

急性毒性試験代替法の検討 (2)

I. 2 施設間における 2 種の細胞毒性試験の安定性

若栗忍¹、北垣雅人²、板垣宏²、豊田英一²、田中憲穂¹、
¹(財) 食品薬品安全センター秦野研究所、²(株) 資生堂 安全性・分析センター

Alternative study for acute systemic toxicity in vivo (2) I. Stability of two
 cytotoxicity tests between two labs
 Wakuri Shinobu¹, Kitagaki Masato², Itagaki Hiroshi², Toyoda Hidekazu², and Tanaka
 Noriho¹
¹Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, ²Shiseido Safety and
 Analytical Research Center

【目的】

近年、細胞毒性試験が急性毒性試験の代替となり得る可能性が高まり、ICCVAM においてもバリデーションスタディが行われている。しかしながら、個体における全身急性毒性値 (LD₅₀ 値) と単なる細胞死 (IC₅₀ 値) にはいくつかの大きなギャップがある。それは薬物の生体内での ADME による薬物代謝、蛋白結合、脳血液関門、レセプター等の存在などである。細胞毒性試験に代謝系を導入する事で得られる IC₅₀ 値が全身急性毒性試験における LD₅₀ 値に近似してくるのではないかと、いうことはよく考えられることである。そこで、代謝活性化を導入する前に、まず、急性毒性試験の結果が得られている 22 種の薬剤を用いて、BALB/3T3 細胞および SIRC 細胞を用いて IC₅₀ 値を算出し、細胞株で毒性反応に差があるか等の試験方法に関する予備的な試験を実施し、代謝活性化の系を開始するための基礎データを得ることを目的とし、本研究を行った。

【方法】

細胞はマウス由来 BALB/3T3 clone A31 (BALB/3T3) 細胞と、ウサギ角膜由来の SIRC 細胞を用いた。両細胞は ATCC より購入した。NR 試験は ECVAM の NR 試験のプロトコールに従った。ただし、血清は new born calf serum でなく calf serum (CS) を用いた。培養および播種では 10% CS 添加 DMEM 培地を、処理では 5% CS 添加 DMEM 培地を用いた。

細胞を 10⁴/ウェルとなるように播種後、翌日、被験物質入りの培地で細胞を 24 時間処理した。処理後、細胞を PBS (+) で洗浄し、NR 含有培地で 3 時間 NR を取り込ませた。PBS (+) により細胞を洗浄後、抽出液で色素を抽出し、吸光度 (OD₅₄₀) を測定した。

クリスタルバイオレット (CV) 法は、資生堂で実施しているプロトコールに従って実施した。

96 ウェルプレートに被験物質入りの培地を調製後、細胞を 3×10⁴/ウェルとなるように播種し、72 時間培養した。処理後、細胞を PBS (-) で洗浄し、CV 溶液を加え、30 分間染色した。染色後、プレートを手洗い、吸光度を測定した。吸光度測定は使用するマイクロプレートリーダーの関係から、OD₅₈₈ または OD₆₀₀ で行った。また、試験は 2 施設間評価を試みることから、試験法プロトコール、血清、細胞は両施設、同一条件で実施した。また、試験溶媒は、基本的に同じものを使用した。数検体で異なる溶媒を使用した。試験は濃度設定の為の予備試験を行ったあと、本試験は 2 回実施した。

【結果及び考察】

2 回の本試験で得られた結果は、各ラボともラボ内での 1 回目と 2 回目の本試験の IC₅₀ 値を比較すると、どちらの試験法においても非常に高い相関が認められた。用量曲線に関してもほぼ同一の傾向を示し、ラボ内での値が安定していることが示された。また、各ラボにおける IC₅₀ 値を比較すると、個々の物質に関して NR 法においては 1.0-15 倍程度の、CV 法においては 1.1-9.8 倍程度の違いが認められた。

NR 法と CV 法の処理条件をみると、NR 法では 10⁴/ウェルの細胞を播種し、処理時間は 24 時間、一方、CV 法では 3×10⁴/ウェルの播種数で 72 時間処理であり、細胞数からは NR 法が、処理時間からは CV 法が感度がよいと考えられるが、結果的には、両細胞株のそれぞれの試験法によって、結果が大きく異なる事はなく、各ラボにおける NR 法と CV 法の相関は非常に高かった。