湿 7.5% CO_2 気中 37℃で培養する。
・細胞がフラスコの底に接着した時(4 時間位かかるかも知れない)、上清をデカンテーションで捨て、新鮮な培養液にかえる。上に述べた方法で培養する。
・細胞毒性試験に使用する前に 2 から 3 回継代する。

新たな凍結細胞ロットは 2 ヶ月毎に融解して、作成する。

12 付録 D 小数幾何級数濃度系列

一般に濃度－作用関係は直線的ではない。しかし、X 軸をロガリズム変換することにより、ある程度直線化することができる。EC50 値を回帰線やグラフを用いて計算する場合、通常、この変換が行われる。

もし、用量系列（細胞培養においては濃度系列）を算術的に行うと、X 軸のロガリズム変換の結果、測定点の分布が不均一になる。それ故、幾何級数的濃度系列（一定の希釈係数）を持ちいつ事が勧められる。最も単純な幾何級数系列は倍々系列である（係数 2)。この系列には一連の系列が永遠に変化する連鎖（2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 . . .）であるという欠点がある。少数幾何級系列は Hackenberg & Bartling（1959）により始めて毒性や薬理研究に用いられたもので、個々の実験毎に大小の用量係数を簡単に比較できる利点がある。また、状況によっては、それらを合わせることができる。

用量係数 3.16（＝ $\sqrt[2]{10}$）は区間を 2 つの等しい連鎖に分割する。用量係数 2.15（＝

例

10						31.6						100
10				21.5				46.4				100
10		14.7		21.5		31.6		46.4		68.1		100
10	12.1	14.7	17.8	21.5	26.1	31.6	38.3	46.4	56.2	68.1	82.5	100

$\sqrt[3]{10}$）は 3 つの等しい連鎖に分割する。用量係数 1.47（＝ $\sqrt[6]{10}$）は 6 つの等しい連鎖に分割する。用量係数 1.21（＝ $\sqrt[12]{10}$）は 12 の等しい連鎖に分割する。それ故、データを簡単に生物統計学的に評価するためには、2 倍の級数系列よりも少数幾何級数濃度系列を使用することを勧める。

少数幾何濃度系列を作成するのは極めて簡単である。例としては、希釈系列を 1.47 とした場合：最高濃度の 1 容量に希釈液 0.47 容量を加えて希釈する。平衡に達した後、この溶液の 1 容量に希釈液 0.47 容量を加えて希釈する。など。

引用文献：

Hackenberg, U. & Bartling, ,H. (1959) Arch. exp. Pathol. Pharmacol., 235：427-463