

評価会議報告書

急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験

JaCVAM 評価会議

平成 31 年（2019 年）4 月 24 日

JaCVAM 評価会議

大野 泰雄（公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団）：座長
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所）
石井 雄二（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
井上 智彰（日本免疫毒性学会）
今井 教安（日本動物実験代替法学会）
岩瀬裕美子（日本製薬工業協会）
篠田 和俊（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
杉山真理子（日本化粧品工業連合会）
仲井 俊司（日本化学工業協会）
中村るりこ（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）
西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
沼澤 聡（日本毒性学会）
野口 真希（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）*
森田 健（日本環境変異原学会）
横関 博雄（日本皮膚免疫アレルギー学会）

任期：平成 28 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

*：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

大野 泰雄（公益財団法人 木原記念横浜生命科学振興財団）：座長
五十嵐良明（国立医薬品食品衛生研究所）
石井 雄二（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
稲若 邦文（日本化学工業協会）
井上 智彰（日本免疫毒性学会）
今井 教安（日本動物実験代替法学会）
岩瀬裕美子（日本製薬工業協会）
久保 文宏（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
杉山真理子（日本化粧品工業連合会）
中村るりこ（独立行政法人 製品評価技術基盤機構）
西川 秋佳（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター/済生会宇都宮病院）
西村 次平（独立行政法人 医薬品医療機器総合機構）
沼澤 聡（日本毒性学会）
平林 容子（国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター）
増村 健一（日本環境変異原学会）
横関 博雄（日本皮膚免疫アレルギー学会）

任期：平成 30 年 4 月 1 日～令和 2 年 3 月 31 日

急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験（以下、本試験法）は、動物を用いた急性経口毒性試験（固定用量法 TG420¹⁾、急性毒性等級法 TG423²⁾、上げ下げ法 TG425³⁾の3種類（以下、*in vivo* 試験法）の代替として開発された試験法である（なお、動物を用いた試験 TG401 は使用動物数の削減 [Reduction] の観点より OECD の試験法ガイドラインから 2002 年に削除されている）。本試験法は、細胞毒性を評価する方法として広く一般に利用されている「3T3 細胞を用いた Neutral Red Uptake cytotoxicity assay (3T3 NRU)」の結果から、*in vivo* 試験法での急性経口毒性試験における致死量が 2,000mg/kg より高いか否かを予測する手法である。

本試験法を「*in vivo* 試験法の初回投与量設定」の目的で利用することが、ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods : 米国代替法に関する省庁間連絡会議) から 2006 年に提案されており⁴⁾、また、OECD ガイダンス文書 No.129 (Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests : 2011 年)⁵⁾においてもこのような利用が推奨されている。JaCVAM 評価会議では、急性毒性試験代替法評価委員会により作成された「*in vitro* 細胞毒性試験による急性経口毒性試験の初回投与量設定試験の第三者評価報告書 (2011 年)」⁶⁾を用いて、本試験法のこの目的での利用の妥当性について評価している⁷⁾。

一方、本試験法を「*in vivo* 試験法のエンドポイントである動物の半数を致死させる用量 (LD₅₀ 値) が 2,000 mg/kg 以下でない」こと、すなわち EU CLP 等で「区分外」（あるいは UN GHS で「区分 5 または区分外」）であることを判別する目的で利用することが、ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods : 欧州代替法評価センター) から提案され、バリデーション研究が実施されている⁸⁾。

今回、JaCVAM 評価会議は、この ECVAM の提案に対して急性毒性試験資料編纂委員会により作成された「急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験の評価報告書 (2018 年)」⁹⁾を用いて、「LD₅₀ 値が 2,000 mg/kg 以下でない」ことを判別する目的での本試験法の利用の妥当性について検討した。

1. 試験法の定義

名称： 急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験

代替する対象毒性試験： 動物を用いた急性経口毒性試験（以下の3種類の *in vivo* 試験）

- ・ 固定用量法 (TG420)¹⁾
- ・ 急性毒性等級法 (TG423)²⁾
- ・ 上げ下げ法 (TG425)³⁾

試験法の概略： 本試験法は、げっ歯類由来の細胞株 (BALB/c mouse fibroblasts : 3T3) を用いた細胞毒性試験である。被験物質を 3T3 に曝露し、水溶性の弱陽イオン超生体染色色素である Neutral Red (NR) の細胞への取り込み量をもとにした細胞生存率を測定して 50%細胞生存濃度 (IC₅₀) を算出する。これは、正常な細胞では NR は細胞形質膜を透過して酸性のライソゾームマトリクスに蓄積されるが、傷害が生じた細胞

には取り込まれる NR が減少することに基づいている。NR の取り込み量と生細胞数が比例関係にあることを利用して細胞毒性の評価が可能である。この IC₅₀ 値を、参照物質について別途求められている「LD₅₀ 値と IC₅₀ 値の関係式」に代入し、算出された LD₅₀ の予測値から、被験物質が「LD₅₀ 値 > 2,000 mg/kg」であるかどうかを判断する。なお、IC₅₀ から LD₅₀ の予測に使用される関係式は以下の 2 種類が利用できる (LD₅₀ 値と IC₅₀ 値の表記単位はモル濃度あるいは重量濃度が使用されている) ^{8,9)}。試験法の詳細については、ECVAM (2011)⁸⁾を参照されたい。

① Millimole regression model (モル濃度関係式)

$$\text{Log LD}_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.439 \log \text{IC}_{50} (\text{mM}) + 0.621$$

② Weight regression model (重量濃度関係式)

$$\text{Log LD}_{50} (\text{mg/kg}) = 0.372 \log \text{IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2.024$$

(上記の関係式が ECVAM での本試験法のバリデーションで利用されている。

①は分子量が明確で純度の高い物質に適しており、②は混合物や構造/分子量が不明な物質や不純物の割合が高い物質に使用できる。なお、②は高分子量の物質では明らかに毒性を過大評価することが判明している。) ^{8,9)}

2. 評価に用いた資料および評価内容の科学的妥当性

3T3 細胞を用いた Neutral Red Uptake cytotoxicity assay (3T3 NRU) は細胞毒性試験として広く使用されており、データも豊富である。また、3T3 NRU は ICCVAM が提案した「*in vitro* 細胞毒性試験による急性経口毒性試験の初回投与量設定試験」⁴⁾として検証された試験系であり、陽性対照等の試験成立基準などの実施手順も整備されていることから、本試験法の適用可能な範囲が遵守されている場合は、試験法として妥当であると判断される。

本試験法を「LD₅₀ 値が 2,000 mg/kg 以下でない」ことを判別する目的で利用することについては、ECVAM で検証され、また、その結果は公表されており ⁸⁾、透明性が高く、独立した科学的評価が行われている。本邦においては、JaCVAM 急性毒性試験資料編纂委員会がこれらの資料を用いて本試験法を評価している ⁹⁾。

なお、本細胞毒性試験のエンドポイントは細胞死である。*In vitro* 試験における細胞死は基本的な細胞機能への影響の結果 (basal cytotoxicity) であり、化学物質による細胞死が誘発される濃度域においては、個体においても同様のメカニズムが働き、細胞毒性が現れていると考えられている ¹⁰⁾。一方、*in vivo* 試験法のエンドポイントは動物の病的状態あるいは個体死であり、両者は大きく異なっているように思われる。すなわち、細胞死と個体死のメカニズムが異なる可能性がある場合は、本試験法の利用は妥当ではない。

以上の点から、本試験法は、**basal cytotoxicity** に基づく *in vivo* 個体毒性を検出することに起因する限界を理解した上で利用するならば、*in vivo* 試験法の代替法として科学的妥当性があると判断する。したがって、類似構造のものが他に存在しない新規化合物については本試験法のみで評価することは困難である。

3. 本試験法の有用性と適用限界

本試験法は、動物を使用しておらず、3Rs の精神に合致している。

本試験法は細胞毒性を評価する方法として広く一般に利用されている 3T3 NRU を利用した試験系であり、技術移転性は高いと判断できる。「LD₅₀ 値が 2,000 mg/kg 以下でない」ことを判別する目的で利用する場合の妥当性の評価が 3 施設の協力において実施された^{8,9)}。その結果、施設内および施設間再現性は高く、毒性が過小評価される確率も低かったが、試験精度をより高めるためには、化学物質の揮発性、溶解性等の物性や毒性発現機序に関する情報も必要になると判断された。なお、培養系における細胞毒性発現濃度は、使用される細胞の種類や培養条件により大きく変わる可能性がある¹⁴⁾ことから、前記の関係式を用いる場合は、それらのバリデーションに使用された培養条件⁸⁾に厳密に従う必要がある。また、条件を変更する場合には、その妥当性について確認する必要がある。

施設内再現性は、モル濃度関係式と重量濃度関係式の 2 つのモデルについて評価され、前者のモデルでは 94%~100%、後者のモデルでは 93%~98%であった。揮発性、溶解性等に問題のある化学物質の再現性は低かったが、それ以外の化学物質についての再現性は高かった。施設間再現性も評価され、施設内再現性の結果と同様であった。

予測性についてはモル濃度関係式と重量濃度関係式の 2 つのモデルにより評価された結果を表 1、2 に示した。

表 1. 3 施設での予測性の比較 (モル濃度関係式)

	施設1	施設2	施設3
評価物質(総数)	44	51	54
一致度	64% (28/44)	67% (34/51)	65% (35/54)
「LD ₅₀ 値 >2,000 mg/kg」 の物質を正しく予測 (特異度)	42% (11/26)	44% (12/27)	40% (12/30)
「LD ₅₀ 値 ≤2,000 mg/kg」 の物質を正しく予測 (感度)	94% (17/18)	92% (22/24)	96% (23/24)

表 2. 3施設での予測性の比較（重量濃度関係式）

	施設 1	施設 2	施設 3
評価物質（総数）	40	46	47
一致度	53% (21/40)	57% (26/46)	55% (26/47)
「LD ₅₀ 値 >2,000 mg/kg」 の物質を正しく予測 （特異度）	17% (4/23)	17% (4/24)	13% (3/24)
「LD ₅₀ 値 ≤2,000 mg/kg」 の物質を正しく予測 （感度）	100% (17/17)	100% (22/22)	100% (23/23)

本試験法は以下のような物理化学的性質を有する物質は適用範囲外である^{8,9)}。

- ① 細胞培養液に不溶性の物質
- ② 低分子量の物質
（モル濃度関係式を用いる場合には分子量 174 以下の物質および重量濃度関係式を用いる場合には分子量 77 以下の物質）
- ③ 細胞培養液と反応する物質
- ④ 揮発性の高い物質
- ⑤ 細胞に残留する性質を有する赤色、あるいは NR の吸光度測定を阻害する有色の物質

本試験法は以下のような毒性発現機序や細胞機能への影響を有する場合は偽陰性が生じることがあるので注意が必要である^{8,9)}。

- ① 代謝により活性化されて毒性を発現する物質
- ② 神経毒性や心臓毒性等、臓器特異的な作用機序により毒性を発現する物質
- ③ ライソゾームへ特異的な影響を与え、この結果、細胞内の NR の挙動（結合や保持など）に影響を与える物質

本試験法では 2,000 mg/kg を閾値として、LD₅₀ 値がそれ以下で無いことの評価が可能であることが示されている。ただし、本試験法で評価する場合は、類似性が高い物質についての毒性の知見や、評価物質について生体影響に関する周辺情報（例えば、28 日間反復投与毒性試験の情報を用い、NOAEL が 200 mg/kg/day より大きいなど）があることが望ましい^{11,12,13)}。なお、臓器特異的な毒性発現を示す化合物の 3T3 細胞に細胞死を引き起こす機序の解析を進めることにより、適用範囲を広げることができる可能性がある。

4. 目的とする物質又は製品の毒性を評価する試験法としての、社会的受け入れ性および行政上の利用の可能性

社会的受け入れ性：

本試験法は、生きた動物を用いないという点で、動物実験代替法の 3Rs の原則に適った試験法である。また、本試験法の、技術移転性は高いと判断できる。

以上の観点から、本試験法の社会的受け入れ性は高いと判断する。

行政上の利用性：

本試験法の特性とその適用範囲を十分に考慮し、厳密にバリデーション時のプロトコル⁸⁾に従って利用されるならば、「急性経口毒性の LD₅₀ 値が 2,000 mg/kg 以下でない」ことの判別を目的として本試験法を行政的に利用できる可能性がある。本試験法を利用する場合は、「市場で既に使用実績があり、急性経口毒性が弱いことが示唆される豊富な情報がある物質」、「構造・物理化学的性質・体内挙動などの特性について、急性経口毒性が既知の物質との類似性が極めて高いことが説明できる物質」などを適用対象とし、信頼性の高い他の情報と組み合わせて weight of evidence による評価を行うことを推奨する。

また、このような本試験法の特性を踏まえると、本試験法の利用が想定されるのは「毒物および劇物取締法」における劇物を含む製剤の除外申請、医薬部外品の製造販売承認申請および化粧品ポジティブリストの改正要請である。

参考文献

- 1) OECD (2002) Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, 10.1787/20745788
- 2) OECD (2002) Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, 10.1787/9789264071001-en
- 3) OECD (2008) Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, 10.1787/9789264071049-en.
- 4) ICCVAM. (2006) BACKGROUND REVIEW DOCUMENT *In Vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity
- 5) OECD (2011) Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. Series on Testing and Assessment No. 1292010.
- 6) JaCVAM 急性毒性試験代替法評価委員会：急性毒性試験代替法の第三者評価報告書 *In vitro* 細胞毒性試験による急性経口毒性試験の初回投与量設定試験（2011年1月14日）。
- 7) JaCVAM 評価会議：単回投与毒性試験代替法の評価会議報告（2011年4月20日）。
- 8) ECVAM (2011) PP, Agnieszka Kinsner-Ovaskainen, Anita Tuomainen. Follow-up study on the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay to correctly identify substances not classified for acute oral toxicity under the EU CLP system (LD₅₀ > 2,000 mg/kg).
- 9) JaCVAM 急性毒性試験資料編纂委員会：急性毒性試験代替法の第三者評価報告書 急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験（2018年12月11日修正）。

- 10) Ekwall B. et al. (1998) MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity: Part V. Rodent and Human Toxicity Data for the 50 Reference Chemicals. *Altern Lab Anim*; 26 Suppl 2:571-616. PMID: 26042662
- 11) EURL ECVAM (2013) Recommendation on the 3T3 NRU Assay for Supporting the Identification of Substances Not Requiring Classification for Acute Oral Toxicity, Report EUR 25946 EN.
- 12) ECHA (2017) Guidance on information requirements and chemical safety assessment, chapter R.7a: endpoint specific guidance.
- 13) Prieto P. et al. (2013) Assessment of the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity ($LD_{50} > 2,000$ mg/kg): results of an ECVAM validation study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65(3) 344-365.