

第4章 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) について

4-1) はじめに

担当：岡本裕子

光毒性発現の主要因としては、化学物質に光を照射した際、照射により化学物質が励起状態となり、そのエネルギーが何らかの形で放出される時に、細胞膜、DNA 等を中心に細胞全体を傷害することで発現すると考えられている。これらの光毒性反応には分子状酸素の関与が大きいことが知られている。この様な光毒性発現のメカニズムを踏まえて多様な *in vitro* 光毒性試験法が開発されている。文献調査の結果から得られた各種 *in vitro* 光毒性試験法のまとめを Table 4-1 に示した (岡本, 2001)。現在までに報告されている *in vitro* 光毒性試験法は、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ている。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の異なる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や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。

これらの試験法のうち Balb/c 3T3 細胞を用い Neutral red 取り込みを指標とする方法が EU/COLIPA のバリデーションで光毒性試験代替法としての妥当性が検討され (Spielmann *et al.*, 1994, 1998a, 1998b)、ECVAM によって承認されている。

引用文献

- 岡本裕子, (2001) *In vitro* 光毒性評価における活性酸素種の影響, 環境変異原研究 23, 73-81.
- Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L' Eplattenier, H.L., 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.

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