OECD/OCDE

2004/04/13

試験ガイドライン No.432

In vitro 3T3 NRU 光毒性試験

ご利用に関する注意事項

本文書および本文書に掲載している翻訳は OECD による公式文書**ではありません。**本文書における翻訳と原文の間に用語ないし表現等の齟齬がある場合、**原文のみが有効とみなされます**。内容について疑義が生じた場合、もしくは研究に公的な認証を必要とする場合は、原文に準拠してください。

本翻訳を使用したことに起因する如何なる損害について、当所は一切責任を負いません。

This document and translation are NOT official work by OECD. In the event of any discrepancy between the original work and the translation, **only the text of the original work should be considered valid**. Refer to the original document when there is any doubt about the translation, or legal or official verification is needed for your study. NIHS takes no responsibility even if you get any damage by using this translation.

Original work:

OECD (2004), Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/topics/policy-sub-issues/testing-of-chemicals/previous-test-guidelines/section-4/replaced-test-guidelines/replaced-test-guideline-432-2004.pdf.

©OECD(2004)

You are free to use this material subject to the terms and conditions available at

http://www.oecd.org/termsandconditions/

経済協力開発機構 （OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン Section 4 Health effects
邦訳: 国立医薬品食品衛生研究所(NIHS) 安全性予測評価部

2004 年 4 月 13 日採択

経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン

In vitro 3T3 NRU 光毒性試験

はじめに

1. 光毒性は、体内に投与された物質により、光に連続して暴露した後発現又は増加する（低用量で明らかである）毒性反応、又は物質の全身投与後に皮膚照射により誘発される毒性反応と定義する。

2. *In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験は、光暴露後に励起された化学物質によって誘発される被験物質の光毒性を特定するために行う。試験では光の照射下および非照射下で化学物質に暴露した細胞生存率の相対的な減少により光細胞毒性を評価する。本試験で特定された物質は全身投与による皮膚への分布後、あるいは局所投与後に *in vivo* で光毒性をもたらす可能性がある。

3. 定義は補遺 1 に示す。

最初に考慮すべき事項

4. 多くの種類の化学物質は光毒性作用をもたらすことが報告されている（1）（2）（3）（4）。これらの化学物質には太陽光波長領域で光エネルギーを吸収する特徴がある。光化学第一法則（Grotthaus-Draper の法則）によると、光反応には光量子の十分な吸収が必要である。そこで生物学的試験を考慮する前に、被験物質の UV/可視光線吸収スペクトルを OECD テストガイドライン 101 に従って求める。分子消失／吸収係数が 10 L/mol・cm 未満であれば、化学物質は光反応性がないと考えられる。そのような物質には *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験又は光有害反応を検討する他の生物学的試験を実施する必要がない（1）（5）。補遺 2 を参照のこと。

5. *In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験の信頼性及び妥当性は最近評価された（6）（7）（8）（9）。*In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験は *in vivo* における動物やヒトの急性光毒性を予測するものであり、本試験は化学物質と光の相互作用といった他の有害反応を予測するためにデザインされたものではない。例えば光遺伝毒性、光アレルギー、光発がん性の検討や、光毒性の強さを評価するものではない。さらに、本試験は光毒性の間接的な機序、被験物質の代謝物の作用あるいは混合物の作用を検討するためにデザインされたものでもない。

6. 遺伝毒性及び発がん性の予測には、全ての *in vitro* 試験における代謝系の検討が必須であるが、光毒性では今までのところ、*in vivo* 又は *in vitro* で光毒性として作用するために代謝変換の検討が必要である場合は稀である。すなわち代謝活性系で試験を実施する必要はないと考えられ、科学的な妥当性もない。

試験法の概要

7. *In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験は、非細胞毒性照射量の疑似太陽光を照射した場合としない場合の物質の細胞毒性を比較することに基づいている。本試験の細胞毒性は、被験物質と照射による処理の 24 時間測定した生体染色色素のニュートラルレッド（NR）の濃度依存的な取り込みの減少で表す（10）。NR は非拡散的に細胞膜を通過し、リソソームで細胞内に蓄積する弱陽イオン色素である。感受性のあるリソソーム膜の細胞表面変化は、次第に不可逆的なリソソーム脆性及び他の変化をもたらす。このような生体異物作用による変化から NR 取り込み減少と結合が起きる。つまり本試験の基となる生存細胞、損傷細胞あるいは死亡細胞の区別が可能になる。

8. Balb/c 3T3 細胞は単層形成のため 24 時間培養する。8 濃度の被験物質を用い、被験物質あたり 2 枚の 96 ウェルプレートを 1 時間プレインキュベーションする。その後 2 枚のプレートのうち 1 枚に非細胞毒性の最高照射量を暴露し、もう 1 枚は暗所に置く。両プレートの処理培地を培養培地に代えて、さらに 24 時間インキュベーションしてから NR 取り込みによる細胞生存率を求める。細胞生存率は、無処理溶媒での生存数に対する割合で表し、各被験物質濃度について算出する。光毒性の有無を予測するため、照射の有無別に得た濃度反応を比較する。通常、未処理対照と比較して生存細胞が 50%減少した濃度である IC_{50} 値にて比較する。

試験方法

試験の準備

細胞

9. バリデーション試験では、マウス線維芽細胞の永久株である Balb/c 3T3 のクローン 31 を、米国標準培養コレクション（ATCC）（米国 VA, Manassas）又は欧州細胞培養コレクション（ECACC）（英国 Wiltshire, Salisbury）のいずれかから入手して用いた。したがって、品質保証が確かな保管業者から細胞を求めることが推奨される。細胞に特有の培養条件が適用されるならば、他の細胞又は細胞株を同手順で用いることが可能であるが、同等性を示さなければならない。

10. 細胞は定期的にマイコプラズマ汚染が無いことを確認し、汚染の認められなかったもののみを用いる（11）。

11. 本ガイドラインに記載された品質保証手順に従い、UV 感受性を定期的に検査することは重要である。細胞の UVA 感受性は継代数に伴って増加する可能性があり、最低継代数の Balb/c 3T3 細胞（100 未満が望ましい）を用いること（29 節及び補遺 3 を参照のこと）。

培地および培養条件

12. 適切な培地及びインキュベーション条件を通常の細胞の継代や試験操作で用いる。例えば Balb/c 3T3 細胞では、10%新生子牛血清、4mM グルタミン、ペニシリン（100 IU）およびストレプトマイシン（100 µg/mL）を添加した DMEM（‘ダルベッコ改変イーグル培地）を用い、37℃、緩衝液（17 節を参照）

による 5～7.5% CO_2 にて加湿インキュベーションする。細胞培養条件が、使用する細胞又は細胞株の正常背景データ内の細胞周期を確保していることは特に重要である。

細胞の調製

13. 冷凍保存培養の細胞を適切な密度で培地に播種し、*in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験で用いる前に、少なくとも 1 回継代培養する。

14. 光毒性試験に用いる細胞を適切な密度で培地に播種し、試験終了時（細胞生存率を確認する播種から 48 時間後）にコンフルエント[訳注：細胞がプレート底面全体にわたり緊密に増殖した状態]とならないようにする。Balb/c 3T3 細胞を 96 ウェルプレートで増殖させる場合は、ウェルあたり 1×10^4 細胞の播種密度が推奨される。

15. 各被験物質につき細胞を 2 枚の 96 ウェルプレートに播種する。1 枚は照射下（+Irr）、もう 1 枚は暗所に置く（-Irr）時間以外は同一の培養条件下で全ての試験操作を同時並行で行う。

被験物質の調製

16. 保存中の被験物質の安定性がデータにより証明されていない限り、被験物質は使用直前に新規調製する。ただし場合は除く。化学物質の取り扱いの全て及び細胞に対する初回の処理は、照射前に被験物質の光活性化又は分解が起こらない光条件下で行うことが推奨される。

17. 被験物質はアール平衡塩類溶液（EBSS）などの緩衝塩類溶液や生理緩衝溶液液に溶解する。このときこれらの溶液には、照射中に干渉を起こすような蛋白質又は光吸収成分（PH 変色指示薬及びビタミン類）が含まれないようにする。照射中は細胞を約 50 分間 CO_2 インキュベーター外に置き、アルカリ化を防ぐ。EBSS のような弱緩衝液を用いる場合、7.5% CO_2 でインキュベーションすれば防ぐことができる。細胞を 5% CO_2 のみでインキュベーションする場合、強緩衝液を選択する。

18. 被験物質が水溶性に乏しい場合、適切な溶媒に溶解する。溶媒を用いる場合には全ての培養で同容量とする。例えば陰性（溶媒）対照と全ての被験物質濃度で一定容量とし、細胞毒性を示さない濃度とする。被験物質の濃度は沈殿や懸濁がみられない濃度を選択する。

19. ジメチルスルホキシド（DMSO）及びエタノール（EtOH）が溶媒として推奨される。他の細胞毒性の低い溶媒も適切である。使用前に全溶媒について、被験物質との反応性、光毒性抑制作用、ラジカル消去能、化学的安定性などの特性について評価する。

20. 被験物質の安定性に影響を与えない限り、可溶化のためにボルテックス撹拌、超音波処理、適温への加温などの処置をとることができる。

照射条件

21. *光源：*適切な光源とフィルターの選択は光毒性試験の重要な要素である。UVA 及び可視光線領域の光は通常 *in vivo* で光毒性反応と関連があり（3）（12）、一方、通常 UVB は光毒性との関連は少ないが細胞毒性は高く、波長が 313 nm から 280 nm になると細胞毒性は 1000 倍増加する（13）。適切な光源の選択基準として、被験物質に吸収される光波長（吸光度スペクトル）を照射するものであり、照射量（適切な暴露時間で得られる）は化学物質の既知の光毒性を検出するのに十分であること。さらに、波長及び照射量は、熱を放出するなど（赤外線領域）試験系にとって過度に有害とならないこと。

22. ソーラーシュミレーターによる太陽光シミュレーションは最適な人工光源であると考えられる。フィルターを通したソーラーシュミレーターの照射分布は屋外での太陽光に近い（14）。ソーラーシュミレーターに用いられるのはキセノンアーク及び（ドープされた）水銀ハロゲンアークである（15）。水銀は熱の放出が少なく安価であるが、キセノンと比較すると太陽光との適合性に劣る。全てのソーラーシュミレーターは多量の UVB を放射するため、細胞毒性の高い UVB 波長をフィルターで適切に減弱させる。細胞培養プラスチック材は UV 安定剤を含むため、分析で用いるのと同種類の 96 ウェルプレートのフタを通してスペクトルを測定する。フィルター又は不可避なフィルター効果によりスペクトルを減弱した場合に関わらず、フィルター下で記録したスペクトルは標準的な屋外の太陽光の範囲から逸脱しないこと（14）。*In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験のバリデーション試験に用いたフィルターソーラーシュミレーターのスペクトル照射分布例を（8）（16）に示す。補遺 3 図 1 参照のこと。

23. *照射量測定：*光強度（照射）は適切な広域 UV メーターを用いて光毒性試験前に定期的に確認する。分析で用いるのと同種類の 96 ウェルプレートのフタを通して強度を測定する。UV メーターは光源に対してキャリブレーションをしておく。UV メーターの性能を確認し、そのために 2 番目の UV メーターを使用する場合、同種類の参照 UV メーターと同一のキャリブレーションが推奨される。間隔が長いほど、分光放射計を用いてフィルター付光源のスペクトル照射を測定し、広域 UV メーターのキャリブレーションを確認するのが望ましい。

24. 照射量 5 J/cm^2（UVA 領域にて測定）は Balb/c 3T3 細胞に毒性がなく、光毒性反応を惹起するのに化学物質を励起する十分な量であることが明らかになった（6）（17）。50 分間 5 J/cm^2 を照射すると照射量は 1.7 mW/cm^2 になる。補遺 3 図 2 参照のこと。他の細胞株又は異なる光源を用いた場合、照射量をキャリブレーションし、照射量が細胞にとって有害ではないが標準的光毒性物質を励起するのに十分な量とする。光暴露時間は以下の式から算出する。

$$t（分）= \frac{照射量（J/cm^2）\times 1000}{放射照度（mW/cm^2）\times 60} \quad （1\ J=1\ Wsec）$$

試験条件

被験物質の濃度

25. 照射下（+Irr）および非照射下（-Irr）の被験物質の濃度範囲は用量設定試験で適切に決定する。溶解性は暴露時間又は暴露過程で変化するため、最初の溶解性及び 60 分後（又は用いた処理時間）の溶解性は有用となる可能性がある。不適切な培養条件、過度の酸性又はアルカリ性物質による毒性を避けるために、被験物質を添加した細胞培養は pH6.5～7.8 の範囲とする。

26. 被験物質の最高濃度は生理的試験条件内とし、浸透圧や pH による影響などを避ける。被験物質によっては、最高濃度を制限する要因となる物理化学的性質を考慮する必要がある。比較的溶解しにくく、飽和濃度でも毒性のない物質では、調製可能な最高濃度で試験する。全体として、いずれの濃度でも被験物質の沈殿は避ける。被験物質の最高濃度は 1000 µg/mL を超えないこと。浸透圧は 10 mmol を超えないこと。一定の希釈倍数を用いた 8 種類の被験物質濃度の幾何希釈を用いる（47 節を参照）。

27. 暗所試験（-Irr）において被験物質が限界濃度まで細胞毒性を示さず、照射下（+Irr）で強い細胞毒性を示す結果（用量設定試験）がある場合、データ品質要求を満たすために（+Irr）試験で選択する濃度範囲は、（-Irr）試験の濃度範囲と異なることがある。

対照

28. *細胞の光感受性、背景データの確立：*照射量を増加して暴露した後の細胞生存率を評価することにより、細胞の光感受性を定期的に（およそ 5 継代ごとに）確認する。3T3 NRU 光毒性試験で用いるよりも大幅に高い照射量を含むいくつかの照射量を用いる。このような照射量は光源の UV 部分により最も容易に定量される。*In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験で用いた密度で細胞を播種し、翌日に照射する。1 日後に NR 取り込み試験を用いて細胞生存率を求める。非細胞毒性の最高照射量（バリデーション試験では 5 J/cm^2(UVA)）は、対照物質（表 1）を正しく分類するのに適切であることを示すこと。

29. *光感受性、現在の試験の確認：*試験は、照射した陰性／溶媒対照が非照射の陰性／溶媒対照と比較して 80%以上の生存率を示す場合に品質基準に合致するといえる。

30. *溶媒対照の生存率：*溶媒対照から抽出した NR の絶対吸光度（$OD_{540\ NRU}$）は、播種されたウェルあたり 1×10^4細胞が、2 日間の試験の間に正常な倍加時間で増殖したかどうかを示す。未処理対照の平均 $OD5_{540\ NRU}$が 0.4 以上（すなわち、背景溶媒吸光度の約 20 倍）の場合、試験は許容基準に合致するといえる。

31. *陽性対照：*既知の光毒性物質を各 *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験に同時に用いる。クロルプロマジン（CPZ）が推奨される。*In vitro* 3T3 NRU 光毒性試験の標準プロトコールで用いる CPZ では、以下

の許容基準が決められた。照射下（+Irr）の CPZ: IC_{50}＝0.1～2.0 μg/mL、非照射下（-Irr）の CPZ: IC_{50}＝7.0～90.0 μg/mL。Photo-Irritation-Factor（PIF）は> 6 であること。陽性対照の背景データをモニターする。

32. 評価する物質の化学物質クラス又は溶解特性が適切である他の光毒性物質を、クロルプロマジンの代わりに同時陽性対照としてもよい。

試験操作手順（6）（7）（8）（16）（17）：

1 日目：

33. 96 ウェル組織培養マイクロタイタープレートの末端ウェルに培地 100 μL を入れる（= ブランク）。残りのウェルに培地中 1×10^5 細胞／mL の細胞懸濁液 100 μL を入れる（= 1×10^4 細胞／ウェル）。2 枚のプレートを各被験物質濃度、溶媒対照、陽性対照について用意する。

34. 半コンフルエントの単層を形成するまで細胞を 24 時間インキュベーションする（12 節を参照）。このインキュベーション期間で細胞の回復、接着および指数関数的な増殖がみられる。

2 日目：

35. インキュベーション後、細胞の培養液を捨て、インキュベーションに用いた緩衝液 150 μL でゆるやかに洗う。適切な濃度の被験物質又は溶媒（溶媒対照）を含む緩衝液 100 μL を加える。8 つの異なる濃度の被験物質を用いる。被験物質を添加した細胞を暗所で 60 分インキュベーションする（12 及び 17 節参照）。

36. 一連の各被験物質濃度及び対照用に作製したプレート 2 枚のうち 1 枚を通常無作為に選択し、1 枚は細胞毒性検討用（-Irr）（すなわち、対照プレート）、もう 1 枚（処理プレート）は光毒性検討用（+Irr）とする。

37. 光を暴露するために（+Irr）、室温で約 50 分、96 ウェルプレートのフタを通して非細胞毒性である最高照射量を照射する（補遺 3 参照）。非照射プレート（-Irr）は、室温暗所にて 50 分間（= 光照射時間）置く。

38. 試験溶液を捨て、インキュベーションに用いた被験物質を含まない緩衝液 150 μL で 2 回洗う。緩衝液を培地に変えて一晩（18～22 時間）インキュベーションする（12 節参照）。

3 日目：

顕微鏡評価

39. 位相差顕微鏡を用いて、細胞の増殖、形態および単層の緊密性を検討する。細胞形態の変化及び細胞増殖への影響を記録する。

ニュートラルレッド取り込み試験

40. あらかじめ加温した緩衝液 150 µL で細胞を洗う。洗浄溶液をおだやかにタッピング[訳注：プレートを傾け水気を切ること]して除く。50 µg/mL のニュートラルレッド（NR）溶液（3-アミノ-7 ジメチルアミノ-2-メチルフェノジンハイドロクロライド、CAS 番号 553-24-2 ; C.I. 50040）100 µL を無血清培地に加え（16）、12 節に記載されているように 3 時間インキュベーションする。

41. インキュベーション後、NR 培地を除去し、緩衝液 150 µL で細胞を洗う。溶液を捨て、残った緩衝液をブロッティング[訳注：紙などで吸い取らせること]又は遠心分離によって除く。

42. NR 抽出液（水 49＋エタノール 50＋酢酸 1 の新鮮な溶液）150 µL を正確に加える。

43. NR が細胞から抽出され均一な溶液を形成するまで、マイクロタイタープレートをマイクロプレートシェイカーで 10 分間ゆるやかに撹拌する。

44. ブランクを対照として分光光度計にて 540 nm で NR 抽出物の吸光度を測定する。以降の分析のために、電子ファイルフォーマットにてデータを保管する。

データおよび報告

データ の質と量

45. 試験データは、照射下及び非照射下で得た濃度-反応の意味のある分析が可能でなくてはならない。細胞生存率が 50%に減少する被験物質の濃度（IC_{50}）も可能であれば算出する。細胞毒性が認められるならば、近似曲線が実験データに適合するような方法で濃度範囲及び個々の濃度からの切片を定める。

46. 明らかな陽性結果又は陰性結果はいずれも（53 節を参照）、1 つ以上の予備用量設定試験で支持される主試験で十分であろう。

47. 曖昧な、境界上の、又は不明瞭な結果は、追加試験で明確にする（56 節も参照）。このような場合、試験条件の変更を考慮する。変更する試験条件には、濃度範囲又は間隔、プレインキュベーション時間、照射暴露時間を含む。水に不安定な化学物質では、より短い暴露時間が適切な場合もある。

結果の評価

48. データの評価を可能にするため、Photo-Irritation-Factor（PIF、光毒性係数）又は Mean Photo Effect（MPE、平均光作用）を算出する。

49. 光細胞毒性値の計算では（以下参照）、離散型用量反応は適切な連続用量反応曲線（モデル）で近似される。データへの近似曲線の適合は、通常非線形回帰法により行われる（18）。データ変動による近似曲線への影響を評価するためブートストラップ手順が推奨される。

50. Photo-Irritation-Factor（PIF）は以下の式を用いて算出する。

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

照射下又は非照射下の IC_{50} が算出できない場合は、被験物質の PIF は求めることができない。

51. Mean Photo Effect（MPE）は完全な濃度反応曲線の比較に基づく（19）。代表的な光作用値全域の重みづけ平均と定義される。

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \, PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

いずれの濃度（C）の光作用（PEc）も反応作用（REc）及び用量作用（DEc）の結果であると定義される（PEc = REc×Dec）。反応作用（REc）は照射下及び非照射下にみられる反応差である（REc = Rc (-Irr) – Rc (+Irr））。用量作用は以下によって求める。

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

C*は同濃度を示す。すなわち濃度 C では+Irr 反応と-Irr 反応は同等である。+Irr 曲線が Rc（-Irr）よりも全体的に高い又は低い場合に C*を決定できず、用量作用を 1 とする。重み付け係数 Wi は最高反応値 W_i=MAX（Ri (+Irr), Ri (-Irr)） から求める。濃度グリッド Ci は、試験で用いた濃度で規定された各濃度間隔に該当する同ポイント数として選択する。MPE 算出は 2 曲線のうち 1 曲線以上が 10%以上の反応を示す最高濃度に限定する。最高濃度が+Irr で用いた最高濃度よりも高いならば、+Irr の残りの曲線の反応値を 0 とする。MPE が適切に選択したカットオフ（MPEc = 0.15）よりも大きいか否かによって物質が光毒性かを分類する。

52. PIF 及び MPE を算出するソフトウェアパッケージは事務局から入手可能である（20）。

結果の解釈

53. バリデーション試験に基づき（8）、被験物質が PIF<2 あるいは MPE<0.1 の場合は「光毒性なし」、PIF>2 及び<5 あるいは MPE>0.1 及び<0.15 の場合は「光毒性の可能性あり」、PIF>5 あるいは MPE>0.15 の場合は「光毒性あり」とする。

54. 本試験を最初に確立しようとする施設では、被験物質の光毒性を試験する前に表 1 に示す参照物質を試験する。PIF 又は MPE は表 1 の値に近いこと。

表 1

化学物質及び CAS 番号	PIF	MPE	吸光度ピーク	溶媒[1]
アミオダロン塩酸塩 [19774-82-4]	>3.25	0.27-0.54	242 nm 300 nm （ショルダー）	エタノール
クロルプロマジン塩酸塩 [69-09-0]	>14.4	0.33-0.63	309 nm	エタノール
ノルフロキサシン [70458-96-7]	>71.6	0.34-0.90	316 nm	アセトニトリル
アントラセン [120-12-7]	>18.5	0.19-0.81	356 nm	アセトニトリル
プロトポルフィリン IX 、2ナトリウム塩 [50865-01-5]	>45.3	0.54-0.74	402 nm	エタノール
L-ヒスチジン [7006-35-1]	PIF なし	0.05-0.10	211 nm	水
ヘキサクロロフェン [70-30-4]	1.1-1.7	0.00-0.05	299 nm 317 nm （ショルダー）	エタノール
ラウリル硫酸ナトリウム [151-21-3]	1.0-1.9	0.00-0.05	吸光度なし	水

データの解釈

55. 光毒性作用が最高試験濃度のみで観察された場合（特に水溶性の被験物質）、有害性の評価についてはさらに考慮が必要である。皮膚吸収、皮膚での蓄積、他の試験データ、例えば *in vitro* の動物又はヒトの皮膚試験、又は皮膚モデル試験などのデータが含まれる。

56. 毒性がみられず（+Irr 及び-Irr ともに）、溶解性が悪く試験可能濃度が限られる場合、被験物質の試験への適合性が疑われる可能性があり、他のモデルでの確認試験を検討する。

試験報告書

57. 試験報告書には以下の情報を含まなければならない。

被験物質：
- わかっていれば識別データ、一般名、IUPAC 番号と CAS 番号
- 物理的性質と純度
- 試験の実施に関連する物理化学的特性
- 紫外線／可視光線吸光度スペクトル
- わかっていれば、被験物質の安定性及び光安定性

溶媒：
- 溶媒選択の妥当性
- 溶媒中の被験物質の溶解性

[1] 吸光度測定に用いる溶媒

- 処理培地中の溶媒の割合

細胞：
- 使用した細胞種および供給元
- マイコプラズマの汚染が無いこと
- わかっていれば、継代数
- 細胞の光感受性、*in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験で用いる照射装置で決定する

試験条件（1）；*処理前後のインキュベーション：*
- 培地の種類及び組成
- インキュベーション条件（CO_2 濃度、温度、湿度）
- インキュベーション時間（処理前、処理後）

試験条件（2）；*被験物質の処理：*
- 照射下及び非照射下で用いた被験物質濃度の選択根拠
- 被験物質の低い溶解性のため細胞毒性がない場合、試験最高濃度の設定根拠
- 処理培地（緩衝塩類溶液）の種類及び組成
- 被験物質の処理時間

試験条件（3）；*照射：*
- 使用光源の選択根拠
- 光源及び照射計の製造元と種類
- 光源の分光照射特性
- 使用したフィルターの透過及び吸光度特性
- 照射計の特性及びキャリブレーションの詳細
- 試験系から光源までの距離
- 上記距離から UVA 照射した場合の mW/cm^2
- UV/可視光の暴露時間
- UVA 量（照射量×時間）、J/cm^2 表示
- 照射中の細胞培養および同時に暗所に置く細胞培養の温度

試験条件（4）；*ニュートラルレッド生存率試験：*
- ニュートラルレッド処理培地の組成
- ニュートラルレッドでのインキュベーション時間
- インキュベーション条件（CO_2 濃度、温度、湿度）
- ニュートラルレッド抽出条件（抽出剤、時間）
- ニュートラルレッド吸光度を測定する分光光度計の波長
- 該当する場合、2 番目の波長（参照）
- 該当する場合、分光光度計ブランクの構成

結果：
- 各被験物質濃度から得た細胞生存率、同時溶媒対照の平均生存率のパーセンテージで表示。
- 同時の+Irr 及び-Irr 試験から得た濃度反応曲線（被験物質濃度 vs. 相対細胞生存率）
- 濃度反応曲線の分析、可能であれば IC_{50}（+Irr）および IC_{50}（-Irr）の計算／算出

- 照射下および非照射下から得た 2 種類の濃度反応曲線の比較、PIF 又は MPE 算出のいずれでもよい。
- 同時溶媒対照の試験許容基準
- 照射及び非照射細胞の絶対生存率（ニュートラルレッド抽出物の吸光度）
- 背景陰性及び溶媒対照データ（平均及び標準偏差）
- 同時陽性対照の試験許容基準
- 陽性対照の IC_{50}（+Irr）および IC_{50}（-Irr）ならびに PIF／MPE
- 背景陽性対照データ：IC_{50}（+Irr）および IC_{50}（-Irr）ならびに PIF／MPE（平均及び標準偏差）

結果の考察

結論

参考文献

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972)._List of the photodynamic substances. In “Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry” Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

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

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In “The science of Photobiology” Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 ”Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water” Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, 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., Pfannbecker, 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. Toxic. In Vitro 8, 793-796.

(7) Anon (1998). 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, ATLA, 26, 7-8.

(8) 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). The international EU/COLIPA *in vitro* _phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305-327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th – 31st October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

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

(11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

(12) Lambert L.A, Wamer W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In "Dermatotoxicology", edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515-530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography - Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275.

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA - Standard Operating Procedure: *In vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W.,_De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive* 76/768/EEC, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

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

(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of doseresponse curves and its use for predicting the *in vitro* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

補遺 1

定義

照射： 表面での紫外線（UV）又は可視光線の強度、W/cm^2 又は mW/cm^2 で表す。

光用量： 表面での紫外線（UV）又は可視光線の照射量（= 強度×時間）、表面積あたりのジュール（=W×s）で表す。例えば、J/m2 又は J/cm^2。
UV 波長： CIE（国際照明委員会）により推奨される規格で UVA（315～400 nm）、UVB（280～315 nm）、UVC（100～280 nm）。他の規格も利用可能。UVA 及び UVB の区分は 320 nm とし、UVA は 340 nm を区分点として UV-A1 と UV-A2 に区分できる。

細胞生存率： 細胞集団の総合活性を示すパラメータ（例えば、生体染色色素のニュートラルレッドの細胞リソソームへの取り込み）。対象エンドポイントや用いる試験デザインに依存し、細胞総数や細胞の活動性と関連する。

相対細胞生存率： 被験物質の処理を除き、全試験操作（+Irr 及び-Irr ともに）を通して同じ処理をされた溶媒（陰性）対照との比較における細胞生存率。

PIF（Photo-Irritation-Factor、光毒性係数）：UVA/可視光の非細胞毒性照射量による非照射下（-Irr）および照射下（+Irr）で得られた被験物質の 2 つの等価細胞毒性濃度（IC_{50}）の比較により求められる係数。

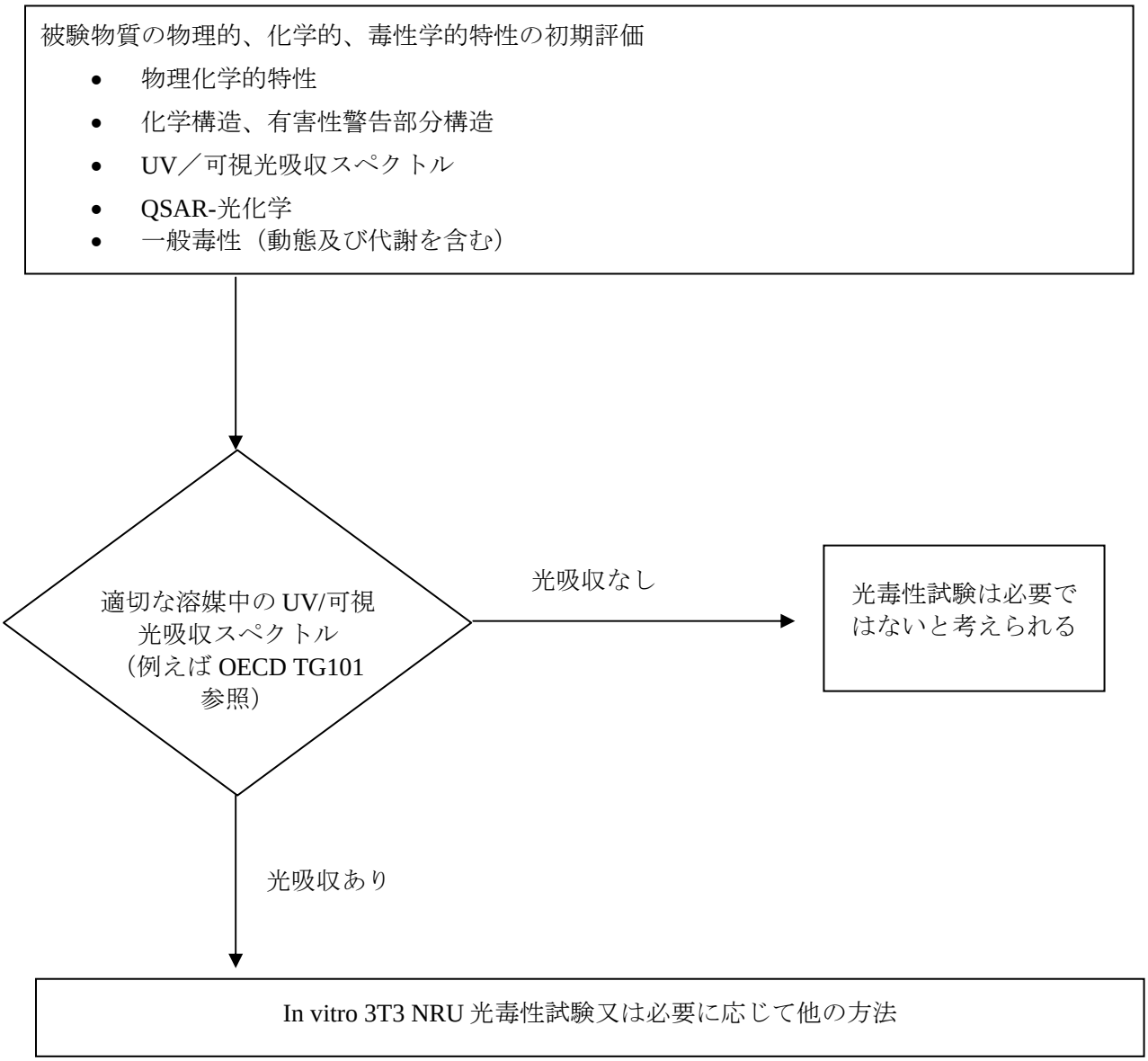
IC_{50}： 細胞生存率が 50%減少する被験物質濃度

MPE（Mean-Photo-Effect、平均光作用）： UVA/可視光の非細胞毒性照射量による非照射下（-Irr）および照射下（+Irr）で得られた濃度反応曲線の数学的解析により求められる値。

光毒性：ある化学物質に最初に皮膚暴露し引き続き光に暴露した後に惹起される急性毒性反応、また化学物質の全身投与後に皮膚照射によって同様に誘発される急性毒性反応。

補遺 2

化学物質の光毒性試験に対する連続アプローチにおける 3T3 NRU 光毒性試験の役割



補遺 3

図 1：フィルターソーラーシミュレーターのスペクトル分布

（22 節参照）

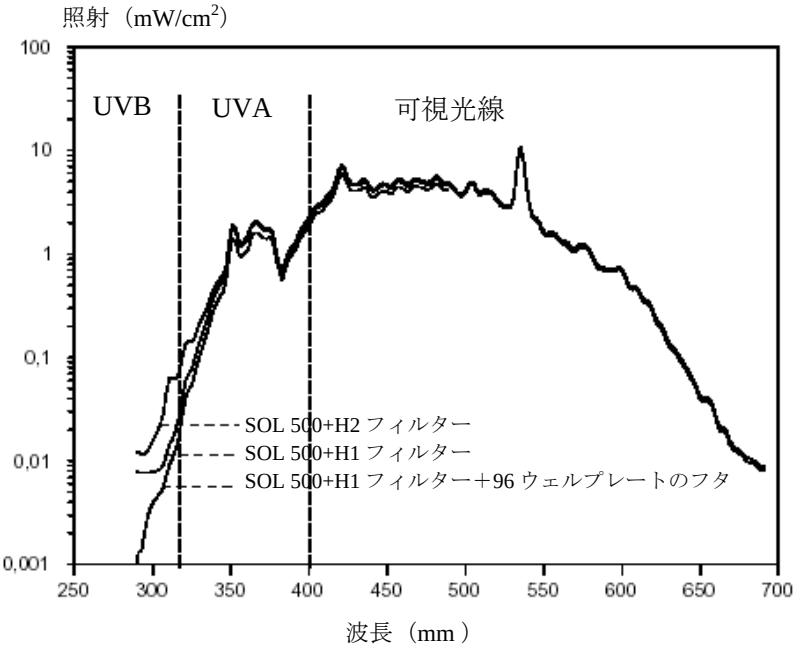
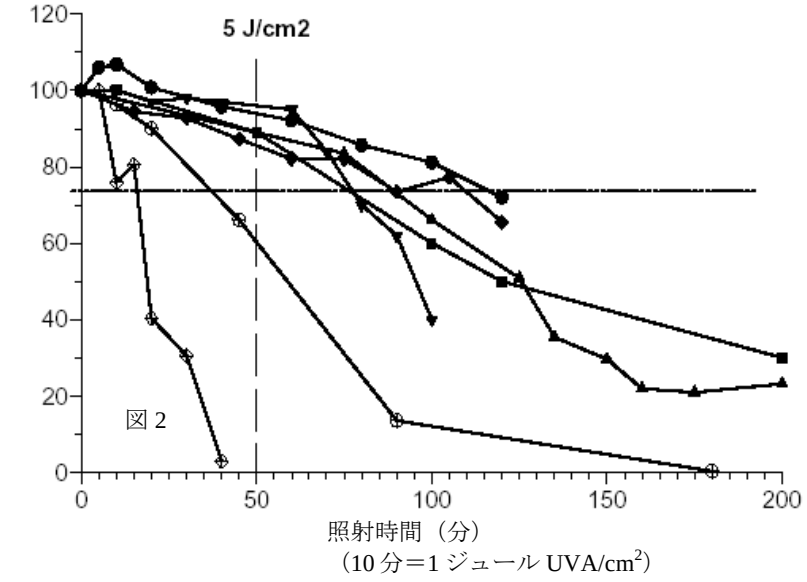


図 1 にはフィルターソーラーシミュレーターの許容スペクトル分布を示す。3T3 NRU 光毒性試験のバリデーション試験に用いたドープハロゲン光源に基づく（6）（8）（17）。異なる 2 つのフィルターの差及び 96 ウェル細胞培養プレートのフタによるフィルターの効果を示す。H2 フィルターは UVB 高量に忍容性を示せる試験系のみに用いた（皮膚モデル試験及び赤血球光溶血試験）。3T3 NRU 光毒性試験では H1 フィルターを用いた。図ではプレートフタの追加フィルター効果は主に UVB 領域でみられ、アミオダロンのような UVB 領域を吸収して物質を励起する照射スペクトルの UVB を残す（表 1 を参照）。

図 2：Balb/c 3T3 細胞の光感受性（UVA 範囲で測定）

（24、28、29 節参照）



UVA 領域で測定した 3T3 NRU 光毒性試験のバリデーション試験に用いたソーラーシミュレーター照射による Balb/c 3T3 細胞光感受性を示す。図には異なる 7 施設で得たプレバリデーション結果を示す（1）。白ヌキ記号の 2 曲線は加齢細胞（継代数が多い）から得た。新たな保管細胞に変えると、黒塗り記号の曲線は許容可能な照射耐性を示した。以上のデータから非細胞毒性の最高量は 5 J/cm²であった（垂直方向の点線）。水平方向の点線は 29 節に示した最大許容照射効果を示す。