

- program : results of the first stage of validation, *Curr Probl Dermatol*, 23, 256-264
- Yang, X.L., Fan, C.H. and Zhu, H.S. (2002) Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C(60)] fullerene derivatives and its mechanism, *Toxicol In Vitro*, 16, 41-46
- Sheyhedin, I., Aizawa, K., Araake, M., Kumasaka, H., Okunaka, T. and Kato, H. (1998) The effects of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) *in vitro*, *Photochem Photobiol*, 68, 110-114
- van den Biesen, P.R., Berenschot, T., Verdaasdonk, R.M., van Weelden, H. and van Norren, D. (2000) Endoillumination during vitrectomy and phototoxicity thresholds, *Br J Ophthalmol*, 84, 1372-1375
- Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Bates, T.E., Dinotta, F., Micali, G. and Giuffrida Stella, A.M. (2001) Induction of heat shock protein synthesis in human skin fibroblasts in response to oxidative stress : regulation by a natural antioxidant from rosemary extract, *Int J Tissue React*, 23, 51-58
- 松本良造, 今井弘一 (1993) 細胞回復度試験法の確立に関する基礎的検討－初期細胞数と細胞回復時間について－, 歯科材料・器械, 12, 374-392

#### 4-5) 関連項目

担当：板垣宏、小島肇夫

##### 4-5-1) EU/COLIPA 及び OECD により提案された試験プロトコールの一部変更について

本試験法 (3T3 NRU 法) は、1992-1994 に実施された EU/COLIPA (欧州化粧品工業連合会) によるプレバリデーション (Phase I) に端を発する。このプレバリデーションでは、光毒性のスクリーニングを目的とした 8 種の試験法と作用機構の解析を目的とした 5 種の試験法について検討され (Spielmann *et al.*, 1994)、その結果として本 3T3 NRU 法が選択され、それ以降のバリデーションが進行した理由となっている。しかし、このプレバリデーションでは、被験物質がブラインドでないこと及び各試験法について何施設が参加し、3T3 NRU 法以外の試験法については個別にどのような結果が得られたかが不明である (Spielmann *et al.*, 1994, Liebsch *et al.*, 1994)。その後、1994-1996 に実施されたバリデーション (Phase II) (Spielmann *et al.*, 1998a) 及び 1997-1998 に実施された紫外線吸収剤 (Phase III) (Spielmann *et al.*, 1998b) の評価を通して本 3T3 NRU 法の有用性が確認されてきたという経緯を有している。

OECD ガイドラインのドラフトの公開以降で、本 3T3 NRU 法の改良について報告した論文はほとんど見当たらない。よって、本 3T3 NRU 法を構成する要因に分けてこれまでの知見を整理し、この項目に対する回答とする。

2002 年 3 月 15 日付の OECD ガイドラインドラフトでは、本 3T3 NRU 法は、Balb/c 3T3 (clone 31) に被験物質を適用し、さらにソーラーシミュレーターによる照射後、ニュートラルレッド取り込み試験により細胞生存率を求める。また、光毒性のポテンシャルの評価は、Photo-Irritation Factor (PIF) または Mean Photo Effect (MPE) のいずれかの方法によることが記載されている。つまり、考えられる修正項目としては、上記の測定指標の他、用いる細胞種に関する事、光照射に関する事、及び評価方法に関する事が挙げられる。以下に、現在提案されている OECD ガイドラインのドラフトを基本的に準拠し、これの変更点について記載した文献の結果を紹介する。

##### 4-5-1-1) 細胞毒性評価指標の変更について

上記の試験法開発の経緯に示したように、光毒性試験代替法については、本 3T3 NRU 法に絞って光毒性の予測に適しているかという観点でバリデーションが進行してきた。そのため、細胞毒性の指標としては Neutral red 取り込み法以外の細胞毒性

指標に対する優位性や測定指標の変更の可否については全く議論がなされていない。ただ、光照射の無い系に関しては、Draize 眼刺激性試験代替法を検討した厚生科学研究班で、Neutral red 取り込み試験、MTT 試験及び Crystal violet 染色試験（原文誤記）で測定指標による差は認められないことを報告しているが（Ohno *et al.*, 1999）、光照射下では全く未検討である。

よって、本項目については、必要に応じて独自のバリデーションを設定する必要がある。

#### 4-5-1-2) 細胞種差の変更に關して

OECD ガイドラインのドラフトではパラグラフ 9 に『バリデーション study で使用された ATCC や ECACC より供給される Balb/c 3T3 (clone31) を推奨すること、他の細胞でも本プロトコルを用いれば問題のない可能性があること、及び細胞により特殊な培養条件を使用する場合は同等性の実証が必要であること』が記載されている。

本ガイドラインのドラフトに記載された方法に準拠し、細胞種差を検討した論文には、ヒト角化細胞やヒト皮膚線維芽細胞との比較を記述したものがある。

Clothier 等は 4 名のボランティアの包皮から採取した初代培養の角化細胞（NHK）を用いて EU/COLIPA の Phase II で検討された被験物質及び紫外線吸収剤の評価で検討された被験物質の計 45 化合物について検討を行った。その結果、PIF を指標とした場合、Bithionol（3T3 NRU 法（陽性）、NHK NRU 法（陰性））を除き、Balb/c 3T3 細胞と NHK 細胞での光毒性の評価結果は一致しており、また、光毒性の有無の判別に関して 4 名から得た細胞に donor の特異性は認められなかったことを報告している（Clothier *et al.*, 1999）。

一方、岡本は、殺菌剤や香料を含む計 33 化合物の評価では、3T3 NRU 法では陽性と評価されるが、ヒト皮膚線維芽細胞（NG1RGB）では捉えられない化合物が 3 種（8-Methoxypsoralen、5-Methoxypsoralen、5-Bromo-4'-chlorosalicylanilide）あり、Balb/c 3T3 の方が感度の良いことを報告している（岡本, 2001）。

杉山等は、Balb/c 3T3、NG1RGB、正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を用いて、計 23 化合物を評価した結果、これらの細胞には大きな種差が認められず、香料である Phantolid や Galaxolide の光細胞毒性はこれらの細胞種ではいずれも捉えられないことを報告している（杉山ら, 1999）。なお、これらの香料が 3T3 NRU 法では捉えられないことは岡本も報告している（岡本, 2001）。

ただ、光毒性の標的部位は皮膚であること、また皮膚細胞の種類によってはニュートラルレッドを取り込むライソゾーム活性が低い場合が考えられる。よって、これらの皮膚細胞を用いる場合は測定指標の妥当性も考慮し、必要に応じて独自のバリデーションを実施する必要がある。

#### 4-5-1-3) 光照射に關すること

OECD ガイドラインのドラフトではパラグラフ 21 ～ 24 に『照射条件』が詳細に記載されている。基本的には UVB をカットするフィルターを付けたソーラーシミュレーターにより 5J/cm<sup>2</sup>（UVA）照射すると記載されている。

EU/COLIPA のバリデーションでは、米国から参加した 1 研究機関を除き、照射装置は SOL500（ドイツの Dr Honle 社製）、フィルターは H1（Dr Honle 社製）、紫外線測定装置（UVA-meter）は Type No.37（Dr Honle 社製）とすべて同じであった。なお、米国から参加した研究施設も照射装置のみ Dr Honle 社製の SOL3 でその他は全く一緒であった。さらに EU/COLIPA のバリデーションでは照射装置の違いによる影響を検討していないので、この点に関しては議論できない。

照射装置等の条件が EU/COLIPA と最も異なるのは岡本等の報告である（岡本, 2001, Okamoto *et al.*, 1999）。岡本等は、Bio-Solar simulator WXS-50C-5UV（Wacom

社製、キセノンランプ) を使用し、8.3mW/cm<sup>2</sup> で 10 分間照射することにより照射量を 5J/cm<sup>2</sup> としている。一方、EU/COLIPA では 1.7mW/cm<sup>2</sup> で 50 分間照射することにより照射量 5J/cm<sup>2</sup> としているため、照射量が同じ 5J/cm<sup>2</sup> でも、照射強度と反応時間が異なるので同一レベルとしての比較には注意を要する。以上の点から、EU/COLIPA のバリデーションでは、その装置を含め非常にコントロールされた照射条件であることが判明した。そのため、Dr Honle 社製の機器を使用しない場合は、その妥当性を検証する必要がある。また、照射量 5J/ cm<sup>2</sup> とした場合についても、照射強度を 1.7mW/cm<sup>2</sup> から変更する場合は、照射強度と反応時間の影響を検討しておく必要がある。

**4-5-1-4) 光毒性の有無を判定するためのパラメーターとカットオフ値について**

評価に関する項目に関して、2002 年 3 月 15 日付の OECD ガイドラインドラフトとそれ以前のドラフトを比較して以下に記す。表から明らかなように、大きな変更点は投与すべき最高濃度、IC50 が求められなかった場合の処置、光毒性評価における境界領域及び MPE の基準である。

作成年月日	2002 年 3 月 15 日	2000 年 2 月	
投与すべき最高濃度	1000μg/mL 以下	100μg/mL 以下	
IC50 が求められなかった場合の対応	PIF を算出しない	求められた場合は以下の基準を適用	投与した最高濃度 Cmax を使用する
光毒性無し (no phototoxicity)	PIF < 2 MPE < 0.1	PIF < 5	$\frac{C_{max} (-UV)}{C_{max} (-UV)} = 1$
光毒性の可能性 (probable phototoxicity)	2 < PIF < 5 0.1 < MPE < 0.15	記述なし	
光毒性有り (phototoxicity)	PIF > 5 MPE > 0.15	PIF ≥ 5	$\frac{C_{max} (-UV)}{IC50 (+UV)} \geq 5$
最高濃度のみで陽性結果が得られた場合	光毒性の評価には、被験物質の皮膚への浸透性、吸収・蓄積性、あるいは他の試験結果等による更なる考察が必要		
照射系及び非照射系で毒性が認められず、溶解性に制限があった場合	溶解性のため試験可能な濃度が制限されている場合、本試験法における被験物質の適合性に疑問があり、確認試験の実施を考慮すべきである	水に対する溶解性が 100ug/mL 以下の物質では、本試験法における被験物質の適合性に疑問があり、確認試験の実施を考慮すべきである	

なお、1994-1996 に実施されたバリデーション (Phase II) (Spielmann *et al.*, 1998a) 及び 1997-1998 に実施された紫外線吸収剤 (Phase III) (Spielmann *et al.*, 1998b) の評価では、投与すべき最高濃度を含め、光毒性の評価に関しては、2001 年 11 月以前のドラフトの基準により実施されている。そのため、2001 年 11 月 16 日付の OECD ガイドラインドラフトとの整合性については、生データから再度検討する必要がある。

**4-5-2) ワークショップとバリデーションの必要性和その内容**

**4-5-2-1) 概要**

ECVAM の光毒性に関するワークショップは、過去 2 回開催されている。第 1 回ワークショップは 1993 年 12 月 13 日～ 17 日に Angera (Italy) で開催され、その主題は、動物実験代替法として行政に受け入れられることを目的として、EU/COLIPA のプレ

バリデーションの結果を踏まえて当時報告されていた光増感作用を予測する *in vivo* 及び *in vitro* 試験の評価であった (Spielmann *et al.*, 1994)。なお、当時は光化学反応に基づき、光毒性と光アレルギー性の両者を含め光増感作用としていた。このワークショップにおいて、3T3 NRU 法の妥当性が評価され、その結果バリデーション (Phase II) が進行し、さらには紫外線吸収剤 (Phase III) の評価に発展していったものと考えられる。

第2回は1999年6月22日～27日にBerlin (Germany) で開催され、その主題は、*in vivo* 及び *in vitro* 光毒性試験に関する現状のとりまとめであった (Spielmann *et al.*, 2000)。個別の検討項目としては、用語の整理、光増感物質の作用機構、光毒性、光パッチ試験、光アレルギー性及び光遺伝毒性・光発がん性であった。

一方、ICCVAMは1999年4月28日にPhototoxicity Working Group (PWG)を設置し、OECDガイドラインドラフトをreviewするとともに、3T3 NRU法のpeer reviewに必要な情報の入手を行っている模様である。

#### 4-5-2-2) 試験条件の最適化

『4-5-1) EU/COLIPA 及び OECD により提案された試験プロトコールの一部変更について』に記述したように、OECD ガイドラインのドラフトの公開以降で、本 3T3 NRU 法の改良について報告した論文はほとんど見当たらない。よって、本 3T3 NRU 法に関しては、試験条件の最適化の検討は不可能である。

#### 4-5-2-3) 他の試験法における活用

EU では、本 3T3 NRU 法を光化学反応に基づき光増感作用を持つ化合物を捉える試験系と位置付け、光アレルギー性 (光感作性) や光変異原性・光発がん性の第一次スクリーニングとして活用するという考え方がある (Spielmann *et al.*, 2000, Spielmann *et al.*, 2001)。確かに本 3T3 NRU 法は、光増感作用を持つ物質を細胞の生死 (ニュートラルレッドの取り込み) で捉える試験法であるが、この試験法で陰性の場合には、光アレルギー性や光変異原性・光発がん性の評価には進まないという考え方には反論もある。すなわち、一般に代替法は一つ以上の毒性発現機構に基づき被験物質を評価するものであり、この試験法で陽性のものはその機構により毒性を発現しているということである。それ故、本 3T3 NRU 法で陰性だからといって、光増感作用がないので光アレルギー性や光変異原性・光発がん性の評価には進まないという考え方には容易に同意できない。

#### 4-5-3) 関連項目に関する要約

##### 4-5-3-1) 将来改良すべき検討項目

EU/COLIPA のバリデーションは、細胞や光照射装置を含め非常にコントロールされた試験条件で実施されてきたため、本 3T3 NRU 法のガイドラインドラフトは他の試験法と比較すると SOP のように感じられる。そのため、Balb/c 3T3 (clone 31) や Dr Honle 社製の機器を使用しない場合は、その妥当性を検証する必要がある。

一方、*in vivo* において光刺激性発現の場合は皮膚であることを考慮すると、皮膚細胞の活用や測定指標 (ニュートラルレッドの取り込み) の見直しについては将来検討すべき項目と考える。

また、OECD ガイドラインのドラフトではパラグラフ 57 に『光源のスペクトル特性、フィルターの放射・吸収特性、紫外線測定装置の特性とその補正』が記載されている。バリデーションで使用された Dr Honle 社製の照射機器等を使用する場合、日本の代理店ではこれらの項目に関して対応不可能なためドイツの Dr Honle 社に問い合わせるかまたは検定のため定期的に送付する必要がある。日本においてもこれらの課題を満足する照射光源や紫外線測定装置の開発や提供が望まれる。



さらに、評価パラメーターである PIF や MPE の cut-off 値については、『4-5-1) EU/COLIPA 及び OECD により提案された試験プロトコールの一部変更について』の項に記述したように変更されているが、実際にはバリデーションが実施されていない。

最後に、本 3T3 NRU 法のガイドラインドラフトにおいて採り上げられていない代謝活性化の検討については、検出感度向上の観点から将来検討すべき項目と考えられる。

#### 4-5-3-2) 将来要望されるワークショップ

第一に、上記の『4-5-3-1) 将来改良すべき検討項目』に関しては、もしこれらの検討が成された場合、ワークショップの開催は是非とも必要である。

第二に、過去に光刺激性を示した物質として、Fluoroquinolone 系の抗生物質や殺菌剤等の薬剤の他、Bergapten (Bergamot oil 中の香料成分) 等の香料が挙げられる。しかし、本 3T3 NRU 法が香料に対して感度が低いことは、杉山や岡本も指摘している (岡本, 2001, 杉山, 1999)。これは、香料成分が油性であるため、水系の培養細胞を用いる試験では正確に評価できないためかもしれない。こうした香料の光刺激性は、臨床でも確認されていることから、香料や油性の化合物の光刺激性を正確に評価する新たな *in vitro* 試験法の開発は是非とも必要であると考えられる。

第三に、光刺激性の考え方についてであるが、光感作性 (光アレルギー性) や光変異原性・光発がん性に比較し、光刺激性は生体に対して重篤な傷害は少ないと考えられる。すなわち、光刺激性のポテンシャルを有する化合物であっても、製品への配合濃度が低ければ、生体に対する危険度は少ないと考えられる。今後、本 3T3 NRU 法によって光刺激性のポテンシャルを有する新規化合物をどこまで配合可能かを検討する試験法の研究が必要となると考えられる。この観点については、難溶性物質や製品を評価可能な 3 次元皮膚モデルや他の *in vitro* 試験との battery が考えられるが、ワークショップの開催を含め今後の研究の進展を期待したい。

第四に、3T3 NRU 法の行政面における有用性についてであるが、本試験法は化学物質が光毒性ポテンシャルがあるかどうかを判定する Hazard Identification として位置付けられるため、実際の皮膚反応に対する用量依存性やリスクアセスメントでの使用は困難である。3T3 NRU 法を行政的に使用するのであれば、化学物質単体の光毒性ポテンシャルの把握に用い、最終製品がヒトに使用されるものであれば、製品形態での実使用試験で確認することが望まれる。

最後に、市場にある製品の光毒性を見出すことができるのは医師である。ECVAM ではワークショップに医師の参加を呼びかけ、過去に光毒性を示した化合物のとりまとめ、光パッチテスト法により光毒性を実証してきたようである (Spielmann *et al.*, 2000)。日本においても、医師と研究者が試験法やその結果について自由に討議できる場 (ワークショップ) が必要と考える。このことが、試験法の改良を経て安全性の向上につながると期待できるからである。

以上

#### 引用文献

- Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapor, O. and Sladowski, D. (1994) *In vitro* phototoxicity testing, *ATLA*, 22, 314-348.
- Spielmann, H., Balls, M., Brand, M., Doring, B., Holzhutter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., Eplattner, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer, F., Moore, L., Pape, W.J.W., Pfanenbecker, 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, *Toxicol. in Vitro*, 8, 793-796.

- Liebsch, M., *et al.* (1994) *In Vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization, in *Alternative Methods in Toxicology Vol.10*, ed. A. Rougier, A.M. Goldberg and H.I. Maibach, pp. 243-254, Mary Ann Liebert, New York.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J., Pechovitch, G., de Silva, O., Holzhutter, 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., (1998a) The international EU/COLIPA *in vitro* phototoxicity validation study : results of Phase II (blind trial). Part 1 : the 3T3 NRU phototoxicity test, *Toxicol. in vitro*, 12, 305-327.
- Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., de Silva, O., Holzhutter, 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.
- Ohno, Y., Kaneko, T., Inoue, T., Morikawa, Y., Yoshida, T., Fujii, A., Masuda, M., Ohno, T., Hayashi, M., Momma, J., Uchiyama, T., Chiba, K., Ikeda, N., Imanishi, Y., Itagaki, H., Kakishima, H., Kasai, Y., Kurishita, A., Kojima, H., Matsukawa, K., Nakamura, T., Ohkoshi, K., Okumura, H., Saijo, K., Sakamoto, K., Suzuki, T., Takano, K., Tatsumi, H., Tani, N., Usami, M. and Watanabe, R. (1999) Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests, *Toxicol. in vitro*, 13, 73-98.
- Clothier, R., Willshaw, A., Cox, H., Garle, M., Bowler, H. and Combes, R. (1999) The use of human keratinocytes in the EU/COLIPA international *in vitro* phototoxicity test validation study and the ECVAM/COLIPA study on UV filter chemicals, *ATLA*, 27, 247-259.
- 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.
- 杉山真理子, 板垣宏, 勝村芳雄, 加藤忍 (1999) 光細胞毒性試験における細胞種差の検討, 日本動物実験代替法学会第 13 回大会要旨集, 97-98.
- Okamoto, Y., Ryu, A. and Ohkoshi, K. (1999) *In vitro* alternatives and phototoxicity testing. I. Evaluation of *in vitro* phototoxicity assays, *ATLA*, 27, 639-664.
- Spielmann, H., Meuller, L., Averbeck, D., Balls, M., Brendler-Schwaab, S., Castell, J.V., Lovell, W.W., Merk, H.F., Nash, J.F., Neumann, N.J., Pape, W.J.W., Ulrich, P., and Vohr, H.W. (2000) The second ECVAM workshop on phototoxicity testing, *ATLA*, 28, 777-814.
- Spielmann, H. (2001) Acute phototoxicity testing, 環境変異原研究, 23, 53-64.

Table 4-14 単層培養細胞を用いた試験法

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
1	Colombain M, Goll V, Muiyard F, Grand C, Bevalot F, Richert L	A bioassay using the human hepatoblastoma cell line HepG2 for detecting phototoxicity of furocoumarins.	HepG2/hepatoblastoma <sup>a</sup>	UVA or UVB	MTT assay	5 furocoumarins (heracleinol, xanthotoxin, trichoclinalimperatorin)	HepG2は、7-DMCのin vitro光毒性評価に適している。	Planta Med. 67 644-646 (2001)
2	Freeman R.G., Murtishaw W., Knox J.M.	Tissue culture techniques in the study of cell photobiology and phototoxicity.	4 cell lines (Hep-2, monkey kidney cells, rabbit kidney cell, rabbit skin fibroblasts)	UVA (300nm) or visible light	NR-uptake	13 photosensitizers	培養細胞での光照射による毒性は確認できた。8-MOPでは10 <sup>-6</sup> の濃度でも反応が確認できた。	J Invest Dermatol. 54 164-168 (1970)
3	Lasarow R.M., Isenoff R.R. and E. Gomez	Quantitative in vitro assessment of phototoxicity by a fibroblast-neutral red assay.	normal human fibroblasts	UVA	NR-uptake	doxycycline, minocycline, demeclocycline, tetracycline, nalidixic acid, ofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, chlorpromazine	チナクリン系およびND系抗生性物質等の光毒性を線量細胞で評価。	J. Invest. Dermatol. 98 725-729 (1992)
4	Lock S.O. and J.V. Friend	Phototoxicity testing in vitro: Evaluation of mammalian cell culture techniques.	red blood cells, MPM(mouse peritoneal macrophages), CHV79	UVA and visible light	haemolysis, LDH leakage, beta-glucuronidase, DNA-synthesis	6 chemicals	CHV79細胞のUVA感受性は強い。哺乳動物の培養細胞は光毒性物質に対する感受性が低い。	Food Chem. Toxicol. 24 789-793 (1986)
5	Maier K., Schmitt-Landgraf R. and B. Siegemund	Development of an in vitro test system with human skin cells for evaluation of phototoxicity	normal human skin fibroblast, keratinocytes	UVA	NR-uptake, kenacid blue assay, MTT, NBT, NBT/DA, ジン/還元試み, fluorescent assay	26 chemicals	代試験法として開発。4種の指標について評価した。ヒトの正常細胞はUVAに対して感受性は高い。スクリーニング法として適している。	Toxicol. in Vitro 5 457-461 (1991)
6	Traynor N.J., Barratt M.D., Lovell W.W., Ferguson J., Gibbs N.K.	Comparison of an in vitro cellular phototoxicity model against controlled clinical trials of fluoroquinolone skin phototoxicity.	CHV79 (chinese hamster fibroblasts)	UVA	MTT assay, NR-uptake assay.	14 chemicals (8 fluoroquinolone antibiotics)	全身投与における臨床光毒性結果とin vitro光毒性結果との対応を評価した。Quinolone系抗生性物質の光毒性予測に利用可能。	Toxicol. In Vitro 14 275-83 (2000)
7	Wilhelm K.P., Biel S., Siegers C.P.	Role of flavonoids in controlling the phototoxicity of Hypericum perforatum extracts.	HaCaT cells (human keratinocytes)	UVA	NR-uptake	5-mop, chlorpromazine, psoralenes, Hypericum perforatum extracts	ヒトkeratinocyteを用いたNR-uptake法は、ハイロットとなる化学物質を検出できた。	Phytochemistry 8 306-309 (2001)
8	Clothier R., Willshaw A.	The Use of Human Keratinocytes in the EU/COLIPA Study on UV Filter Chemicals	NHK cells foreskins (human keratinocytes)	UVA and visible light UVA: 5J/cm <sup>2</sup>	NR-UPTAKE PIF and MPE	50 chemicals	EU/COLIPAでのphase 2 で使用した30品およびECVAM/COLIPAでの実用採取解の両方を含む材料について4名の男性から得られた初期段階のスクリーニングテストで評価した。それらの配分は313nmを用いた場合と比較して感受性は高くなかった。	ATLA 27 247-259 (1999)
9	Van Graff M., Boot J.H.	Photodynamic effects of protoporphyrin on the cellular level-an in vitro approach.	isolated hepatocytes (Wistar Rat)	UVA (420nm)	LDH leakage	protoporphyrin	protoporphyrinの光毒性メカニズムの評価。細胞膜へ取り込まれたprotoporphyrinが光照射により活性酸素を生成する。その取り込みは細胞と細胞輸送によって。細胞膜酸化が主な役割を演じている。	In Vitro Cell Dev Biol Anim. 32 394-398 (1996)
10	Rosen J.E., Prahalad A.K., Schluter G., Chen D., Williams G.M.	Quinolone antibiotic photodynamic production of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in cultured liver epithelial cells.	ARL-18cell (Adult Rat Liver)	UVA: 20J/cm <sup>2</sup>	8-oxo-dG formation	quinolones (lomefloxacin, ciprofloxacin).	キノロン系薬剤はUVA照射で活性酸素を放出するため光毒性を生じている。活性酸素によるDNA傷害の指標として8-oxo-dGを用いて光毒性を評価した。	Photochem Photobiol. 65 990-996 (1997)
11	Vandenbogaerde A.L., Guvele J.F., Proot P., Himpens B.E., Merlevede W.J., de Witte P.A.	Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin.	7 cells (A431, ME-180, HeLa, DU145, PC-3, MCF7, Hs913T, 3T3)	LW18w/30 fluorescent light	NR-uptake	hypericin	各細胞でhypericinによる光毒性が検出された。この差は細胞内のECFReceptorやP70Gpocroteinの発現とは無関係。細胞内glutathione濃度にも関係しなかった。しかし細胞内への取り込みが異なることが影響している。	J Photochem Photobiol B. 38 136-142 (1997)
12	Morgan J., Poter W.P., Overhoff A.R.	Comparison of photodynamic targets in a carcinoma cell line and its mitochondrial DNA-deficient derivative.	2008.2008E13 (human ovarian carcinoma cell lines)	red light fluorescent lamp	MTT assay	VBBO, photofrin NBA	光毒性反応による細胞死のメカニズムではミトコンドリアのカルシウム濃度が主な要因として考えられている。これに光増感剤を投与し当該吸収波長で毒性を比較した。	Photochem Photobiol. 71 747-757 (2000)

Table 4-15 その他の細胞を用いた試験法

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
13	Daniels F.J.	A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds.	Organism (candida albicans)	UVA (black light)	阻止ゾーン	furocoumarine, coal tar,	試験法は、感度が高くfurocoumarine系の光刺激性を検出できた。	J. Invest. Dermatol. 44 259-263 (1965)
14	Misra R.B., Joshi P.C.	Phototoxicity evaluation—Tetrahymena thermophila as an alternative model.	tetrahymena thermophila (原生動物)	UVA,B,C	DNA damage, oxidative stress sunlight glutathione estimation(GSH), glutathione e-s-transferase(GST) activity	46chemicals	tetrahymena thermophila (原生動物)の利用は光毒性物質の検出のほか、環境へのUVBの影響の評価やDNA損傷や酸化ストレスの評価系としても有用。	Indian J. Exp. Biol. 37 750-757 (1999)
15	Ojala T., Vuorela P., Kiviranta J., Vuorela H., Hiltunen R.	A bioassay using Artemia salina for detecting phototoxicity of plant coumarins.	Artemia salina (brine shrimp)	UVA(366nm)	生存数のカウント	psoralen, xanthotoxin, bergapten etc.	簡便で安価な大規模な光毒性スクリーニング法として有用。7印マシ系のみでなく他の化学物質にも適用できる。	Planta Med. 65 715-718 (1999)

Table 4-16 培養皮膚モデルを用いた試験法

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
16	Augustin C., Collombel G., Damour O.	Use of dermal equivalent and skin equivalent models for identifying phototoxic compounds in vitro.	DE(normal human fibroblasts)のカラーゲンゲル培養モデル SE(Demodel)にhuman keratinocytesを播種した。	UVA(0-50J/cm2)最適なのは 3J/cm2	MTT assay, IL-1alpha release assay	5chemicals	2つのモデルで1)UVAの影響、2)in vivo への対応性を比較した。UVAへの耐性は SE modelの方が高い。in vivoとの対応性は良好であった。	Photodermatol Photoimmunol Photomed. 13 27-36 (1997)
17	Edwards S.M., Donnelly T.A., Sayra R.M. and L.A. Rheins	Quantitative in vitro assessment of phototoxicity using a human skin model, Skin <sup>2</sup> ™.	skin2(ナイロノゲンに培養)	UVA: 2.9J/cm2	MTT assay	20chemicals	COLIPA task forceで利用したもの、in vitroとin vivoの結果の相関は良好。	Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 10 111-117 (1994)



Table 4-17 生体膜損傷を指標とした試験法 (photohaemolysis)

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals anthracene,bithionol, griseofulvin, hexachlorophene, protoporphyrin, psoralen,tertacycline etc.	要約	掲載誌
18	Kahn G., Fleischaker B.	Evaluation of phototoxicity of salicylanilides and similar compounds by photohemolysis.	human red blood cells	UVA and UVB,(290-370 or 320-400)	photohaemolysis		ソラン、テトラサイクリン等はnegative、anthracene,bithionol等はpositive.	J. Invest. Dermatol. 56 91-97 (1971)
19	Hetherington, A.H. and B.E. Johnson	Photohemolysis.	human red blood cells	UVA and UVB, visiblelight	photohaemolysis, Drabkin solution	plant extracts	psoralen等のDNA損傷との光毒性は評価できないが腫瘍促進によるものは検出できる。試験法の記述が主体。	Photodermatology 1 255-260 (1984)
20	Pape W.J., Maurer T., Pfannenbecker U., Steiling W.	The red blood cell phototoxicity test (photohaemolysis and haemoglobin oxidation): EU/COLIPA validation program on phototoxicity (phase II).	human red blood cells	UVA	photohaemolysis, PHF	31 chemicals	EU/COLIPAプログラムのコアリストの1つ。溶血とメモグラフィン形成の2つのエンドポイントを組み合わせた試験法。	Altern. Lab. Anim. 29 145-62 (2001)
21	Sugiyama M., Itagaki H., Hayashi T., Murakami N. and S. Kato	In vitro assay to predict phototoxicity of chemicals: (1) Red blood cell hemolysis assay.	human red blood cells	UVA and UVB,(290-370,320-400)	photohaemolysis	fragrances,UV filters,RB,CPZ,TCC,TBS A(23種)	モルモットの結果との相関を評価。結果の一致性は73%	AATEX 2 183-191 (1994a)
22	Vargas F., Mendez H.	Study of the photochemical and in vitro phototoxicity of chlorthalidone [2-chloro-5-(1-hydroxy-3-oxo-1-isoindolinyl)benzene sulfonamide].	human red blood cells	UVB	photohaemolysis	chlorthalidone	chlorthalidoneは、酸素存在下で photohaemolysis	Pharmazie 54 920-922 (1999)
23	Traynor N.J., Johnson B.E.and N.K. Gibbs	Photohaemolysis assay for drugs phototoxicity complicated by 'bleaching' of released haemoglobin.	human red blood cells	UVA(320-400nm: 18J/cm2)	photohaemolysis, Drabkin solution	NSAIDs (anti-inflammatory drugs)	溶出したヘモグロビンの測定に対する酸素の影響を小さくするため、Drabkin solutionを加えて試験精度を確保した試験法。	Toxicol. in Vitro 10 619-624 (1996)

Table 4-18 タンパク質に対する作用を指標とした試験法

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
24	Pendington R.U. and M.D. Barratt	Molecular basis of photocontact allergy.	HSA (human serum albumin)	UV light	photoprotein binding	10chemicals	光感作性物質によるハグ結合は、フリーランカルによって生じる。今回の資料中の5種に電子スピン共鳴測定でフリーランカルの発生が確認されている	Int. J. Cosmet. Sci. 12 91-103 (1990)
25	Barratt M.D. and K.R. Brown	Photochemical binding of photoallergens to human serum albumin: A simple in vitro methods for screening potential photoallergens.	HSA (human serum albumin)	UVA	photoprotein binding	8chemicals	光感作性にスクリーニング法として有用。	Toxicol. Lett. 24 1-6 (1985)
26	Lovell W.W.	A scheme for in vitro screening of substances for photoallergenic potential.	serum albumin, gamma-globulin, insulin,	UVA	photoprotein binding	13chemicals	光毒性物質は、重項酸素を発生し、アミノ酸残基を酸化する反応を生じるが、光感作性物質はハグ結合との結合することが多い。	Toxicol. in Vitro 7 95-102 (1993)

Table 4-19 その他の化学物質を用いた試験法

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
27	Kawada A., Hatanaka K., Gomi H., Matsuo I.	In vitro phototoxicity of new quinolones: production of active oxygen species and photosensitized lipid peroxidation.	histidine, squalene, RNO(6-nitroso-n-dimethylaniline)TBA (thiobarbituric acid)TEP(tetrathoxy propane	UVA: 20J/m2	histidine のミグノール環の過酸化による中間体によるRNOの棕色を440nm経過、TBA反応によりsqualeneの脂質過酸化を評価。	quinolone, nalidixic acid	quinoloneの光毒性のメカニズムを解明として活性酸素種の影響について評価した。特に重項酸素の関与についてsqualeneの過酸化を指標として評価した。	Photodermatol Photoimmunol Photomed.15 226-230 (1999)
28	Lovell W.W. and D.J. Sanders	Screening test for phototoxins using solutions of simple biochemicals.	histidine, glutathione, triptophan solution photooxidation	UVA	基質の光過酸化を測定	8-MOP anthracene, rose bengal, TBS etc.	histidineはRB, anthracene, acridineについて反応した。8-MOPは低かった。	Toxicol. in Vitro 4 318-320 (1990)
29	Yan C., Liao K., Hu Y., Xu Y.	Quantitative in vitro assessment of drug phototoxicity by a chemiluminescence method.	NADH, luminol	UVA(310-400)	NADH存在下でUVAを照射した場合のluminolによる化学発光を測定。	doxycycline, pipemidic acid, griseofulvin etc.	化学発光法NADHに薬物を添加しUVA照射し、luminolを加えて化学発光を検出する。(LV=luminescent value) doxycycline, pipemidic acid, griseofulvinの光毒性が検出できた。Chlorpromazine は検出できなかった。活性酸素とフリーランカルによるものは検出できる。	Chin. Med. J. (Engl). 112 501-503 (1999)

Table 4-20 試験法の組み合わせによる評価

No.	著者	標題	細胞	光源	評価方法	chemicals	要約	掲載誌
30	Bosca F., Carganico G., Castell J.V., Gomez-Lechon M.J., Hernandez D., Mauldon D., Martinez L.A., Miranda M.A.	Evaluation of ketoprofen (R/S and R/S) phototoxicity by a battery of in vitro assays.	linoleic acid, red blood cells, MRC-5(human fibroblast)	UVA (300-600nm)	photoperoxidation of linoleic acid, photohaemolysis, cytotoxicity of hepatocytes or fibroblasts(LDH release)	ketoprofen	BHT,還元glutathionの添加で溶血・リノレン酸の過酸化は抑制された。	J. Photochem. Photobiol. B, 31 133-138 (1995)
31	PapeW.J.W., Brandt M. and U. Plannenbecker	Combined in vitro assay for photohaemolysis and haemoglobin oxidation as part of a phototoxicity test system assessed with various phototoxic substances.	red blood cells ( calf blood)	UVA 15J and UVB 1J	photohaemolysis and photo oxidation of oxyhaemoglobin	12chemicals(EU/CO LIPA)	proxicamと8-MOPは反応しなかった。それ以外はどちらかに反応した。	Toxicol. in Vitro 8 755-757 (1994a)
32	Sugiyama M., Itagaki H. and S. Kato	Photohemolysis test and Yeast growth inhibition assay to assess phototoxic potential of chemicals.	RBC (human), yeast	UVA	photohaemolysis yeast growth inhibition	24chemicals	モルモットの結果と比較し、一致性は溶血73%、酵母は81%であった。2試験のbatteryではfalse negativeが減少し良好な結果が得られた。	In : A.Rougier, A.M. Goldberg and H. Maibach (Eds), Alternative Methods in Toxicology vol.10, In Vitro Skin Toxicology, Irritation, Phototoxicity, Sensitization, Mary Ann Liebert, New York, pp. 213-221 (1994b)
33	Lovell W.W., Jones P.A.	Evaluation of mechanistic in vitro tests for the discrimination of photoallergic and photolirrant potential.	Histidine, HSA (human serum albumin)	UVA and visible light	histidine photooxidation and photobinding to HSA	30chemicals(EU/CO LIPA)	histidineの光酸化は光刺激性のメカニズム評価のスクリーニングに有用。しかし光感作性物質のみが光タンパク結合を有することはなく、これらの鑑別には2つのbatteryが有用であった。	Altern. Lab. Anim. 28 707-724 (2000)