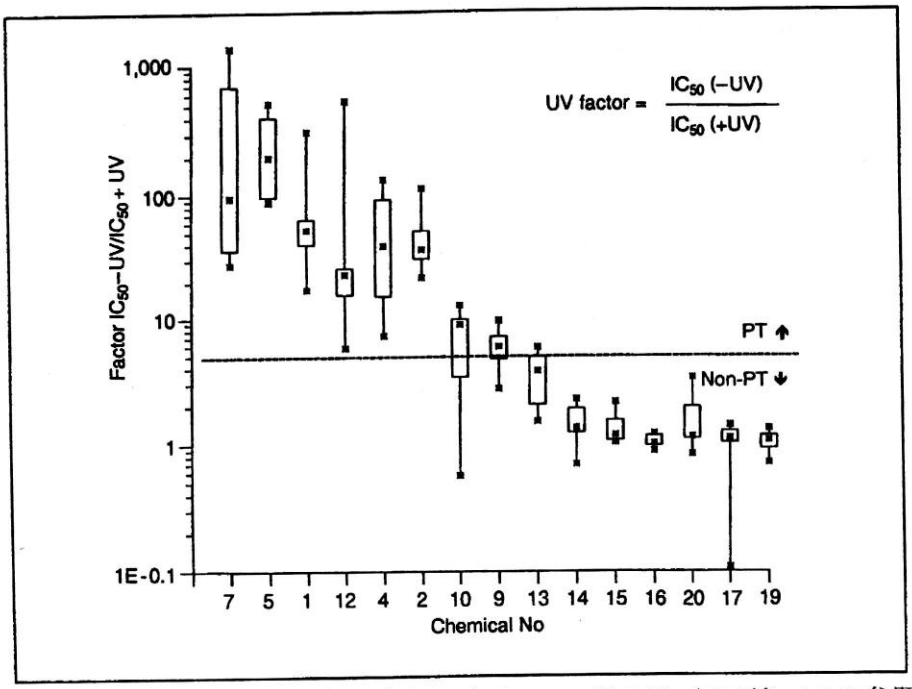

Fig 4-1　3T3-NR 法における光照射の有無による IC50 値の比（PIF 値 , 4-2-3 参照）のバラツキ（H. Spielmann *et al*. 1995）

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て評価する（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（Freeman *et al*.,1970, Lasarow *et al*., 1992, Traynor *et al*., 2000）、keratinocytes（Maier *et al*.,1991, Clothier and Willshaw,1999, Wilhelm *et al*,2001）、

Presented by Medical*Online

hepatocytes（Van Graft and Boot,1996, Colombain *et al.*,2001）、macrophage（Lock and Friend, 1986）、carcinoma 等様々の細胞種（Rosen *et al.*,1997,Vandenbogaerde *et al.*,1997,Morgan wt al., 2000）が利用されているが、fibroblasts、keratinocytes を用いた報告が多い。使用している光源は、主に UVA 又は UVA と可視光の組合せであった。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（Clothier and Willshaw,1999）。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（Vandenbogaerde *et al.*,1997）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、各種細胞を用いた場合でも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（Daniels,1965）が主に用いられている。また、原生動物である *Tetrahymena thermophila*（Misra and Jishi,1999）や *Artemia salina*（brine shrimp）（Ojala *et al.*,1999）等が利用されている。光源は主に 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と報告されている（Ojala *et al.*,1999）。

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（Augustin *et al.*,1997,Edwars *et al.*,1994）。

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 もしくは可視光と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（Kahn and Fleischaker, 1971, Hetherington and Johnson,1984）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もある（Sugiyama *et al.*, 1994a）。

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、γ - 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*

Presented by Medical*Online

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（Lovell,1993）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て報告されている。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て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（Sugiyama *et al.*,1994b）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 又は、UVA と可視光の併用がほとんどであり、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、プレバリーデーションを含むバリデーション評価が実施されたものは、ヒト keratinocytes による試験法（Clotheir and Willshaw,1999）、皮膚モデルを用いた試験法（Edwars *et al.*,1994）、赤血球溶血性試験法（Pape *et al.*,1994,2001）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。

引用文献

Augustin, C., Collombel, C., Damour, O., (1997) Use of dermal equivalent and skin

Presented by Medical*Online

equivalent models for identifying phototoxic compounds *in vitro*, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 13(1-2), 27-36

Barratt, M.D., and Brown, K.R., (1985) Photochemical binding of photoallergens to human serum albumin : A simple *in vitro* methods for screening potential photoallergens, *Toxicol. Lett.* 24, 1-6

Bosca, F., Carganico, G., Castell, J.V., Gomez-Lechon, M.J., Hernandez, D., Mauleon, D., Martinez, L.A., Miranda, M.A., (1995) Evaluation of ketoprofen (R,S and R/S) phototoxicity by a battery of *in vitro* assays, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 31(3), 133-138

Clothier, R., Willshaw, A., (1999) The Use of Human Kerationcytes in the EU/COLIPA Study on UV Filter Chemicals, *ATLA* 27, 247-259

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), 644-646

Daniels, F. J., (1965) A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds, *J. Invest. Dermatol.* 44, 259-263

Edwards, S.M., Donnelly, T.A., Sayra, R.M., and Rheins, L.A., (1994) Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin2TM, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 10, 111-117

Freeman, R.G., Murtishaw, W., Knox, J.M., (1970) Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity, *J. Invest. Dermatol.*, 54(2), 164-169

Hetherington, A.H., and Johnson, B.E., (1984) Photohemolysis, *Photodermatology*, 1, 255-260

Kahn, G., Fleischaker, B.E., (1971) valuation of phototoxicity of salicylanilides and similar compounds by photohemolysis, *J. Invest. Dermatol.*, 56(2), 91-97

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

Lasarow, R.M., Isseroff, R.R., and Gomez, E., (1992) Quantitative *in vitro* assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay, *J. Invest. Dermatol.*, 98, 725-729

Lock, S.O., and Friend, J.V., (1986) Phototoxicity testing *in vitro* : Evaluation of mammalian cell culture techniques, *Food Chem. Toxicol.*, 24, 789-793

Lovell, W.W. and Sanderd, D. J., (1990) Screening test for phototoxins using solutions of simple biochemicals, *Toxicol. in Vitro*, 4, 318-320

Lovell, W.W., (1993) A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential, *Toxicol. in Vitro*, 7, 95-102

Lovell, W.W., Jones, P.A.,(2000) Evaluation of mechanistic *in vitro* tests for the discrimination of photoallergic and photoirritant potential, *ATLA*, 28(5), 707-724

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

Maier, K., Schmitt-Landgraf, R., and Siegemund, B., (1991) Development of an *in vitro* test system with human skin cells for evaluation of phototoxicity, *Toxicol. in Vitro*, 5, 457-461

Misra, R.B., Joshi, P.C., (1999) Phototoxicity evaluation--Tetrahymena thermophila as an alternative model, *Indian J. Exp. Biol.* (8), 750-757

Morgan, J., Potter, W.R., Oseroff, A.R., (2000) Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative, *Photochem. Photobiol.*, 71(6), 747-757.

Presented by Medical*Online

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

Pape, W.J., 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), *ATLA*, 29(2), 145-162

Pape, W.J.W., Brandt, M., and Pfannenbecker, U., (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

Pendlington, R.U., and Barratt, M.D., (1990) Molecular basis of photocontact allergy, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 12, 91-103

Rosen, J.E., Prahalad, A.K., Schluter, G., Chen, D., Williams, G.M., (1997) Quinolone antibiotic photodynamic production of 8-oxo-7, 8-dihydro-2' -deoxyguanosine in cultured liver epithelial cells, *Photochem. Photobiol.*, 65(6), 990-996

Sugiyama, M., Itagaki, H., and Kato, S., (1994b) Photohemolysis test and Yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of chemicals. *In*：*Alternative Methods in Toxicology vol.10, In Vitro Skin Toxicology Irritation, Phototoxicity, Sensitization*, ed by A. Rougier, A.M. Goldberg and H. Maibach, pp. 213-221, Mary Ann Liebert, New York.

Sugiyama, M., Itagaki, H., Hayashi, T., Murakami, N., and Kato, S., (1994a) *In vitro* assay to predict phototoxicity of chemicals：(1) Red blood cell hemolysis assay, *AATEX*, 2, 183-191

Traynor, N.J., Johnson, B.E., and Gibbs, N.K., (1996) Photohaemolysis assay for drugs phototoxicity complicated by ' bleaching ' of released haemoglobin,*Toxicol. in Vitro*, 10, 619-624

Traynor, N.J., Barratt, M.D., Lovell, W.W., Ferguson, J., Gibbs, N.K., (2000) Comparison of an *in vitro* cellular phototoxicity model against controlled clinical trials of fluoroquinolone skin phototoxicity, *Toxicol. In Vitro*, 14(3), 275-83

Vandenbogaerde, A.L., Cuveele, J.F., Proot, P., Himpens, B.E., Merlevede, W.J., de Witte, P.A., (1997) Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 38(2-3), 136-142

Van Graft, M., Boot, J.H., (1996) Photodynamic effects of protoporphyrin on the cellular level-an *in vitro* approach, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 32(7), 394-398

Wilhelm, K.P., Biel, S., Siegers, C.P., (2001) Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of Hypericum perforatum extracts, *Phytomedicine*, 8(4), 306-309

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

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，実験プロトコー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．

Presented by Medical*Online