

急性毒性試験代替法の第三者評価報告書

評価対象試験： *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

In vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses
for Acute Oral Systemic Toxicity Test

平成 22 年 5 月 31 日 草案

平成 22 年 10 月 18 日 改訂

平成 22 年 11 月 11 日 改訂

平成 23 年 1 月 14 日 改訂

急性毒性試験代替法評価委員会

委員長	高橋 祐次	(国立医薬品食品衛生研究所)
委員	笠原 利彦	(富士フイルム株式会社)
	若栗 忍	((財)食品薬品安全センター秦野研究所)
	小平 輝朋	(旭化成ファーマ株式会社)
	岩井 久和	(株式会社三和化学研究所)
	萩野 滋延	(株式会社資生堂)
	河野 茂生	(ブリストル・マイヤーズ株式会社)
	岩瀬 裕美子	(田辺三菱製薬株式会社)

目次

略語	2
要旨	5
1. 試験法の科学的、規制の上での妥当性	7
2. 試験法の妥当性	14
3. バリデーションに用いられた物質の分類と妥当性	21
4. 試験法の正確性を評価するために用いられた参照化合物の <i>in vivo</i> 参照データ	25
5. 試験法のデータと結果の利用性	27
6. 試験方法の正確性	28
7. 試験方法の信頼性	32
8. 試験方法のデータの質	35
9. その他の試験方法の科学的な報告	37
10. 3Rs への関与	39
11. 試験方法の有用性と限界	41
12. 結論	43
13. 参考文献	45

略語

ADME	Absorption, distribution, metabolism, and elimination
ANOVA	Analysis of variance
ATC	Acute Toxic Class method
ATWG	Acute Toxicity Working Group
BRD	Background Review Document
	本報告書では <i>In Vitro</i> Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity (NIH Publication No. 07-4518)を示す。
CNS	Central nervous system
CV	Coefficient of variation
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EC ₅₀	Concentration of a substance that produces 50% of the maximum possible response for that substance
ECBC	U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
ETOH	Ethanol (Ethyl alcohol)
FAL	FRAME Alternatives Laboratory
FDP	Fixed Dose Procedure
FRAME	Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments
GHS	Globally Harmonized System (of Classification and Labeling of Chemicals)

GLP	Good Laboratory Practices
HBSS	Hanks' balanced salt solution
IC ₅₀	Concentration producing 50% inhibition of the endpoint measured
ICCVAM	Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods
IIVS	Institute for In Vitro Sciences
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenous
KBM	Keratinocyte basal medium
Kow	Octanol-water partition coefficient
LD ₅₀	Dose that produces lethality in 50% of test animals
MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide
N	Number (of substances)
NHK	Normal human epidermal keratinocytes
NICEATM	National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
NR	Neutral red
NRU	Neutral red uptake
OD	Optical density
OD ₅₄₀	Optical density (absorbance) at a wavelength of 540 nm
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Positive control
pH	Power of hydrogen

QA	Quality assurance
QC	Quality control
r	Pearson correlation coefficient
R ²	Coefficient of determination
r _s	Spearman correlation coefficient
RC	Registry of Cytotoxicity
RI	Radioisotope
RTECS [®]	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
SD	Standard deviation
SLS	Sodium lauryl sulfate
SMT	Study management team
3T3	BALB/c mouse fibroblasts, clone A31 (ATCC # CCL-163)
UDP	Up-and-Down Procedure
VC	Vehicle control
ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (German Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments)

要旨

本報告書は、「*in vitro* 細胞毒性試験による急性毒性試験の初回投与量設定試験」のバリデーショ
ン研究を ICCVAM が第三者評価し、その情報をまとめた Background Review Document (BRD)を
もとに JaCVAM 急性毒性試験代替法評価委員会が第三者評価を実施したものである。

化学物質のハザードを評価する急性毒性試験はげっ歯類を使用して実施されている。急性毒性
試験によって得られる LD₅₀ 値 (Dose that produces lethality in 50% of test animals、半数致死量)
は、GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals)における化合
物の分類及びラベリング、日本においては毒物及び劇物取締法の判定基準に利用されている。そ
の一方で、動物の死亡をエンドポイントとする試験方法に対する批判があり、また、ヒトが化合物を
過剰摂取した場合における急性毒性試験データの有用性に関して議論がある。細胞毒性試験を
用いた代替法が検討されてきたが、規制当局が受け入れ可能な信頼性、妥当性、有用性及び適
応範囲を評価した試験は存在していない。現在、OECD 毒性試験法ガイドラインの急性経口毒性
試験は、Fixed Dose Procedure (OECD 420 : FDP)、Acute Toxic Class method (OECD 423: ATC)
及び Up-and-Down Procedure (OECD 425:UDP)が採択されている。これらのガイドラインは、あ
らかじめ設定された 4 または 8 段階の用量の一つを選択して動物に投与し、死亡した場合には低
用量、生存した場合には高用量を逐次投与することで化合物の LD₅₀ が求められるようにデザイン
されている。従って、適切な初回投与量の選択が使用動物数削減の鍵となる。

本試験方法は、使用動物数の削減を目的として、細胞毒性試験から急性毒性試験の初回投与用
量を推測する *in vitro* アプローチである。具体的には、Neutral Red Uptake (NRU) 法による細胞毒
性試験で IC₅₀ 値 (mM) を求め、RTECS®のデータを基にした LD₅₀ 値 (mmol/kg) と IC₅₀ 値の回帰式
から急性毒性試験の初回投与用量を推測する。本試験方法のバリデーシオンは、GHS 急性経口
毒性の区分全体に分布するように選択した 72 種類の参照化合物の細胞毒性試験を、ヒト細胞株
(Normal human epidermal keratinocytes; NHK) 及びげっ歯類の細胞株 (BALB/c mouse
fibroblasts; 3T3) を用いて実施した。

LD₅₀ 値と IC₅₀ 値の相関性から急性毒性試験の初回投与用量を推測する回帰式が得られているが、
動物の死と細胞の死が類似するメカニズムの説明が不十分であると考えられる。相関性は必ずしも因
果関係を説明するものではない。また、溶解性、沈殿物及び揮発性を有する化合物、代謝活性に
より毒性を発現する化合物、肝、中枢神経、腎、心臓、肺及び造血器に対する特異的な毒性を有
する化合物は細胞毒性試験では評価することができないため、試験対象から除外すべきである。

細胞毒性試験方法は妥当であると判断するが、用量設定、媒体、被験物質の調製に使用する試験管、被験物質の添加方法は試験精度が担保できる範囲で自由度を持たせるべきである。

本試験法によって予測された LD₅₀ を GHS 区分全体に渡って評価すると 3T3 では 31% (21/67)、NHK 細胞では 29% (20/68) であり、特に強毒性を示す化合物の予測性は低かった。毒性メカニズムの面からは、中枢神経系と心臓への作用を示す化合物ではずれ値が認められた。この成績からも、臓器特異的な毒性を示す化合物の予測性は低く評価に適さない。

バリデーション試験は 3 施設において、GLP または GLP の精神で実施された。データの質については問題がないと判断した。

使用動物の削減数については、コンピュータによるシミュレーションにより評価している。一試験あたり、UDP 法では平均 0.49 匹～0.66 匹、ATC 法では平均 0.51 匹～1.09 匹の動物が削減されることが示された。特に弱毒性物質の場合 (LD₅₀ 値:>2000 mg/kg 又は>5000 mg/kg)、UDP 法では 1.28 匹～1.65 匹、ATC 法では 2.03 匹～3.33 匹の動物が削減されることが示された。使用動物の削減には本当に繋がる試験であるかは、実際に使用した動物数が記載されている化合物の試験情報と、この試験で予測された初回投与量から予測される動物数を比較して検証することが必要である。また本試験法をガイドラインに導入した場合には、試験情報を集計して動物数の削減が実現できているかについて検証する必要がある。また、強毒性の化学物質の予測性が低いことは動物へ与える苦痛の低減にはつながらない。

以上のことから、ICCVAM で実施された細胞毒性試験による急性毒性試験の初回投与量設定試験の第三者評価は、バリデーションに必要な項目、プロセス及びデータが検討されており、ICCVAM のバリデーション結果を受け入れることに問題はないと判断した。本試験方法は低毒性の化合物については予測性があり、動物数の削減できる可能性が示されていることから、急性毒性試験の初回投与量決定の情報として必要に応じて活用可能であると判断する。しかしながら、強毒性に分類される化合物の予測性は低く、動物へ与える苦痛の低減、使用動物数削減に寄与は低い。臓器特異的な毒性を有する化合物の評価には適しておらず、揮発性を有する物質、溶解度が低い物質の試験は実施が困難である。したがって、急性毒性試験の実施に際して、一律に本試験法を用いて初回投与量を決定することは合理的ではなく、化合物の物性、類縁化合物の情報と同様の位置づけとして利用することが望ましい。

1. 試験法の科学的、規制の上での妥当性

化学物質のハザードを評価する急性毒性試験はげっ歯類を使用して実施されている。急性毒性試験によって得られる LD₅₀ 値 (Dose that produces lethality in 50% of test animals、半数致死量) は、GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals)における化合物の分類及びラベリング、日本においては毒物及び劇物取締法の判定基準に利用されている。その一方で、動物の死亡をエンドポイントとする試験方法に対する批判があり、また、ヒトが化合物を過剰摂取した場合における急性毒性試験データの有用性に関して議論がある。

動物愛護の観点から、急性毒性試験の代替法が検討されてきた。

1983 年にはスウェーデンの Society for Cell Toxicology は The Multicentre Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity (MEIC) プログラムを立ち上げ *in vitro* 試験とヒトの経口摂取致死量における血中濃度を比較検討した。

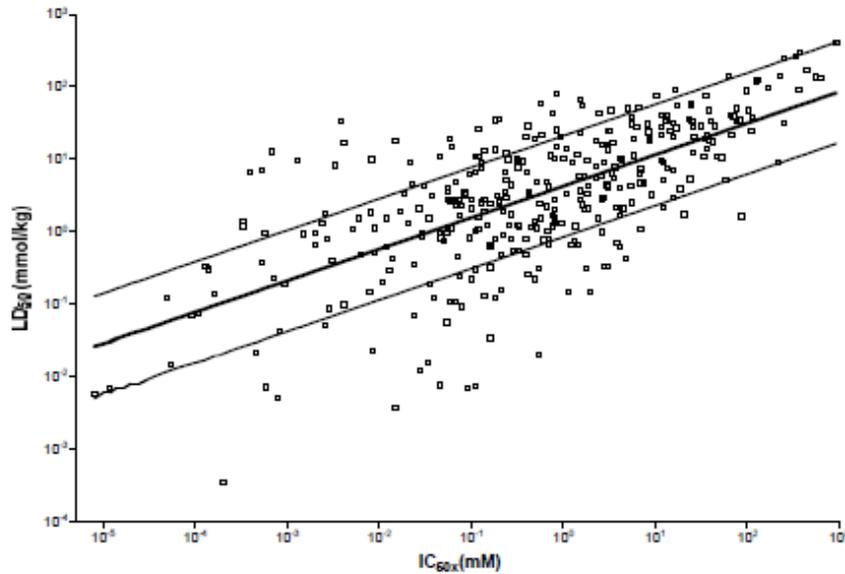
1992-1993 年には、The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME)がげっ歯類の急性致死性を複数の *in vitro* 試験 (MTT reduction、LDH release、cell function) で予測する事を検討した。げっ歯類における化合物の急性致死性の予測には *in vitro* 試験のバッテリー (①細胞死、②肝細胞毒性、③細胞毒性が現れない濃度域における細胞膜電位への干渉) として評価することが推奨された。中でも、細胞死を指標とした試験では、細胞株 (V79、3T3-L1 または BALB/c 3T3)、暴露時間 (24-72h) 及びエンドポイント (MTT または NRU) によって評価に大きな差異が認められないことが示された。

1998 年及び 2003 年、Dr. Willi Halle は RTECS[®] から分子量が既知である化合物のげっ歯類における LD₅₀ 値と細胞株及びエンドポイントが多様な細胞毒性試験の IC₅₀ 値を比較したデータベースである Registry of Cytotoxicity (RC) を報告した。RC では細胞毒性試験で得られた IC₅₀ 値のモル濃度 (mM) とげっ歯類の LD₅₀ 値を mmol/kg に変換した数値の相関が以下の回帰式 (RC millimole regression) で示された。

$$\log \text{LD}_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.435 \times \log \text{IC}_{50} (\text{mM}) + 0.625$$

この回帰式には、参照した化合物の 73% (252/347) の化合物が含まれる。

RC millimole regression (BRD より抜粋)

Figure 1-1 RC Millimole Regression for *In Vitro* Cytotoxicity (IC₅₀) and Rat and Mouse Acute Oral LD₅₀ Values for 347 Chemicals

Abbreviations: RC=Registry of Cytotoxicity; IC₅₀=Geometric mean (of multiple endpoints and cell types) test substance concentration that reduces cell viability by 50%; LD₅₀=Dose producing death in 50% of the animals tested.

The heavy line shows the fit of the data to a linear regression model, $\log(LD_{50}) = 0.435 \times \log(IC_{50}) + 0.625$; $r=0.67$. The thinner lines show the empirical prediction interval ($\pm \log 5$, or ± 0.699) that is based on the anticipated precision for the prediction of LD₅₀ values from cytotoxicity data (Halle 1998, 2003).

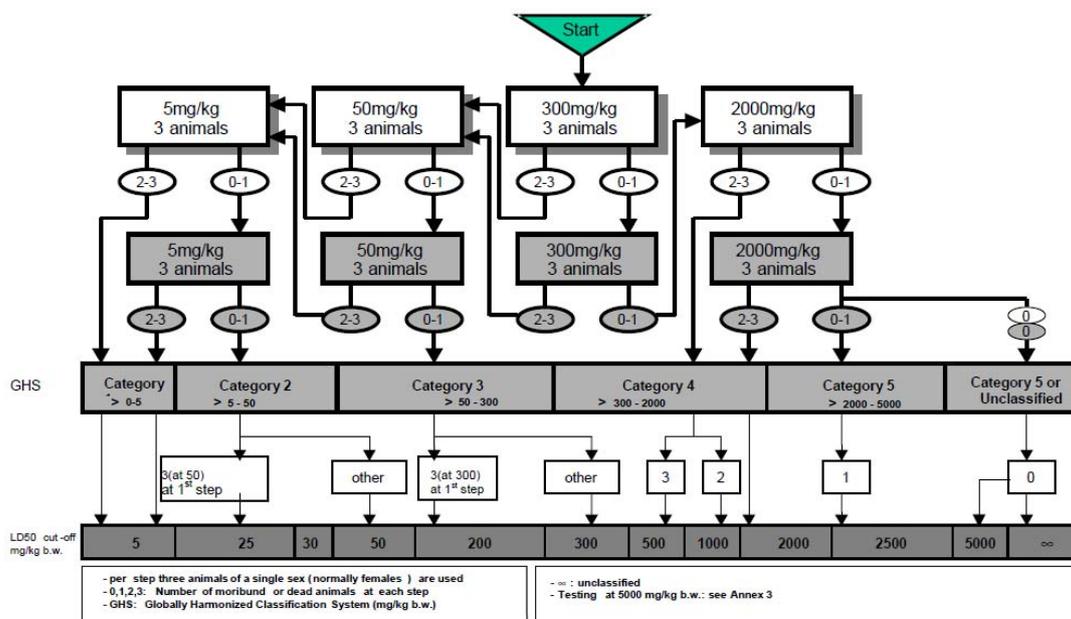
1994年 ECVAM は *in vitro* 試験で化合物のハザードを分類する事を目的としたワークショップを組織した。1996年ワークショップの参加者によって、*in vitro* 試験結果を用いて経口投与急性毒性試験の初回投与量を決定することで使用動物の削減する構想が議論された。同時期には OECD 急性毒性ガイドライン(420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure、423: Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method、425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure)のドラフトが提案されていた。これらのガイドラインは、あらかじめ設定された4または8段階の用量から一つを選択して動物に投与し、死亡した場合には低用量、生存した場合には高用量を逐次選択することで化合物の LD₅₀ が求められるようにデザインされている。従って、適切な初回投与量の選択が使用動物数の削減の鍵となる。

Acute Oral toxicity – Acute Toxic Class Method の LD₅₀ 決定までの流れ図 (OECD ガイドライン 423 より抜粋)

423

OECD/OCDE

ANNEX 2c: TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 300 MG/KG BODY WEIGHT



300 mg/kg を初回投与量とした場合の流れ図を示す。各試験段階では 3 例の動物を使用する。評価する化合物の動物実験における LD₅₀ 値が >300-2000 mg/kg (Category 4) の場合には、最少で 3 段階、最多で 4 段階の試験を実施して LD₅₀ 値が求められる。動物実験における LD₅₀ 値が >5-50 mg/kg (Category 2) の場合には、最少で 4 段階、最多で 6 段階の試験を実施して LD₅₀ 値が求められる。

1999 年、The German Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments (ZEBET) は RC millimole regression を用いたシミュレーションで急性毒性試験の初回投与量を定めることにより、UDP 法のドラフトガイドラインにおける使用動物が 25-40% 削減できることを示した。

2000 年、NIEHS、NTP 及び EPA は協力して International Workshop on *in vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity (Workshop 2000)を開いた。このワークショップでは、①ZEBET の RC millimole regression によって急性毒性試験の初回投与量を見積もる手法、②ECVAM から

提案された試験方法の構想、③動物数削減を目的とした①及び②以外の *in vitro* 細胞毒性試験の構想について議論された。その結果、急性毒性試験の代替法として試みられた *in vitro* 細胞毒性試験には、試験方法の信頼性、妥当性、有用性及び試験の適応範囲を適切に評価された試験方法はなく、規制当局が受け入れ可能な *in vitro* 試験または試験バッテリーは存在しないと結論された。ZEBET が提案した *in vitro* 細胞毒性の IC₅₀ 値と急性毒性試験の LD₅₀ 値の millimole regression を用いて急性毒性試験の初回投与用量を推測する *in vitro* アプローチを最優先課題とすることが決定された。げっ歯類の急性毒性試験からヒトの致死性予測の試みとしてヒト細胞株 (Normal human epidermal keratinocytes; NHK) を用いた試験、また、げっ歯類の急性毒性をより正確に予測できる可能性を考慮して、げっ歯類の細胞株 (BALB/c mouse fibroblasts; 3T3) を用いた NRU 法を一つの代表例として検討した。

ICCVAM の提案に応じて、NICEATM および ECVAM は、2002 年の 8 月から 2005 年 1 月の間、げっ歯類を使った急性毒性試験法の初回投与用量の予測に使用される *in vitro* 細胞毒性試験の有用性と限界について調べるために、72 種類の化合物に対して、3T3 細胞あるいは NHK 細胞を用いた NRU テスト (Neutral Red Uptake) のバリデーション試験を複数の施設で実施した。

バリデーション試験は、以下に示すように 4 段階で実施された。

Phase Ia: Laboratory Evaluation

Development of a positive control database for each laboratory

Phase Ib: Laboratory Evaluation

Limited substance testing to demonstrate the reliability of the protocol

Phase II: Laboratory Qualification

Evaluation of protocol refinements

Phase III: Laboratory Testing Phase

Test of optimized protocols

現在、各極における急性毒性試験による化合物分類を BRD から抜粋して記載した (Table 1-2)。BRD に記載されているように、現在のところ *in vivo* 急性毒性試験に置き換わる *in vitro* 試験はない。OECD ガイドラインでは、*in vitro* 細胞毒性試験は類縁化合物、構造活性相関などとならんで、*in vivo* 試験の初回投与量を決める毒性情報として利用できることが記載されている。初回投与量を決めるための参考情報が入手できない場合、ATC 法では 300 mg/kg、UDP 法では 175 mg/kg である。FDP 法では main study を実施する前に sighting study を行って初回投与量を決める。sighting study の初回投与量も試験計画の時点で得られている情報を基にするが、情報が入手できない場

合には 300 mg/kg を選択し、各用量で 1 匹の動物を使用して main study と同様の手順を踏んで初回投与量を決定する。最多で 4 匹の動物を sighting study で使用することになる。

現行の急性毒性ガイドラインにおいても、強制力はないが初回投与量の決定に *in vitro* 細胞毒性試験は利用されていると考えられる。

経口投与急性毒性試験による化合物の分類 (BRD より抜粋)

Table 1-2 Regulatory Classification Systems for Acute Oral Toxicity

Regulatory Agency (Authorizing Act)	Animals	Endpoint	Classification
EPA (FIFRA)	Use current EPA or OECD protocol	Death ¹	I - LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg II - 50 < LD ₅₀ ≤ 500 mg/kg III - 500 < LD ₅₀ ≤ 5000 mg/kg IV - LD ₅₀ > 5000 mg/kg
CPSC (Federal Hazardous Substances Act)	White rats, 200-300 g	Death ¹ within 14 days for ≥ half of a group of ≥ 10 animals	Highly toxic - LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg Toxic - 50 mg/kg < LD ₅₀ < 5 g/kg
OSHA (Occupational Safety and Health Act)	Albino rats, 200-300 g	Death ¹ , duration not specified.	Highly toxic - LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg Toxic - 50 < LD ₅₀ < 500 mg/kg
DOT (Federal Hazardous Material Transportation Act)	Male and female young adult albino rats	Death ¹ within 14 days of half the animals tested. Number of animals tested must be sufficient for statistically valid results.	Packing Group I - LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg Packing Group II - 5 < LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg Packing Group III - LD ₅₀ < 500 mg/kg (liquid) LD ₅₀ < 200 mg/kg (solid)
OECD Guidance for Use of GHS (2001b)	Protocols not specified	Not specified	I - LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg II - 5 < LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg III - 50 < LD ₅₀ ≤ 300 mg/kg IV - 300 < LD ₅₀ ≤ 2000 mg/kg V - 2000 < LD ₅₀ ≤ 5000 mg/kg Unclassified - LD ₅₀ > 5000 mg/kg

Abbreviations: EPA=U.S. Environmental Protection Agency; OECD=Organisation for Economic Co-operation and Development; LD₅₀=Dose producing death in 50% of the animals tested; CPSC=U.S. Consumer Product Safety Commission; FIFRA=Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act; OSHA=U.S. Occupational Safety and Health Administration; DOT=U.S. Department of Transportation; GHS=Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN 2005).

¹Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation calls for humane killing of moribund animals (OECD 2000). Moribund animals that are humanely euthanized are accepted as deaths.

ニュートラル・レッド (NR) は水溶性の弱陽イオン超生体染色色素である。正常な細胞では、NR は細胞形質膜を透過して陰イオン性のライソゾームマトリクスに結合して濃縮されるが、化合物によって細胞傷害が生じた場合には、細胞に取り込まれる NR が減少する。3T3 細胞を使用した NRU 試験は Borenfreund and Puerner (1985) が最初に報告した試験である。細胞毒性をエンドポイントとした試験方法は幾つか報告されている。NICETM/ECVAM のバリデーション試験で NRU 法を選択した理由としては、3T3 細胞及び NHK 細胞を用いた NRU 試験は、以前に実施したバリデーション試験において再現可能な試験であること (ICCVAM 2001b)、両細胞の入手は容易であり、LD₅₀ 値を予測する RC millimole regression が既に得られていること、加えて、この試験は自動化が可能であり、RI を使用せず、危険性のある試薬を使用しないという実施上の利点があること、である。NRU 試

験法で評価可能な物質は、細胞培養液と反応せずに溶解する限りすべての物質が評価可能である。混合物でも評価可能と考えられるが、このバリデーション試験では使用されていない。

NRU 試験のエンドポイントは細胞死である。一方、*in vivo* 急性毒性試験のエンドポイントは動物の病的状態あるいは死であり、一見大きく異なる。しかし、細胞障害や細胞死が広範囲の組織に生じると、主要臓器の機能不全が起こり、個体死に繋がる。細胞のもつ基本的な機能として Ekwall (1983) はミトコンドリア活性、形質膜の統合性への影響を提案している。多くの化合物によって誘発される毒性は、これらの基本的な細胞機能への非特異的な影響の結果であって、細胞膜及び細胞骨格の統合性、代謝、合成、分解または細胞構成生物の分解、イオン調節及び細胞分裂に障害が生じ細胞死を招く。また、組織障害は恒常性維持のシグナル干渉も引き起こし、化合物が暴露されていない臓器にも影響する。したがって、細胞死と個体死には、同様のメカニズムが働いていると考えられる。

in vivo 試験において化合物の毒性発現がヒトとげっ歯類で異なるように、*in vitro* 細胞毒性試験においてもヒト由来の細胞とげっ歯類由来の細胞では反応性が異なり、またヒト由来の細胞であったとしても細胞の種類によってその感受性が異なる(Clemenson et al. 1998a, b)。げっ歯類の致死性を予測するには、げっ歯類由来の細胞が適していると考えられる。

細胞培養系と動物個体では、化合物の暴露の形態が異なる。経口投与された化合物は、消化管で吸収、血漿タンパク結合及び代謝を受け、体外へ排泄される。これらの過程を経ることで化合物の生物学的利用率は低下する。したがって、個体内では投与された化合物の一部のみが標的臓器に到達するに過ぎず、暴露される時間も限定的なものである。一方、細胞培養系では、吸収、分布、代謝及び排泄を有しておらず、化合物は直接細胞に作用するため、細胞培養系は動物の体内の細胞よりも被験物質に長時間暴露される。

化合物の毒性発現機序が細胞培養系と動物個体で異なる場合、細胞毒性試験での評価は適当ではない。例えば、ある種の神経受容体を介して毒性を発現す場合には、その受容体を発現していない 3T3 細胞または NHK 細胞では同様の毒性を捉えることを期待できない。仮に細胞毒性を示したとしても、それは *in vivo* とは異なったメカニズム、異なった濃度における毒性発現である。培養神経細胞であっても *in vivo* と同じ機能を保持していなため、*in vivo* と同じ反応を期待できない。神経や心臓に特異的な毒性を発現する物質については、3T3 細胞あるいは NHK 細胞を用いた NRU 試験では過小評価されると考えられる。

化合物の物性として、細胞培養液に不溶性の物質、揮発性の物質、ライゾチームへ特異的な影響を与える物質、細胞に残留する性質を有した赤色あるは NR の吸光度と重なる有色の物質の評価は適当ではないかもしれない。3T3 細胞を用いた NRU 試験では、5%の血清を培養液に含むため、血清タンパクへの結合性が高い物質では、その毒性を過小評価するかもしれない(NHK 細胞の培地は血清を含まないため、この懸念はない)。

JaCVAM 急性毒性代替法評価委員会の意見としては、72 種類の化合物から得られた NRU 法の IC_{50} 値と急性毒性試験の LD_{50} 値の相関性を根拠とした回帰式から算出しているが、動物の死と細胞の死が類似するメカニズムの説明が不十分であると評価した。相関性は必ずしも因果関係を説明するものではない。神経系、循環器、呼吸器などの生命維持に重要な影響を及ぼす器官に作用する化合物、体内で代謝されることによって毒性を発現する化合物は正しい LD_{50} 値の予測はできないと判断した。また、NRU 法での評価に適当ではない物性(揮発性、難溶解性及び有色の化合物など)を有する化合物は、本実験では正確な評価をすることが困難であるため、試験対象から除外すべきであると判断した。

2. 試験法の妥当性

96well マイクロプレートで培養した株化細胞に被験物質を 48 時間暴露させる。その後、ニュートラルレッド(NR)を培地に添加し、一定時間インキュベーションした後、細胞内に取り込まれたNRを抽出してプレートリーダーで測定し、コントロール細胞の吸光度値に対する割合を細胞生存率の指標とする。試験は、溶解性試験、用量設定試験及び本試験から構成される。用量設定試験では、広い範囲の用量をカバーする必要があるため、大きな希釈率で実施する。本試験では IC₅₀ 値を用量段階の中央に設定し希釈率は用量設定試験より小さくする。

細胞の種類と培養液

1) 3T3 細胞(BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞)

培養液:10%新生児ウシ血清(非働化せず)含有 DMEM 培地

2) NHK 細胞(ヒト正常表皮角化細胞)

培養液:KBM培地(0.0001 ng/mL ヒトリコンビナントEGF、5 μg/mL インスリン、0.5 μg/mL ハイドロコルチゾン、30 μg/mL ゲンタマイシン、15 ng/mL アンホテリシン B、0.1 mM カルシウム、30 μg/mL ウシ下垂体抽出物含有)

3T3 細胞を用いた成績はNHK 細胞に比較して、実験結果の再現性は劣るが、動物数の削減に関してはわずかながら効果的であり、GHS の急性毒性のハザード分類もより正確に予測することができる。

NHK 細胞は無血清培地で培養することが可能であることから動物資源への負担が少ない。3T3 細胞を用いた試験はNHK 細胞に比較して費用が安価なことから、一般的に 3T3 細胞の使用が推奨されている。以下のように BRD では、2つの細胞を培養に必要な試薬費用が記載されている。

3T3 細胞:細胞(\$200) + 培地 500 mL(\$20); 約\$220

NHK 細胞:細胞(\$380) + 培地 500 mL(\$100); 約\$480

溶解性試験

溶解性試験は、被験物質が溶解するまで溶媒添加量を段階的に増加させることを基本として実施する。使用する溶媒は、細胞培養液、DMSO、ETOH の順で選択する。溶液を顕微鏡で観察し、溶液が透明で濁りや沈殿物が全く観察されない場合に溶解しているものとみなす。

攪拌方法は、以下のように実施する。

(1) 1-2 分、室温でゆっくりボルテックスをかける。

- (2) 被験物質が溶解しなかったら、5 分間超音波処理を実施する。
- (3) 超音波処理でも溶解しない場合は、ウォーターバスあるいは CO₂ インキュベーターで 5-60 分間加温する。

1) 溶解性試験の手順

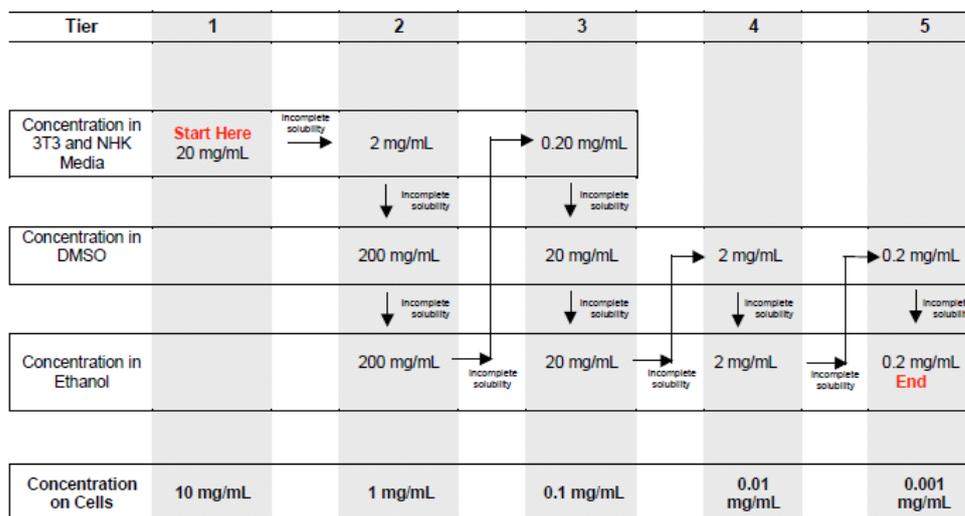
各 Phase によって手順が変遷しているが、以下に基本となった初期のプロトコルを記載する。

- (1) 段階 1: 100 mg の被験物質をガラス試験管に秤取する。0.5 mL の培養液を添加して 200 mg/mL に調製する。溶解しない場合は段階 2 を実施する。
- (2) 段階 2: 10 mg の被験物質をガラス試験管に秤取り、0.5 mL の培養液を添加して 20 mg/mL に調製する。溶解しない場合は段階 3 を実施する。
- (3) 段階 3: 段階 2 の被験物質溶液に、さらに 4.5 mL の培養液を添加して全体を 5 mL とし 2 mg/mL に調製する。溶解しない場合は DMSO で溶解する。新しいガラス試験管に被験物質を 100 mg 秤量し、0.5 mL の DMSO を添加して 200 mg/mL に調製する。DMSO で溶解しない場合は ETOH で溶解する。新しいガラス試験管に被験物質を 100 mg 秤量し、0.5 mL の ETOH を添加して 200 mg/mL に調製する。溶解しない場合は段階 4 を実施する。
- (4) 段階 4: 被験物質が、培養液、DMSO、ETOH のいずれにも溶解しない場合は、段階 3 で溶解しなかった培養液 (2 mg/mL)、DMSO (200 mg/mL) 及び ETOH (200 mg/mL) の被験物質溶液をそれぞれの溶媒を添加して 10 倍希釈して、培養液では 0.2 mg/mL、DMSO 及び ETOH は 20 mg/mL に調製する。溶解しない場合は、段階 5 を実施する。
- (5) 段階 5: 段階 4 で溶解しなかった DMSO (20 mg/mL) 及び ETOH (20 mg/mL) の被験物質溶液に、それぞれの溶媒を添加して 10 倍希釈し 2 mg/mL を調製する。
- (6) 段階 6: さらに必要ならば、被験物質を 10 mg ずつ秤量し 50 mL の DMSO または ETOH を添加して 0.2 mg/mL の溶液を調製する。

Phase III においては、20 mg/mL を培養液中の最高濃度 (終濃度) とし実施することを要求した。

注) 実際のバリデーション試験においては ETOH を使用した試験は実施されていない。

溶解性試験のフローチャート(BRDより抜粋)

Figure 2-7 Flow Chart for Determination of Reference Substance Solubility in Medium¹, DMSO, or ETOH

Abbreviations: DMSO=Dimethyl sulfoxide; ETOH=Ethanol; 3T3=BALB/c 3T3 fibroblasts; NHK=Normal human epidermal keratinocytes.

Note: DMSO is U.S.P. analytical grade. ETOH is U.S.P. analytical grade (100% non-denatured).

¹3T3 Medium - DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) with supplements; NHK medium - KBM[®] (Keratinocyte Basal Medium) with supplements (from CAMBREX Clonetics[®]).

2) 被験物質溶液の希釈

被験物質溶液は、透明且つ沈殿が認められない条件で使用する。被験物質を有機溶媒に溶解した場合は、培養液中の有機溶媒含量は0.5%以下とする。

被験物質を培養液に溶解した場合は、溶解性試験で溶解した最高濃度の半分、有機溶媒で溶解した場合は、溶解性試験で溶解した最高濃度の1/200の濃度を用量設定試験の最高濃度となる。用量設定試験での上限濃度は、被験物質を培養液で溶解した場合には10 mg/mL、有機溶媒を使用した場合には1 mg/mLである。

用量設定試験では公比10とし、本試験では希釈段階をnとして10のn乗根として計算する。例えば、3段階希釈では $2.15(\sqrt[3]{10})$ 、6段階希釈では $1.47(\sqrt[6]{10})$ 、12段階希釈では $1.21(\sqrt[12]{10})$ を用いる。

バリデーション試験では、用量設定試験の上限濃度で毒性が認められない場合、培養液で溶解する場合は100 mg/mL(2倍のストック液を使用)、DMSOを使用した場合には2.5 mg/mLを上限濃度として再度用量設定試験を実施した。

用量設定試験及び本試験

1) 陽性対照物質 (PC)

ラウリル硫酸ナトリウム(SLS)を陽性対照物質として、8 用量で濃度反応曲線を描く。多数の被験物質の試験を実施する際に陽性対照物質のプレートは単独で実施して良い。

2) 溶媒対照物質 (VC)

被験物質の溶解に有機溶媒を使用した場合には、VC にも被験物質と同じ濃度(0.5%)の有機溶媒を添加する。

3) 細胞の播種および前培養

3T3 細胞は、96-well マイクロプレートに $2-3 \times 10^3$ 個/100 μ L/well 播種後 24 時間培養し、NHK 細胞は、 $1.6-2 \times 10^3$ 個/125 μ L/well 播種後 48-72 時間培養する。

4) 被験物質の添加

規定時間前培養し(3T3 細胞:24 \pm 2 時間、NHK 細胞:48-72 時間)、プレートを注意深くひっくり返し培養液を除去後、滅菌したペーパータオルに押し付けて well に残った培養液を除去する。すぐに、37 \pm 1 $^{\circ}$ Cに温めた培養液を 3T3 細胞には 50 μ L ずつ、NHK 細胞には 125 μ L ずつ添加する。それぞれの well に 2 倍濃度の被験物質が入った培養液を 3T3 細胞には 50 μ L ずつ、NHK 細胞には 125 μ L ずつ添加する。添加後 48 \pm 0.5 時間培養する。1 用量当たりの well 数は N=6 とする。

5) 測定

被験物質の暴露終了後、位相差顕微鏡で細胞を観察して、被験物質の毒性によって生じた細胞の形態学変化、細胞の播種エラーおよび細胞増殖の程度を記録する。(この記録は、細胞毒性の評価には使用しない)。その後、well の培養液を除去し、Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)で洗浄後、NR 染色液(NR dye; 3T3: 25 μ g/mL、NHK: 33 μ g/mL)を 250 μ L 添加して 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で 3 時間培養する。染色液を除去して D-PBS で洗浄後 100 μ L の用時調製した NR 抽出液(水:エタノール:氷酢酸=49:50:1)を添加しプレートシェイカーで 20-45 分間振盪して NR を抽出する(BRD にはこの操作における温度の記載がない。室温における操作で十分であると判断した)。振盪後、プレートは少なくとも 5 分間放置する。測定は、NR 抽出液を添加してから 60 分以内に実施する。泡を取り除き、プレートリーダーで 540 nm \pm 10 nm (OD_{540nm})の吸光度を測定する(BRD には泡を取り除く方法について具体的な方法の記載がない。プレートを遠心し取り除く方法が一般的と考える)。

6) 試験成立基準

試験成立基準(Test acceptance criteria)は各 Phase で変遷があるが、以下に Phase III で用いた試験成立基準を記載する。

- (1) PCとして使用するSLSのIC₅₀値は、各研究室で得られたヒストリカルデータの平均値の2.5標準偏差(SD)の範囲に入っていること。
- (2) VCは96-wellの2列目と11列目に設定するが、それぞれの列のOD平均値の差が、全てのVCから算出した平均値から15%以内であること。
- (3) 細胞毒性率が0%以上かつ生存率50%未満のものが少なくとも一つ、細胞毒性率が50%以上かつ10%未満のものが少なくとも一つは存在すべきである。
- (4) PCの用量相関のR²値がHill式のモデルフィットに0.85以上の相関があること。

7) データ解析

生物学/科学的な判断により、評価に適していないwellはデータ解析から除外可能である。

ブランクのOD₅₄₀値を差し引いた後、細胞生存率をVCの平均値に対する割合として算出する。計算には表計算ソフト(例:Microsoft EXCEL®)を使って計算してもよい。

IC₅₀値を計算するために統計学的ソフト(例:GraphPad Software PRISM®)を用いて、Hill式の解析を行う。

8) 初回投与量の決定

IC₅₀値(mM)を次の回帰式に代入してlogLD₅₀値(mg/kg)を算出する。

$$\text{LogLD}_{50}(\text{mmol/kg}) = 0.439 \log\text{IC}_{50}(\text{mM}) + 0.621 \quad (\text{ICCVAM, 2006a})$$

LogLD₅₀値をLD₅₀値に変換し、化合物の分子量を乗じてmg/kg単位に変換する。

UDP法の用量段階は、2000 mg/kgを上限とする試験では5、50、300及び2000 mg/kgの4段階、5000 mg/kgを上限とする試験では、1.75、5.5、17.5、55、175、550、1750及び5000 mg/kgの8段階である。ATC法の用量段階は、2000mg/kgを上限とする試験では5、50、300及び2000 mg/kgの4段階、5000 mg/kgを上限とする試験では5、50、300、2000及び5000 mg/kgの5段階である。動物に投与する用量は、上記回帰式で得られたLD₅₀値が含まれる用量段階より1段階低い用量を開始用量とする。

分子量不明の化合物については、μg/mLで算出したIC₅₀値からは、以下の回帰式でLD₅₀値(mg/kg)を推測することができる。

$$\text{LogLD}_{50}(\text{mg/kg}) = 0.372 \log\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL}) + 2.024 \quad (\text{ICCVAM, 2006a})$$

既知の適用限界

ICCVAM のピアレビューパネルは、*in vitro* 試験の適用限界について以下のようにコメントしている。

1) 溶解性、沈殿物及び揮発性を有する化合物

培養液、また有機溶媒を用いても溶解性が低く、50%の細胞毒性発現濃度が得ることができない化合物は *in vitro* 試験で評価することはできない。

培養液に添加後しばらくしてから結晶が析出する化合物では、正確な IC₅₀ 値を求めることはできない。

揮発性の化合物では、VC のwell にコンタミが認められた。コンタミを防ぐために、well をフィルム状の Plate sealer で密封した試験も実施したが、有機溶媒では sealer に反応してしまうことから試験の実施が困難であった。

2) 生物動力学測定 (Biokinetic determination)

生体内に投与された化合物は、吸収、分布、代謝、排泄 (ADME) の過程において生物学的影響を発現するが、*in vitro* の試験系では、これらが欠如している (ICCVAM 2001a)。したがって、*in vitro* の試験結果を *in vivo* に外挿するには、ADME も考慮すべきである。

3) 臓器特異的毒性

3T3 及び NHK 細胞を使用した NRU 試験では、肝、中枢神経、腎、心臓、肺及び造血器に対する特異的な毒性を評価することはできない。

JaCVAM 急性毒性代替法評価委員会では、本試験方法に関して以下のように意見をまとめた。

被験物質の用量段階について規定することはなく、ある程度自由度を持たすべきである。公比3程度とすることで、1回の試験でも適切な IC₅₀ 値を求めることができるケースも多いはずである。このような場合は、本試験を実施する必要はない。

被験物質の溶媒は、培養液あるいは有機溶媒が推奨されているが、溶媒は被験物質の性質に応じて選択されるべきである。水溶系の溶媒には培養液1種類だけでなく、一般的に *in vitro* 試験で使用される水や生理食塩液の使用も可能とし、自由度をもたすべきである。

DMSO や ETOH などの有機溶媒に溶解した被験物質が、培養液に添加後に析出した場合の IC₅₀ 値の取扱いについて特記する必要がある。

被験物質の調製にガラス製試験管を使用することが記載されているが、試験管の材質は被験物質の物性に応じて選択すべきである。従って、被験物質の調製に使用する試験管はガラス製に限定するのではなく自由度をもたすべきである。

被験物質添加の際に、まず細胞へ培養液を添加し、次に 2 倍濃度の被験物質含有培養液を添加することになっているが、1 倍濃度の被験物質含有培養液の直接添加も認めるべきである。

NRU 法の陽性対照物質にラウリル硫酸ナトリウムが指定されているが、陽性対照物質は 1 種類だけでなく複数規定し、選択肢を広げるべきである。

陽性対照物質をテストするプレートは、被験物質をテストするプレートと別プレートで実施されているが、試験の成立および信頼性に関わる陽性対照の試験は、できる限り被験物質と同一プレート内で実施することが望ましい。

一つの用量につき6well(N=6)で実施することが指定されている。N 数と結果の信頼性が相関することは理解できるが、N=6 が必要かどうか考慮する必要がある。N=3-4 で十分な評価が可能である。

細胞から NR を抽出し測定するまでの時間が、1 時間以内と記載されている。一般的には 2-3 時間後でも問題ないと考える。また、細胞から NR を抽出する時間も 20-45 分と規定している。抽出から測定までの時間や NR 抽出時間などの各処理における時間の規定は、各施設で検討試験を実施し、試験精度が担保できる範囲で自由度をもたせるべきである。

本ガイドライン草案では、LD₅₀ 値の算出に Graphpad PRISM® が例として挙げられているが、本ガイドライン草案のプロトコルに適したソフトウェアを開発して自由に配布できると利便性が向上し、普及しやすい。

3. バリデーシオンに用いられた物質の分類と妥当性

バリデーシオン試験の被験物質として 72 種類の参照化合物を選択した(下表参照)。

1,1,1-Trichloroethane	Diethyl phthalate	Phenobarbital
2-Propanol	Digoxin	Phenol
5-Aminosalicylic acid	Dimethylformamide	Phenylthiourea
Acetaminophen	Diquat dibromide*	Physostigmine
Acetonitrile	Disulfoton	Potassium cyanide
Acetylsalicylic acid	Endosulfan	Potassium I chloride
Aminopterin	Epinephrine bitartrate	Procainamide**
Amitriptyline HCl	Ethanol	Propranolol HCl
Arsenic III trioxide	Ethylene glycol	Propylparaben
Atropine sulfate*	Fenpropathrin	Sodium arsenite
Boric acid	Gibberellic acid	Sodium chloride
Busulfan	Glutethimide	Sodium dichromate dihydrate
Cadmium II chloride	Glycerol	Sodium hypochlorite
Caffeine	Haloperidol	Sodium I fluoride
Carbamazepine	Hexachlorophene	Sodium oxalate
Carbon tetrachloride	Lactic acid	Sodium selenate
Chloral hydrate	Lindane	Strychnine
Chloramphenicol	Lithium I carbonate	Thallium I sulfate

Citric acid	Meprobamate	Trichloroacetic acid
Colchicine	Mercury II chloride	Triethylenemelamine
Cupric sulfate 5H ₂ O	Methanol	Triphenyltin hydroxide
Cycloheximide	Nicotine	Valproic acid
Dibutyl phthalate	Paraquat	Verapamil HCl
Dichlorvos	Parathion	Xylene

*試験には一水和物を用いた。

**試験には塩酸塩を用いた。

参照化合物の選択基準は、1) GHSの急性経口毒性の分類(5区分に加えてLD₅₀値 > 5000 mg/kgの未分類化合物)にげっ歯類 LD₅₀ 値が 12 物質ずつ分類できること、2) 構造と使用用途が広範囲に渡ること、3) ヒトの毒性データを備えたものであることとした。また、GHS 急性経口毒性の区分全体に分布するように物質を選択した。RC データベースに上げられている物質については ZEBET の RC millimole regression に合うものから選んだ。バリデーション試験で使用した 72 種類の参照化合物数は十分な数であると ICCVAM ATWG、ICCVAM、ECVAM は判断した。

評価に用いた LD₅₀ 値は、OECD ガイドラインでラットを用いた試験が推奨されていること、RC millimole regression の大部分がラットの LD₅₀ 値を使っており、そして大部分の急性経口全身毒性試験ではラットが用いられていることからラットが選ばれた。各物質の LD₅₀ 値は RC (LD₅₀ 値データの大部分は RTECS[®] [1983/84]) を優先とし、その他、RTECS[®] (2001、2002) Hazardous Substances Data Bank を用いて調査した。選択した 72 種類の物質は RC をはじめとし、各種のデータベースに登録されており、1 物質で複数のデータベースにリストされているものもあった。

選択した参照化合物に含まれる RC 物質 (58 物質) については RC millimole regression 全体と比較するとはずれ値の比率が高く、また、過小評価が 17 物質、過大評価が 5 物質と偏りが見られた。

被験物質情報としては分子量、分子構造、化学的分類、代謝活性化/不活性化、作用機序、脳血液関門の透過性などが調べられているが、分子の荷電と界面活性については情報が得られなかった。また、毒性の標的臓器や腐食性に関してもデータを検索した。72 種類の物質のうち 57 物質が有機化合物、15 物質が無機化合物であった。有機化合物にはヘテロサイクリック(14 物質)、カル

ボン酸(14 物質)、アルコール(10 物質)が多く、その他フェノール、硫黄化合物、アミン、有機リン化合物などが含まれていた。無機化合物にはナトリウム化合物(6 物質)、塩素化合物(5 物質)が多く、その他、砒素化合物、金属、カリウム化合物、硫黄化合物などが含まれていた。製品の種類、使用法としては医薬品 27 物質、農薬 17 物質で他に溶媒、食品添加物、殺菌剤/消毒剤などが含まれていた。

72 種類の物質の中で代謝により活性化するもしくは活性化が期待される物質は 22 物質で、代謝により毒性が減少する物質は 5 物質であった。NHK 細胞と 3T3 細胞は活性化能力がほとんどまたは全くないことが報告されている。

試験できなかった、または試験が難しかった物質は主に、毒性が低く IC₅₀ 値が得られない、揮発性がある、または溶解性が悪いことが原因であった(試験結果が得られなかった化合物 3T3; Lithium I carbonate、Methanol、NHK; 1,1,1-Trichloroethane、両細胞共通; Carbon tetrachloride、Xylene)。

試験に使われた被験物質の情報の記載があり、コード化や配付も適切に行われた。

参照化合物に PAHs、触媒、単純なアルデヒド、ケトン、バイオサイド(殺生物剤)、混合物/製剤、植物毒などの天然化合物が含まれていない。ICVAM ピアレビューパネルは、特に、一般的な殺虫剤や家庭用品の評価が必要であるとした。

総じて、*in vivo* の急性経口毒性で作用様式や機序がはっきりしていないことから、*in vitro* のバリデーションのために広範囲に亘る標準物質を選択することが戦略的に難しいが、NRU 法は基礎的な細胞毒性を検出するので、選択された物質は reliability と accuracy を評価するには十分である。

JaCVAM 急性毒性代替法評価委員会としては、以下のように意見をまとめた。

バリデーション試験で使用された 72 種類の参照化合物についての選択基準、LD₅₀ 値、各種情報(GHS のクラス分け、構造、分類、使用用途等)、情報の由来について十分な記載がされていると判断する。

被験物質数や被験物質名称について文中、表中および Appendix で記載の一部が一致していなかったが、全体の評価に影響を及ぼす内容ではないと判断した。

急性毒性試験の代替法が早急に求められているのは化粧品業界であるが、NRU 法で使用した 72 種類の化合物に化粧品原料は少ないことから、化粧品原料について本法が有効であるかについ

では、評価ができないと JaCVAM 評価委員会は判断した。なお、化粧品業界は、初回投与量を設定する試験ではなく、動物試験を置換できる完全な代替法を求めている。

ICVAMピアレビューパネルが指摘したように、混合物や製品については回帰式から急性毒性の濃度を予測可能であるかについて試験されておらず、データが得られていないことから、これらの物質については開始濃度を予測することができるかどうかの判断はできないと JaCVAM 評価委員会は判断した。

揮発性を有しているもの、溶解性が低いものなど試験が困難な物質について、試験をどのように実施するかに関する記載は見られなかった。被験物質の物性によって試験が適切に行えないと考えられる場合は、試験を行わない選択についての検討が必要であると JaCVAM 評価委員会は判断した。

参照化合物の選択は RC 全体に物質が亘るように考慮されているが、はずれ値の割合がこの評価方法の基礎となった RC millimole regression よりも多く、また、過小評価となった物質により多く偏りが認められているので、試験結果の評価時に考慮が必要であると JaCVAM 評価委員会は判断した。

使用した細胞は代謝活性化能力をほとんど保有していない。しかしながら、RC millimole regression で使用されている *in vitro* データからは代謝活性化系が意図的にはずされており、バリデーション試験と RC との精度の比較に関しては代謝活性化が含まれていないことは大きな問題とはならないと考える。代謝活性化により活性化または不活化される物質に関して評価が可能であるかどうか、別途考察が必要であると JaCVAM 評価委員会は判断した。

4. 試験法の正確性を評価するために用いられた参照化合物の *in vivo* 参照データ

バリデーション試験の精度を評価するため、げっ歯類急性経口 LD₅₀ 値を収集した。LD₅₀ 値を求めるために新たな動物実験は行わなかった。各種データベースおよび文献から得られたデータのほとんどが GLP 非適用であり、データの質はよくない。野生のラット、4 週齢未満のラット、麻酔したラット、餌やカプセルで摂取したもの、LD₅₀ 値が範囲及びある数値以上として報告されているものを除外し、データの質の改善を行った。試験条件の記載がない場合、ラットは若い生体で一般的な種類、無麻酔、強制経口投与により得たデータとして扱った。

評価に使用した LD₅₀ 値 (Reference LD₅₀) は、各種クライテリアに合致した LD₅₀ 値が複数ある場合には、それらの幾何平均とし、ラットの経口のデータがない 3 物質については、マウスの急性経口毒性の LD₅₀ 値から同様の作業によってデータを得た。Reference LD₅₀ 値を用い、各物質について GHS に基づいて再度クラス分類をしたところ 53 物質が同じ分類、18 物質で LD₅₀ 値が高値となり、より毒性の低いクラスへ分類され、1 物質で LD₅₀ 値が低くなりより毒性の高いクラスへ分類された。

各物質につき得られた複数の LD₅₀ 値について、最大値と最小値の比でばらつきを調べた。72 種類の物質中 2 つ以上の LD₅₀ 値が得られたものは 62 物質でその比は平均で 4.3 となり、毒性の強い物質 (LD₅₀ 値 ≤ 50 mg/kg) では毒性の弱い物質 (LD₅₀ 値 > 50 mg/kg) よりも比が大きくなる傾向があった。しかしながら、同一のプロトコルで試験した試験施設間でも数倍から 10 倍程度の変動が報告がされており、検索で得られたデータではラット種、性別、観察期間、LD₅₀ 値の計算方法などは異なっていることを考慮に入れると文献から得られた結果は評価に使用するのに妥当であると判断した。

RC との共通物質 58 物質について文献より得られた LD₅₀ 値と、RC の値を比較したところ、Spearman correlation analysis で対数変換した数値において $p < 0.0001$ で $r_s = 0.97$ と非常に高い相関を示した。

JaCVAM 急性毒性代替法評価委員会としては、以下のように意見をまとめた。

JaCVAM 評価委員会は文献からのデータの取捨選択については十分な記載がされていると判断した。

文中と表の数値、記載が一部一致していないが、全体の評価に影響を及ぼす内容ではないと JaCVAM 評価委員会は判断した。

全体として、文献から得られた LD₅₀ 値は信頼できるものであり、これらの値を用いた評価は可能であると JaCVAM 評価委員会は判断した。

RC、LD₅₀ 値を求めた参照化合物の中で、塩の形が異なる物質があったがその同等性に関する記載は認められなかった。したがって、JaCVAM 評価委員会としては、結果への影響が判断できなかった。

文献より得られた LD₅₀ 値のばらつきは全体的に LD₅₀ 値が 50 mg/kg を境にして低濃度の場合、比が大きい傾向があったが、今回最も比の大きかった物質 (25.9 倍) の LD₅₀ 値は 329 mg/kg であり、ばらつきが物質固有の物性等に起因する可能性について否定できないと JaCVAM 評価委員会は判断する。

GHS 区分に変更があった物質 19 物質のうち、3 物質はデータがマウスからラットに変更されていたが、動物種を変更したことに対する影響の有無についての記載は認められない。そのため、JaCVAM 評価委員会では、評価に対する影響についての判断はできなかった。

Reference LD₅₀ 値で再評価して GHS クラスが変更された 14 物質における文献値の LD₅₀ 値はその化合物が分類される GHS 区分に含まれていた。うち複数物質において LD₅₀ 値がほぼ GHS 区分のボーダー上にあり、LD₅₀ 値の文献値と GHS 区分に使用された元の数値が必ずしも著しく異なっていたことが原因で GHS クラスが変更された訳ではなかった。GHS 区分のボーダー上で区分変更がされた物質については考察が必要と JaCVAM 評価委員会は判断した。

5. 試験法のデータと結果の利用性

バリデーション試験は、2002年6月から、2004年1月に掛けて Bio Reliance Corporation、U.S. Army Edgewood Chemical Biological Center (ECBC)、Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments Alternatives Laboratory (FAL)、Institute for in vitro Sciences (IIVS)の4つの施設が参加した。Bio Reliance は、参照化合物の入手、コード化、配布、溶解試験などの作業を行い、細胞毒性試験は ECBC、FAL 及び IIVS で実施した。

Bio Reliance、ECBC および IIVS は技術的な面の解決部分を除き GLP 適用下に実施した。FAL では GLP の精神に従い試験が実施されたが、個別の手順に対する QA のレビューは実施されなかった。各施設での評価と試験方法の改良、改良された方法に基づく評価、の2つ Phase を経て、最終化されたことが示されており、改良と最終化は問題ないと判断された。

Positive Control として用いた Sodium lauryl sulfate (SLS) の各施設の IC_{50} 値が各 Phase で示されており、その結果について問題ないと判断した。

3T3 と NHK 細胞との細胞間比較では、種々の化合物において IC_{50} 値に差が認められ、陽性対照の SLS でも 10 倍の差が認められた。バリデーション試験を実施した参照化合物の 85% は、この比が 0.1-10 の間にあった事を示している。

JaCVAM 急性毒性代替法評価委員会は以下のように意見をまとめた。

3T3 細胞と NHK 細胞の各細胞での IC_{50} 値の差は、各化合物で 10 倍以内の差であるが、2 つの細胞系全体では、一定傾向を持つ差ではない。そのため、試験系全体では 100 倍のばらつきがあると判断される。

初回投与量の予測は、それぞれの細胞ごとに得られた化合物の IC_{50} 値と動物の LD_{50} 値からの相関式を用いるが、前述のようなばらつきが存在していても 2 つの細胞系を同様に使用できることの考察が不足していると判断した。

Aminopterin、hexachlorophene および digoxin では両細胞での IC_{50} 値に 100 倍を超える差が認められた。これら極端な差が認められたものについてはそれぞれメカニズムなどについて考察が必要である。

BRD の 7 章では、試験手技の訓練がばらつきを小さくするために必要である事が述べられている。そこで、陽性対照 SLS の施設間差については、施設間の手技の均一性についても考察する必要がある。

6. 試験方法の正確性

3T3 及び NHK NRU 法によりげっ歯類における LD₅₀ 値の予測性から正確性が検討された。本試験方法は置き換えを意図しておらず、LD₅₀ 値の予測から初回投与量を決定し、使用動物削減を目的としている。動物へ投与する用量は、回帰直線から得られた LD₅₀ 値が含まれる GHS 区分より一段低い用量を用いるとしているため、動物実験で得られる LD₅₀ 値に近い予測がされた時、試験に使用する動物の苦痛を軽減することが期待できる (GHS 区分の毒性評価としては保守的となり、強毒性側に偏りのある解釈となる)。

質量換算の相関 (mg/kg と mg/mL) から、分子量換算 (mM/kg と mM) の相関に変更する事で、vivo vitro 相関回帰式の相関係数 R² 値が増加し、予測性を向上させたことが示されており、妥当である。また、質量換算の相関式も分子量不明の化合物、混合物については受け入れる事が出来るとしていることも妥当である。

質量換算データおよび分子量換算データでの正確性とはずれ値について検討されている。2 つの細胞でのそれぞれの IC₅₀ 値とラット LD₅₀ 値での直線回帰および、予測された LD₅₀ 値と、GHS での急性毒性分類の一致性を検討している。その結果、バリデーション参加施設全てのデータを合わせた解析の結果において、いずれの細胞でも類似した直線回帰係数が得られており問題はないと判断する (BRD Table 6-2)。

GHS 区分の予測性は、ラット LD₅₀ 値の分子量換算の相関では、3T3 NRU 法と NHK NRU 法でそれぞれ 31% (21/67)、29% (20/68) となった。GHS 区分の幅を ±1 まで広げると 3T3 は 69%、NHK が 71% まで予測的中率は増加した。また、各 GHS 区分別に見ると、LD₅₀ 値が 300~2000 mg/kg のレンジがもっとも良好であった。一方、毒性の強い化合物、あるいは非常に毒性の弱い化合物の予測性がよくなかった (BRD Table 6-7)。

はずれ値を示した化合物について、物理化学的性質、溶解性、毒性メカニズムなどの分析が実施されている。沸点が 200°C を越えるもの、分子量が 400 を超えるものなどははずれ値を示す可能性が高いことが示された。また、溶解度から見ると、はずれ値を示した化合物において 8/22 (3T3)、7/23 (NHK) が溶解性の低いものであり、dibutyl phthalate を除き全て under predicted となった。

毒性メカニズムの面から、はずれ値を示した化合物を調査した結果 CNS と心臓への作用を示す化合物ではずれ値が認められた。

バリデーションに参加した各施設の直性回帰 (BRD より抜粋)

Table 6-2 Linear Regression Analyses of the 3T3 and NHK NRU and Rat Acute Oral LD₅₀ Test Results¹

Laboratory	N	Slope	Intercept	R ²
3T3 NRU				
ECBC ²	47	0.573	0.541	0.613
FAL ²	47	0.539	0.373	0.519
IIVS ²	47	0.552	0.507	0.586
Combined-laboratory ³	47	0.561	0.475	0.579
NHK NRU				
ECBC ²	51	0.491	0.412	0.480
FAL ²	51	0.428	0.407	0.422
IIVS ²	51	0.483	0.416	0.478
Combined-laboratory ³	51	0.470	0.413	0.463

Abbreviations: ECBC=Edgewood Chemical Biological Center; FAL=Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments Alternatives Laboratory; IIVS=Institute for *In Vitro* Sciences; 3T3=BALB/c 3T3 fibroblasts; N=Number of substances used to calculate the regression; NHK=Normal human epidermal keratinocytes; NRU=Neutral red uptake; R²=Coefficient of determination.

¹Log IC₅₀ in mM; log LD₅₀ in mmol/kg.

²Regression based on a single point per substance (i.e., the geometric mean of the within laboratory replicate IC₅₀ values and the reference rat acute oral LD₅₀ from Table 4-2).

³Regression based on a single point per substance (i.e., the geometric mean of the geometric mean IC₅₀ values obtained for each laboratory and the reference rat acute oral LD₅₀ from Table 4-2).

Table 3 はずれ値を示した化合物のまとめ (BRD より抜粋)

化合物名の後ろに記載されている (+) は毒性が overpredict されたもの、(-) は毒性が underpredict されたもの。

Table 6-3 Outlier Substances for the RC and the 3T3 and NHK NRU Methods When the RC Millimole Regression is Used¹

Substances Included in the RC Identified as Outliers in:		
RC ²	3T3 ³	NHK ⁴
	Acetaminophen (+)	
	Arsenic III trioxide (-)	Arsenic III trioxide (-)
		Aminopterin (-)
5-Aminosalicylic acid (+)		5-Aminosalicylic acid (+)
Busulfan (-)	Busulfan (-)	Busulfan (-)
Caffeine (-)		Caffeine (-)
Cycloheximide (-)	Cycloheximide (-)	Cycloheximide (-)
Dibutyl phthalate (+)	Dibutyl phthalate (+)	Dibutyl phthalate (+)
	Diethyl phthalate (+)	Diethyl phthalate (+)
Digoxin (-)	Digoxin (-)	
Disulfoton (-)	Disulfoton (-)	Disulfoton (-)
Epinephrine bitartrate (-)	Epinephrine bitartrate (-)	Epinephrine bitartrate (-)
Ethanol (+)	Ethanol (+)	Ethanol (+)
Lindane (-)	Lindane (-)	
Mercury II chloride (-)	Mercury II chloride (-)	Mercury II chloride (-)
		Methanol (+)

はずれ値を示した化合物のまとめ-つづき-(BRD より抜粋)

Substances Included in the RC Identified as Outliers in:		
RC ²	3T3 ³	NHK ⁴
Nicotine (-)	Nicotine (-)	Nicotine (-)
Paraquat (-)		Paraquat (-)
Parathion (-)	<i>Parathion (-)</i>	<i>Parathion (-)</i>
Phenobarbital (-)	Phenobarbital (-)	Phenobarbital (-)
Phenylthiourea (-)	Phenylthiourea (-)	Phenylthiourea (-)
Potassium cyanide (-)	Potassium cyanide (-)	Potassium cyanide (-)
Propylparaben (+)	Propylparaben (+)	Propylparaben (+)
		<i>Sodium oxalate (-)</i>
Thallium I sulfate (-)	Thallium I sulfate (-)	
Triethylenemelamine (-)	Triethylenemelamine (-)	Triethylenemelamine (-)
1,1,1-Trichloroethane (+)		
Verapamil HCl (-)	Verapamil HCl (-)	<i>Verapamil HCl (-)</i>
		<i>Xylene (+)</i>
Outliers That Were Not Included in the RC		
	Dichlorvos (-)	Dichlorvos (-)
	<i>Endosulfan (-)</i>	Endosulfan (-)
	<i>Fenprothrin (-)</i>	<i>Fenprothrin (-)</i>
	Physostigmine (-)	Physostigmine (-)
	Sodium hypochlorite (+)	Sodium hypochlorite (+)
	Sodium selenate (-)	Sodium selenate (-)
	<i>Strychnine (-)</i>	<i>Strychnine (-)</i>

Abbreviations: RC=Registry of Cytotoxicity; 3T3=BALB/c 3T3 fibroblasts; NHK=Normal human epidermal keratinocytes; NRU=Neutral red uptake; (-)=Toxicity was underpredicted by the IC₅₀ and RC millimole regression (i.e., the LD₅₀ value predicted by the IC₅₀ was higher than the *in vivo* LD₅₀ value); (+)=Toxicity was overpredicted by the IC₅₀ and RC millimole regression (i.e., the LD₅₀ value predicted by the IC₅₀ was lower than the *in vivo* rodent LD₅₀ value).

[Note: Empty cells indicate that the substance was not an outlier for that particular IC₅₀ value.]

¹Log LD₅₀ (mmol/kg) = 0.435 log IC₅₀ (mM) + 0.625. Log LD₅₀ (mmol/kg) values for outlier substances were >0.699 from the RC millimole regression.

²Using RC IC₅₀ in the RC millimole regression for the 58 RC substances tested in the validation study.

³Using the 3T3 NRU IC₅₀ in the RC millimole regression for the 70 reference substances that yielded IC₅₀ values from any laboratory in the validation study.

⁴Using the NHK NRU IC₅₀ in the RC millimole regression the RC for the 71 reference substances that yielded IC₅₀ values from any laboratory in the validation study.

Bolded substances have active metabolites *in vivo* (see Table 3-7).

Substances that showed evidence of insolubility (i.e., precipitates) during testing (see Table 5-11) are identified by italics.

NRU 法による GHS カテゴリーの予測性 (BRD より抜粋)

Table 6-7 Prediction of GHS Acute Oral Toxicity Category by the 3T3 and NHK NRU Test Methods and the RC Rat-Only Millimole Regression¹

Reference Rat Oral LD ₅₀ ^a (mg/kg)	3T3 -Predicted GHS Category (mg/kg)						Total	Accuracy	Toxicity Over-predicted	Toxicity Under-predicted
	LD ₅₀ < 5	5 < LD ₅₀ ≤ 50	50 < LD ₅₀ ≤ 300	300 < LD ₅₀ ≤ 2000	2000 < LD ₅₀ ≤ 5000	LD ₅₀ > 5000				
LD ₅₀ < 5	0	2	0	4	0	0	6 ^d	0%	0%	100%
5 < LD ₅₀ ≤ 50	0	1	6	3	1	0	11 ^e	9%	0%	91%
50 < LD ₅₀ ≤ 300	0	0	5	7	0	0	12	42%	0%	58%
300 < LD ₅₀ ≤ 2000	0	1	2	13	0	0	16	81%	19%	0%
2000 < LD ₅₀ ≤ 5000	0	0	0	10	0	0	10 ^f	0%	100%	0%
LD ₅₀ > 5000	0	0	0	8	2	2	12 ^g	17%	83%	0%
Total	0	4	13	45	3	2	67	31%	34%	34%
Predictivity	0%	25%	38%	29%	0%	100%				
Category Overpredicted	0%	25%	15%	40%	67%	0%				
Category Underpredicted	0%	50%	4%	31%	33%	0%				
Reference Rat Oral LD ₅₀ ^a	NHK -Predicted Toxicity Category (mg/kg)						Total	Accuracy	Toxicity Over-predicted	Toxicity Under-predicted
	LD ₅₀ < 5	5 < LD ₅₀ ≤ 50	50 < LD ₅₀ ≤ 300	300 < LD ₅₀ ≤ 2000	2000 < LD ₅₀ ≤ 5000	LD ₅₀ > 5000				
LD ₅₀ < 5	0	1	2	3	0	0	6 ^d	0%	0%	100%
5 < LD ₅₀ ≤ 50	0	2	5	3	1	0	11 ^e	18%	0%	82%
50 < LD ₅₀ ≤ 300	0	1	6	5	0	0	12	50%	8%	42%
300 < LD ₅₀ ≤ 2000	0	1	2	12	1	0	16	75%	19%	6%
2000 < LD ₅₀ ≤ 5000	0	0	0	10	0	0	10 ^f	0%	100%	0%
LD ₅₀ > 5000	0	0	0	7	6	0	13 ^g	0%	100%	0%
Total	0	5	15	40	8	0	68	29%	40%	31%
Predictivity	0%	40%	40%	30%	0%	0%				
Category Overpredicted	0%	40%	13%	43%	75%	0%				
Category Underpredicted	0%	20%	47%	28%	25%	0%				

Abbreviations: GHS=Global Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN 2009); 3T3=BALB/c 3T3 fibroblasts; NHK=Normal human epidermal keratinocytes; NRU=Neural red uptake; RC=Registry of Cytotoxicity. Shaded cells are those containing the correct predictions.

¹The RC rat-only millimole regression is $\log LD_{50} \text{ (mmol/kg)} = \log IC_{50} \text{ (mM)} \times 0.439 + 0.621$. Numbers in table represent numbers of substances.

²Reference rat oral LD₅₀ values in mg/kg from Table 4-2.

³Epinephrine bitartrate excluded because no rat reference acute oral LD₅₀ was identified (see Table 4-2).

⁴Colchicine excluded because no rat acute oral LD₅₀ was identified (see Table 4-2).

⁵Carbon tetrachloride excluded because no laboratory attained sufficient toxicity for the calculation of an IC₅₀.

⁶Methanol excluded because no laboratory attained sufficient toxicity for the calculation of an IC₅₀.

⁷Propylparaben excluded because no rat acute oral LD₅₀ was identified (see Table 4-2).

JaCVAM 急性毒性代替法評価委員会は以下のように意見をまとめた。

毒性の強い化合物の予測性は低く under prediction の傾向がある。結果的に選択された初回投与量が致死量を超えている可能性が高く、投与した動物の苦痛軽減に寄与できないと判断する。

心臓及び CNS への薬理作用が想定される化合物については本試験による予測性が低いことが示されている。一方、心臓及び CNS 以外の毒性メカニズムについては網羅的に確認されていないことから、他にメカニズム面からはずれ値を示す化合物群が存在するかどうかの検討が不十分であると考え。今後集積されるデータを再度レビューして毒性メカニズムを幅広く考察する事を要望する。

はずれ値の考察のため物理化学的な性質については、分子量、沸点、pH、logKow などが調査されリスト化 (BRD Appendix L1) されているが、情報はまだ十分整っていない。物理化学的パラメータによるクラス分けについても今後蓄積されるデータの追加解析により精度を向上させることが出来ると考えるので追加解析を要望する。現状では単独のパラメータを用いた評価にとどまっていることから、今後複合的な解析も必要である。

7. 試験方法の信頼性

3T3 および NHK NRU 法の信頼性は、施設間および施設内に関する再現性にて論ぜられた。施設内再現性は、同一の試験計画書にて同じ施設で繰り返し実施された試験結果にて評価された。施設間再現性は、同一の試験計画書にて同一の参照化合物を用い異なる試験施設にて評価された結果を用いて評価された。再現性の評価には、3つのすべての研究所において、3T3 細胞で 64 の参照化合物を、NHK 細胞で 68 の参照化合物をそれぞれ試験し、繰り返し IC₅₀ 値を算出した結果を用いた。3T3 NRU 法及び NHK NRU 法における IC₅₀ 値データの施設内再現性及び施設間再現性について、分散分析 (ANOVA)、変動係数 (CV) 解析、研究所別 IC₅₀ - LD₅₀ 回帰の比較及び研究所内平均 IC₅₀ 値の最大値/最小値比の比較により評価した。その結果、ばらつきは大きいものの再現性は概して NHK NRU 法の方が良好であった。

今回の試験にて評価された参照化合物は、3 章に記載されているように、GHS 区分全体にわたる広範囲の領域から選択されている。

施設別 IC₅₀-LD₅₀ 回帰による施設内類似性の評価を基とした再現性の解析では、3T3 NRU 法、NHK NRU 法ともに 95%信頼限界内であった。ANOVA 解析では、3T3 NRU 法の 23 物質において、また NHK NRU 法の 6 物質で施設間に有意な差が認められた。施設内 CV は、3T3 NRU 法において 1-122% の範囲であり、NHK NRU 法では 1-129% の範囲であった。平均研究所内 CV は、両 NRU 試験法とも 26% であったが、平均研究所間 CV は NHK ではより低い平均 CV (3T3 の 47% に対し 28%) であった。施設間の CV は、3T3 試験法において 3-135% の範囲であり、NHK NRU 法では 1-91% の範囲であった。FAL における施設内平均 CV は 3T3 で 33%、NHK で 43% であり、最も高い値であった。再現性は概して NHK NRU 法の方が良好であった。

参照化合物の化学特性と施設間 CV の関係を示す解析を行った結果、化学構造、物理的形状、溶解性や揮発性は CV にほとんど影響を示さなかった。CV の大きさは GHS 急性毒性区分、IC₅₀ 値及び沸点に関連すると考えられた。施設間 CV の平均値は、最も毒性の強い GHS 分類の物質では特に 3T3 NRU 法において他の毒性分類の物質より大きかった。3T3 NRU 法において、施設間平均 CV は、LD₅₀ 値が 5 mg/kg 以下の区分で 72%、LD₅₀ 値が 5 mg/kg 超 50 mg/kg 以下の区分では 78% であり、全体の施設間平均 CV は 47% であった。NHK NRU 法において、施設間平均 CV は、5 mg/kg 以下の区分で 37%、LD₅₀ 値が 5 mg/kg 超 50 mg/kg 以下の区分で 41% であり、全体の施設間 CV の平均値は 28% であった。Spearman の相関解析により IC₅₀ 値と施設間 CV との逆相関が、3T3 NRU 法 (p=0.0015) 及び NHK NRU 法 (p=0.014) のいずれにおいても認められた。

沸点と施設間 CV との正の相関 ($p=0.007$) (即ち、沸点が高いほど CV 値も高い) が 3T3 NRU 法で見られたが、NHK NRU 法 ($p=0.809$) では認められなかった。

3T3 NRU 法による陽性対照物質 (SLS) の IC_{50} 値の ANOVA 解析では、施設間で有意差 ($p=0.006$) を示したが、施設内の各試験 Phase における比較では差がみられなかった ($p>0.01$)。しかし、施設間の CV は Phase Ia 及び Phase Ib において 6%、Phase II では 10%、Phase III では 2% と比較的小さな値であったが、施設内 CV は 5% から 24% であった。

NHK NRU 法の SLS の ANOVA 解析結果、施設間や施設内の各試験 Phase における比較で有意 ($p<0.001$) であった。Phase Ib 後に FAL では培養法が変更され SLS の IC_{50} 値が経時的に低下傾向にあったが、FAL の施設内 CV は依然として他の施設より高かった。各試験 Phase において、NHK NRU 法による SLS の IC_{50} 値の施設内 CV は 11% から 51% であるのに対し、3T3 NRU 法による SLS の施設間 CV は Phase III の 8% から Phase Ib の 39% であり、3T3 NRU 法に比較して NHK NRU 法はばらつきが大きかった。

参照化合物の溶解に使用された溶媒は細胞培養液が 38 化合物、DMSO が 34 化合物であった。参照化合物の溶媒選択の 3 つの施設間の一致性は 76% (55/72) であった。今回の試験の信頼性保証評価を実施した施設とは別に、溶解性試験のみに参加した BioReliance は他の 3 施設に比較して高い溶解性を得ていた (溶解試験の方法は 2 章記載)。全ての施設で同様のプロトコルで溶解試験を実施しているが、常に同じ結果が得られてはいない。施設によっては、いくつかの参照化合物で IC_{50} 値を算出することができていなかった。 IC_{50} 値が得られなかった化合物は、その大部分が有機溶媒であった (Lithium I carbonate、Methanol、1,1,1-Trichloroethane、Carbon tetrachloride、Xylene)。施設内で行われる手技にばらつきがあるために、施設内および施設間の再現性に差異が生じるという問題点は、試験中にも取り上げられた。GLP を遵守し実施した二つの施設のデータは極めてよく一致していたことが示され、さらにその他の施設の成績に比べ、ばらつきやエラー発生率がより低い傾向にあったことも示された。すべての施設に対し、共通のトレーニングを行った後では、施設間のバラツキは減少した。このことから、基本的手技訓練と、プロトコル遵守の必要性が示された。試験を実施する研究者は、細胞や培養法さらには適切な科学的方法について、十分にトレーニングを受けるべきである。

JaCVAM 急性毒性代替法評価委員会では以下のように意見をまとめた。

3T3 および NHK NRU 法による試験の信頼性の検討が、3 研究所にて実施された再現性の検討結果をもとに論じられた。試験結果には施設間差がみられており、施設間で生じるバラツキの理由に

ついて考察することは、信頼性確保の上からも有益と考える。試験を実施した3施設のうちFALにおいては、他の施設と同様のトレーニングを実施したにもかかわらず他施設に比べ高い傾向がみられ、この点について更に考察を加えるべきである。

ANOVA解析による施設内および施設間の再現性の有意差に関する検討では、サンプルサイズや研究施設内でのばらつきにもよるが、有意差が見られるのは、施設間の差が極めて少ない場合、または有意差が見られないのは、施設間に極めて大きなバラツキがある場合もある。この点も十分考慮した評価を行うことを考えると単純なANOVA解析のみの結果で評価を行うことには異論がある。

3T3およびNHK NRU法による試験結果に関し、NHK NRU法の再現性が良好であったが、この理由について更に考察を加えるべきである。

試験を実施する場合、試験手技の習熟と計画書遵守に関するトレーニングは最低限必要なことである。その上で化合物の IC_{50} 値が算出できなかった理由を考えるとともに、試験に使用する溶媒の選択計画についても十分に協議すべきである。

8. 試験方法のデータの質

バリデーションが実施された施設のうち、ECBC と IIVS は GLP 適合施設、FAL は適合していない施設であった。参照化合物の調達や配布のための準備は、GLP 適合施設である BioReliance が実施した。FAL における試験は GLP 精神に従って実施された。FAL に対して、バリデーション試験マネージメントチーム (SMT) は「記録すべき項目」を提示したことに対し、バリデーション試験開始以前から試験操作において記録を実施する指針を所有していた。様々な実験室の活動はワークブック、日誌に記録されており、その情報を SMT が確認できた。

GLP における逸脱または不履行の影響については、研究マネージメントチームにより究明された。EXCEL[®]または PRISM[®]のテンプレートへのデータの移行に誤りが認められ、すべてのデータシートが再調査され、修正がなされた。そして正確なデータが統計解析に用いられた。逸脱または不履行の多くは小さなものであり、データの質に影響はなかった。FAL は他の 2 施設に比べて、データ移行における誤りの割合、試験の受け入れ基準不適合の割合、施設内再現性の検討における変動係数が高い値を示した。しかし、GHS 分類での急性経口毒性の分類の予測能は他の施設と同程度であった。

試験法のデータの質に関わるデータ (BRD より抜粋)

項目	ECBC	IIVS	FAL
GLP への適合	GLP	GLP	GLP の精神に従って実施
データ移行に誤りが認められた試験の割合 [#]	49/402	25/419	171/513
受け入れ基準に適合しなかった本試験の割合 [#] (%)	21 (3T3) 8 (NHK)	22 (3T3) 10 (NHK)	30 (3T3) 32 (NHK)
変動係数 ^{\$} (%)	23 (3T3) 23 (NHK)	21 (3T3) 14 (NHK)	33 (3T3) 42 (NHK)

予測した GHS 区分が一致した割合 [§] (%)	30 (3T3) 31 (NHK)	27 (3T3) 31 (NHK)	25 (3T3) 29 (NHK)
-------------------------------------	----------------------	----------------------	----------------------

#:第 3 フェーズにおけるデータ、\$:全フェーズにおけるデータ

3 施設で行われたバリデーション試験におけるデータの質について検討した。ECBC と IIVS における GLP からの逸脱または不履行が小さなものであり、試験責任者または研究マネージメントチームが適切に対処していることから、これら 2 施設のデータの質について JaCVAM 評価委員会は問題無いと判断した。

FAL については GLP 適合施設でなく、他の 2 施設に比較して、測定やデータ収集の精度に関して劣っていたものの、データ移行における誤りは修正され、結果のばらつきも GHS 分類での急性経口毒性の分類の予測に影響を与えるレベルで無かったことから、JaCVAM 評価委員会はデータの質について問題無いと判断した。

GLP 適合施設である ECBC と IIVS の方が、GLP に適合していない FAL よりもバリデーション時のデータの質が高かったため、本試験が GLP 適用下での実施を必須とするか否かについて検討した。その結果、JaCVAM 評価委員会は、急性毒性試験における初回投与量の予測という目的を考慮し、試験成立条件のクライテリアの適合の確認、その他のクオリティチェックを十分にすれば、必ずしも GLP 適用下で実施する必要はないと判断した。

試験のデータの質を確認するために、ICCVAM の評価ではデータ移行における誤りの割合、試験の受け入れ基準不適合の割合、施設内再現性の検討における変動係数で検討した。JaCVAM 評価委員会は、本試験を実際に使用する際には、あらかじめ各施設において参照化合物を使用した試験を実施すべきであり、その結果が妥当であるか否かを確認する事が試験のデータの質を確保するうえで必要であると判断し、推奨することとした。

9. その他の試験方法の科学的な報告

種々の細胞を用いた *in vitro* NRU 細胞毒性試験は、げっ歯類の致死率との相関性が評価されている。

Peloux らと Fautrel らはラット初代培養肝細胞を用いて NRU 測定と腹腔内/静脈内、静脈内による毒性データとの相関性をそれぞれ $r=0.877(n=25)$ 、 $0.88(n=11)$ とし、良い相関を得ている。Roguet らは初代培養肝細胞への 21 時間被験物質暴露後に NRU 測定を行った結果、経口投与の LD_{50} 値との間に有意な直線相関 ($p<0.001$, $r=0.80$, $n=28$) を得ている。しかし、一方で、前出の Fautrel らは腹腔内投与による毒性データに対し相関係数は $r=0.48(n=14)$ 、経口投与に対し $r=0.17(n=15)$ であり、有意な相関は認められなかったことも報告している。

3T3 および NHK NRU 試験は、急性毒性試験の開始用量の予測以外に、眼刺激性、ヒト致死血中濃度、*in vivo* の光毒性の予測に関して評価されている。このうち、3T3 NRU 試験は *in vivo* 光毒性物質を同定する試験として ECVAM によりバリデートされた。2004 年に OECD ガイドライン 432・*in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験として採択されている。

バリデートされていないが、*in vitro* 試験法による急性経口毒性の予測を試みた試験は多数報告されており、*in vitro* 細胞毒性データを利用することによる動物削減が評価されている。急性経口毒性試験の投与開始用量が、動物実験の LD_{50} 値に等しいとした場合、UDP 法における動物削減の理論的な予測値は 25~40% の範囲であった。一方、NICEATM/ECVAM 研究で試験された参照化合物に対し、UDP 法のコンピューターシミュレーションモデルを用いて予測された動物数削減は 5.3~7.8% であった。Halle らは RC の *in vitro* 細胞毒性データの利用 (回帰式を用いて予測した LD_{50} 値を開始用量として利用) により ATC 法の動物数削減が 32% に達することを見出した。

NICEATM/ECVAM のバリデーション研究で試験された参照化合物は RC millimole regression に対して大部分がはずれ値を取っており、ATC 法の平均動物削減は、コンピューターシミュレーションモデルで測定した場合、4.8~10.2% であった。

細胞毒性試験を用いるげっ歯類の急性毒性試験の予測に関連した他の報告について検討した。NRU 試験の再現性については、光毒性のバリデーション研究をはじめ様々な検討が過去に行われており、適切な試験条件を設定することにより再現性を確保できると JaCVAM 評価委員会は推察した。

急性毒性の予測性については、細胞毒性と LD₅₀ 値の間ではずれる物質も多いものの、関連する報告が認められており、急性毒性試験の開始用量を予測し動物数の削減を図る利用方法は妥当なものと JaCVAM 評価委員会は判断した。

細胞毒性試験を用いるげっ歯類の急性毒性試験の予測に関連した他の報告を俯瞰し、JaCVAM 評価委員会は、動物数の削減効果の予測は報告により様々であるが、少なくとも削減を図れる方向であることが予測されており、3Rs の観点から望ましいと判断した。

10. 3Rs への関与

3T3 及び NHK NRU 試験は *in vivo* 急性毒性試験の代替 (Replacement) にはなり得ないが、細胞毒性試験の結果に基づいて急性毒性試験の初回投与量を設定する場合、急性毒性試験における使用動物数の削減 (Reduction) 及び死亡動物の削減や動物への苦痛・ストレスの軽減 (Refinement) に繋がる可能性は考えられる。

使用動物数 (Reduction) 及び死亡動物数の削減 (Refinement) について、コンピュータシミュレーションにより次のように検証された。

- 1) UDP 法では、NRU 法の IC_{50} 値から推定した初回投与量を用いた場合、固定の初回投与量 (175 mg/kg) を用いた場合と比較して、一試験当たり平均 0.49 匹 (6.2%) ~ 0.66 匹 (7.0%) の動物数しか削減されないこと (Reduction) が示された。
- 2) ATC 法では、NRU 法の IC_{50} 値から推定した初回投与量を用いた場合、固定の初回投与量 (300 mg/kg) を用いた場合と比較して、一試験当たり平均 0.51 匹 (4.8%) ~ 1.09 匹 (10.2%) の動物が削減されることが (Reduction) 示された。
- 3) 低毒性毒性物質の場合 (LD_{50} 値: >2000 mg/kg 又は >5000 mg/kg)、それぞれ UDP 法では一試験当たり 1.28 匹 (11.9%) ~ 1.65 匹 (16.7%)、ATC 法では一試験当たり 2.03 匹 (17.1%) ~ 3.33 匹 (27.7%) の動物が削減されることが示され、このクラスの被験物質では比較的多数の使用動物の削減 (Reduction) が期待できると判断した。
- 4) しかし、死亡動物数については、ATC 法で固定の初回投与量を用いるよりも一試験当たり僅か 0.5 ~ 0.6 匹しか削減されず、NRU 法を用いることで死亡動物数の削減及び動物への苦痛やストレスの軽減 (Refinement) を明確に示すことは困難である。

コンピュータシミュレーションによる使用動物数 (BRD より抜粋)

Table 10-3 Animal Use¹ for the UDP² by GHS Acute Oral Toxicity Category³ Using Starting Doses Based on the 3T3 and NHK NRU Test Methods with the RC Rat-Only Millimole Regression⁴

GHS Acute Oral Toxicity Category ³	Number of Reference Substances	Dose-mortality Slope = 2.0			Dose-mortality Slope = 8.3		
		With Default Starting Dose ⁵	With IC ₅₀ -Based Starting Dose ⁶	Animals Saved ⁷	With Default Starting Dose ⁵	With IC ₅₀ -Based Starting Dose ⁶	Animals Saved ⁷
3T3 NRU Test Method							
LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg	6	11.32 ± 0.20	10.19 ± 0.70	1.14 (10.0%)	9.70 ± 0.28	8.74 ± 0.43	0.96 (9.9%)
5 < LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg	11	9.68 ± 0.23	9.74 ± 0.45	-0.07 (-0.7%)	8.46 ± 0.28	8.54 ± 0.47	-0.08 (-1.0%)
50 < LD ₅₀ ≤ 300 mg/kg	12	7.76 ± 0.10	8.18 ± 0.21	-0.42 (-5.5%)	6.61 ± 0.19	6.90 ± 0.19	-0.29 (-4.3%)
300 < LD ₅₀ ≤ 2000 mg/kg	16	8.53 ± 0.21	8.14 ± 0.21	0.38 (4.5%)	7.46 ± 0.24	7.15 ± 0.19	0.31* (4.1%)
2000 < LD ₅₀ ≤ 5000 mg/kg	10	10.73 ± 0.10	9.46 ± 0.15	1.28* (11.9%)	9.17 ± 0.23	7.96 ± 0.31	1.21* (13.2%)
LD ₅₀ > 5000 mg/kg	12	9.87 ± 0.34	8.29 ± 0.49	1.58* (16.0%)	7.76 ± 0.59	6.18 ± 0.69	1.58* (20.3%)
NHK NRU Test Method							
LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg	6	11.21 ± 0.24	10.47 ± 0.71	0.75 (6.7%)	9.66 ± 0.27	8.95 ± 0.52	0.71 (7.3%)
5 < LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg	11	9.65 ± 0.16	9.99 ± 0.45	-0.34 (-3.5%)	8.43 ± 0.26	8.77 ± 0.49	-0.33 (-3.9%)
50 < LD ₅₀ ≤ 300 mg/kg	12	7.78 ± 0.11	8.12 ± 0.21	-0.34 (-4.4%)	6.57 ± 0.19	6.85 ± 0.19	-0.28 (-4.2%)
300 < LD ₅₀ ≤ 2000 mg/kg	16	8.55 ± 0.22	8.03 ± 0.23	0.52* (6.1%)	7.49 ± 0.25	7.00 ± 0.20	0.49* (6.5%)
2000 < LD ₅₀ ≤ 5000 mg/kg	10	10.75 ± 0.08	9.54 ± 0.20	1.21* (11.3%)	9.17 ± 0.23	8.06 ± 0.29	1.11* (12.1%)
LD ₅₀ > 5000 mg/kg	13	9.87 ± 0.32	8.41 ± 0.44	1.47* (14.8%)	7.66 ± 0.59	6.18 ± 0.69	1.47* (19.2%)

Abbreviations: 3T3=BALB/c 3T3 fibroblasts; GHS=Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN 2005); NHK=Normal human epidermal keratinocytes; RC=Registry of Cytotoxicity; UDP=Up-and-Down Procedure.

*Statistically significant (p<0.05) by a one-sided Wilcoxon signed rank test. Percentage difference shown in parentheses.

¹Mean numbers of animals used ± standard errors for 10,000 simulations for each substance with an upper limit dose of 5000 mg/kg. Although the simulations used whole animals, averaging the results over a large number of simulations produced fractional numbers. Results are provided for 67 substances in the 3T3 NRU test method and 68 substances in the NHK NRU test method. Substances were categorized using the rat acute oral LD₅₀ reference values in mg/kg from Table 4-2.

²OECD (2001a); EPA (2002a).

³UN (2005).

⁴The RC rat-only millimole regression is $\log LD_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.439 \log IC_{50} (\text{mM}) + 0.621$.

⁵Default starting dose = 175 mg/kg.

⁶The starting dose was one default dose lower than the predicted LD₅₀ calculated using the IC₅₀ value for each reference substance in the RC rat-only millimole regression. The IC₅₀ value for each reference substance was randomly selected from the distribution of values obtained during the testing with each method.

⁷Difference between mean animal use with the default starting dose and mean animal use with the predicted starting dose.

NRU 法は、in vivo 急性毒性試験の Replacement を意図していないため、この点について JaCVAM 評価委員会は判断しなかった。

一定の基準を設けたシミュレーションにより Reduction について検証された結果から、低毒性物質 (LD₅₀ 値: >2000 mg/kg 又は >5000 mg/kg) の場合では in vitro 試験の導入により一試験当たり 1~3 匹の使用動物数の削減が期待できると判断する。

Refinement に関して、死亡動物数の削減及び動物への苦痛やストレスの軽減を明確に示すことは困難と判断した。強毒性の化合物については初回投与量の予測性が低く、IC₅₀ 値に基づいた初回投与量が動物実験の LD₅₀ 値を超えることが予測され、このクラスの化合物では動物への苦痛を与える可能性がある。

11. 試験方法の有用性と限界

3T3 及び NHK 細胞を用いた NRU 法は、急性毒性のハザード分類を予測するための代替法ではなく、急性経口投与毒性試験で用いられる UDP 法や ATC 法の初回投与用量を決定するための試験として有用である。

被験物質が低毒性(LD₅₀ 値>5000mg/kg)の場合は、NRU 法により使用動物数の削減が可能と考えられる。ATC 法の場合、実験条件によっては、死亡または安楽死に至る動物数の削減も可能と判断する。

3T3 NRU 法は、NHK NRU 法に比べて、実験者の安全面や費用面で優れており、一般的な試験として推奨できる。また再現性の点では劣るものの、動物数削減と正確性の点でわずかに上回っている。

他の同様な細胞毒性試験を利用する場合は、ICCVAM が推奨する 30 種類の参照化合物を用いて評価を行い、3T3 及び NHK NRU 法の精度と信頼性が同等以上であることが必要である。

一方、毒性発現機序(神経毒性や心毒性)によっては、NRU 法による初回投与量の評価は適切ではない。より正確なハザード分類を行うためには、将来的に作用機序や ADME(吸収、分布、代謝、排泄)を評価する *in vitro* 試験系の利用の可能性を考慮すべきである。今後、さらに混合物の評価も含めて、*in vitro* 及び *in vivo* 条件下における高品質のデータベース拡充を図り、*in vitro* 細胞毒性試験の有用性と限界を特徴づけることが必要と考えられる。今後実施するラット急性経口投与毒性試験では、死亡に至る機序と直接関係のある所見を集めるための標準的な手順を含めるべきであろう。

ただし、*in vivo* 試験は、データ収集のためだけに実施するべきではない。また、*in vivo* のデータベースは、他の動物を使用しないアプローチ(構造活性相関のソフトウェア等)の有用性評価にも用いられるべきである。

ICCVAM の評価報告書には、3Rs の検証に用いられたコンピューターシミュレーションのアルゴリズムや計算過程が記載されていなかったことから、シミュレーション方法の妥当性と削減可能な動物数について JaCVAM 評価委員会は判断できなかった。

NRU 法による初回投与量設定試験をガイドラインとして運用する場合には、その後に実施する急性毒性試験での使用動物数や死亡動物数のデータを蓄積して 3Rs について検証することが必要である。

3T3 及び NHK NRU 法は、代謝活性化法が確立されていないため、代謝を介した毒性を評価するには適切ではない。

被験物質が生体内において吸収が低い場合、一般的に *in vitro* 毒性試験結果から *in vivo* への外挿は困難である。

12. 結論

ICCVAM で実施された細胞毒性試験による急性毒性試験の初回投与量設定試験の第三者評価は、バリデーションに必要な項目、プロセス及びデータが検討されており、ICCVAM のバリデーション結果を受け入れることに問題はないと判断した。72 種類の化合物から得られた IC_{50} 値と LD_{50} 値の間に相関が認められ、低毒性の化合物については予測性があると考えられる。したがって、急性毒性試験の実施に際して、NRU 法は化合物の物性、類縁化合物の情報などと並んで、初回投与量決定の一助になると考えられ、必要に応じて活用可能である。

細胞毒性試験による急性毒性試験の初回投与量設定試験は、72 種類の化合物から得られた IC_{50} 値と LD_{50} 値の相関性を根拠として一般化しているが、動物の死と細胞の死が類似するメカニズム的な根拠が不十分である。相関性は必ずしも因果関係を説明するものではない。急性毒性試験は、個体死またはそれに近い一般状態の変化をエンドポイントにしている。個体死は、呼吸または心臓の停止状態が観察された時点であり、また、苦痛、痙攣、チアノーゼなどの一般状態は安楽死を選択する人道的エンドポイントである。神経系、循環器、呼吸器などコアバッテリーに作用する化合物は、細胞や組織間のシグナル伝達をかく乱することによって、強力な毒作用が急速に発現して個体死を招くが、細胞死によって発現するものではない。このような化合物の NRU 法による予測性は低く、 IC_{50} 値から予測される毒性は過小評価されている。NRU 法を適用することで本来の LD_{50} 値からかけ離れた高用量を投与する可能性があるため、動物へ与える苦痛の低減、使用動物数削減に寄与するとは言い難い。

代謝活性化系が NRU 法の評価系からは除外されているため、活性代謝物が毒性を示す化合物についても評価はできないと考えられる。揮発性の化合物、難溶解性の化合物及び有色の化合物は本実験を適用することが困難である。このような物性を有する化合物を NRU 法で評価するのは科学的妥当性に欠ける。したがって、物性情報を基に、本試験の実施の可否を決定するオプションが必要である。

動物試験結果から得られる LD_{50} 値が 4 倍から 14 倍のばらつきがあることを考慮すると IC_{50} 値を正確に測定することは、必ずしも必要とは考えられない。また、複数の、しかも費用のかかる試験法によって IC_{50} 値を正確に特定しても、費用の面から非生産的である。

動物数の削減効果は、コンピューターシミュレーションで確認しているのみであり、実際の試験においては、一般状態の観察から人道的エンドポイントによって安楽殺を選択する場合もありえる。使用動物の削減には本当に繋がる試験であるかは、実際に使用した動物数が記載されている化合物の試験情報と、この試験で予測された初回投与量から予測される動物数を比較して検証する

ことが必要である。また、NRU 法をガイドラインに導入した場合には、試験情報を集計して動物数の削減が実現できているかについて検証する必要がある。

データの信頼性保証の面からは、NRU法の目的は初回投与量を設定するための試験であり、GLP適用の試験を実施する必要性はない。

その他、JaCVAM 急性毒性代替法評価委員会の議論において少数であるが、以下のような意見が提案された。

- (1) *In vitro* 細胞毒性試験を実施してから急性毒性試験を実施した場合、従来どおり最初から急性毒性試験を実施した場合と比較して、経費、人的リソース、試験期間にどのくらいの違いがあるかを議論すべきである。
- (2) 物性情報から生体への吸収が著しく低いと考えられる化合物では、最高用量である 2000 mg/kg の投与のみで試験が成立し、最小限の動物数で化合物の評価ができる場合がある。従って、急性毒性試験の実施前に必ずしも細胞毒性試験を実施する必要はなく、1つの選択肢として考えるべきあり、定量的構造活性相関(QSAR)等の方法も使用できることを明記すべきである。
- (3) 物性が明らかでない被験物質の GLP 試験実施は困難である。
- (4) 本当に動物削減に寄与するのか？
- (5) 初回投与量を固定して実施した動物を用いた試験に比較すれば、結果が良くなるのは当然ではないか。実際には、一匹の動物に予備的に投与して一般状態を観察した結果から、用量設定をして本試験の用量を決定していることがある。そのような情報を元に、300 mg/kg の固定用量ではない初回用量を設定するはずである。実際には、一匹の動物を使うことで、試験全体での動物数の削減がなされているのではないか。
- (6) *In vitro* の試験を専門とする研究者にとっては、予測性の高い試験として完成させて導入することを望む。
- (7) 現在、毒性の強い化合物と毒性の弱い化合物がどれくらいの割合で評価されているか、ということも重要である。この試験では毒性が強いものの予測率が低いので、その割合が高いのであれば、外れることが多い試験と考えられる。
- (8) *In vitro* と *in vivo* の試験結果が一致しない理由の一つとして、ADME、特に代謝物が毒性に関与する場合が考えられる。CYP 発現細胞を用いた細胞毒性試験でもアフラトキシン等を除くと検出は困難であるが、それを考慮した試験系を構築することが予測性を高めるためには必要である。

13. 参考文献

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM), National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health, U. S. Public Health Service, Department of Health and Human Services, BACKGROUND REVIEW DOCUMENT, *in vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, NIH Publication No: 07-4518

Borenfreund E, Puerner JA. 1985. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24:119-124.

Clemedson C, Barile FA, Ekwall Ba, Gon. *Toxicol Lett* 24:119-124. K, et al. 1998a. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part III. In vitro results from 16 additional methods used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. *Altern Lab Anim* 26 (suppl 1):93-129.

Clemedson C, Andersson M, Aoki Y, Barile FA, Bassi AM, Calleja MC, et al. 1998b. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Part IV. In vitro results from 67 toxicity assays used to test reference chemicals 31-50 and a comparative cytotoxicity analysis. *Altern Lab Anim* 26 (suppl 1):131-183.

Ekwall B. 1983. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann New York Acad Sci* 407:64-77.

Halle W. 1998. Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD₅₀) zur Einsparung von Tierversuchen. *Life Sciences/Lebenswissenschaften*, Volume 1, Jülich: Forschungszentrum Jülich.

Halle W. 2003. The Registry of Cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD₅₀) and to reduce testing in animals. *Altern Lab Anim* 31:89-198. (English translation of Halle 1998)

ICCVAM. 2001a. Report Of The International Workshop On In vitro Methods For Assessing Acute Systemic Toxicity. NIH Publication No. 01-4499. Research Triangle Park, NC:National Institute

for Environmental Health Sciences. Available: <http://iccvam.niehs.nih.gov/> [accessed 01 November 2006].

ICCVAM. 2001b. Guidance Document On Using In vitro Data To Estimate In vivo Starting Doses For Acute Toxicity. NIH Publication No. 01-4500. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available:<http://iccvam.niehs.nih.gov/> [accessed 01 November 2006].

ガイドライン

OECD. Guideline for Testing of Chemicals, 425, Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure.

OECD. Guideline for Testing of Chemicals, 420, Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Method.

OECD. Guideline for Testing of Chemicals, 423, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method.

OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19
Guidance Document on The Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation