

1 急性毒性試験代替法の第三者報告書

2

3

4

5

6

7 平成 22 年 5 月 31 日 草案

8

急性毒性試験代替法評価委員会

9

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

18

19

20

21

22	目次	
23	略語.....	2
24	要旨.....	5
25	験法の科学的、規制の上での妥当性	8
26	2. 試験法の妥当性	14
27	3. バリデーションに用いられた物質の分類と妥当性.....	21
28	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
29	5. 試験法のデータと結果の利用性	27
30	6. 試験方法の正確性.....	28
31	7. 試験方法の信頼性.....	32
32	8. 試験方法のデータの質	35
33	9. その他の試験方法の科学的な報告	37
34	10. 3Rs への関与	39
35	11. 試験方法の有用性と限界.....	40
36	12. 結論.....	42
37	13. 参考文献	44
38	補遺.....	46
39		
40		
41		
42		

43	略語	
44	ADME	Absorption, distribution, metabolism, and elimination
45	ANOVA	Analysis of variance
46	ATC	Acute Toxic Class method
47	ATWG	Acute Toxicity Working Group
48	BRD	Background Review Document
49	CNS	Central nervous system
50	CV	Coefficient of variation
51	DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
52	DMSO	Dimethyl sulfoxide
53	D-PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
54	EC ₅₀	Concentration of a substance that produces 50% of the maximum
55		possible response for that substance
56	ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
57	ETOH	Ethanol (Ethyl alcohol)
58	FAL	FRAME Alternatives Laboratory
59	FDP	Fixed Dose Procedure
60	FRAME	Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments
61	GHS	Globally Harmonized System (of Classification and Labeling of Chemicals)
62	GLP	Good Laboratory Practices
63	HBSS	Hanks' balanced salt solution
64	IC ₅₀	Concentration producing 50% inhibition of the endpoint measured

65	ICCVAM	Interagency Coordinating Committee for the Validation of Alternative Methods
66	i.p.	Intraperitoneal
67	i.v.	Intravenous
68	Kow	Octanol-water partition coefficient
69	LD ₅₀	Dose that produces lethality in 50% of test animals
70	MTT	3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide
71	N	Number (of substances)
72	NHK	Normal human epidermal keratinocytes
73	NICEATM	National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative
74		Toxicological Methods
75	NR	Neutral red
76	NRU	Neutral red uptake
77	OD	Optical density
78	OD ₅₄₀	Optical density (absorbance) at a wavelength of 540 nm
79	PBS	Phosphate buffered saline
80	PC	Positive control
81	pH	Power of hydrogen
82	QA	Quality assurance
83	QC	Quality control
84	r	Pearson correlation coefficient
85	R ²	Coefficient of determination
86	r _s	Spearman correlation coefficient

87	RC	Registry of Cytotoxicity
88	RI	Radioisotope
89	RTECS®	Registry of Toxic Effects of Chemical Substances
90	SD	Standard deviation
91	SLS	Sodium lauryl sulfate
92	SMT	Study management team
93	3T3	BALB/c mouse fibroblasts, clone A31 (ATCC # CCL-163)
94	UDP	Up-and-Down Procedure
95	VC	Vehicle control
96	ZEBET	Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz-und
97		Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (German Center for
98		Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal
99		Experiments)
100		
101		
102		
103		
104		
105		
106		
107		
108		

110 **要旨**

111 ICVAM のピアレビューパネルは「*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」を次のように評価した。

113 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。動物愛護
114 の観点から代替法が検討されてきたが、代替法として試みられた *in vitro* 細胞毒性試験には試験
115 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
116 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 *in vitro* 試験または試験
117 バッテリーは存在していない。

118 ZEBET は *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
119 動物の削減する構想を提案した。1998 年及び 2003 年、Dr. Willi Halle は RTECS® から分子量が
120 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
121 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
122 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
123 相関が回帰式 (RC millimole regression) で示された。ECVAM のワークショップにおいて、RC
124 millimole regression を用いて ZEBET が提案した急性毒性試験の初回投与用量を推測する *in vitro*
125 アプローチを再提案し、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
126 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、げ
127 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、げっ歯類の細胞株を用い、Neutral
128 Red Uptake (NRU) 法を用いた細胞毒性試験を一つの代表例として検討した。ICCVAM の提案に
129 応じて、NICEATM および ECVAM は、げっ歯類を使った急性毒性試験法の初回投与量の予測
130 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
131 して、3T3 細胞あるいは NHK 細胞を用いた NRU 法のバリデーション試験を複数の施設で実施し
132 た。

133 Neutral Red 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 細胞形質膜を
134 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
135 生じた場合には、細胞に取り込まれる NR が減少する。この試験は自動化が可能であり、RI を使用
136 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。NRU 試験法で評価可能な物質
137 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
138 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。

139 バリデーション試験を実施し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
140 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
141 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、
142 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
143 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
144 で使用した 72 種類の参照化合物数は十分であると ICCVAM ATWG、ICCVAM、ECVAM は考え
145 た。評価に用いた LD₅₀ 値は、OECD ガイドラインでラットが推奨されていること、ZEBET の RC
146 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
147 試験ではラットが用いられていることからげっ歯類のものが選ばれた。各物質の LD₅₀ 値は RC (LD₅₀
148 値データの大部分は RTECS® [1983/84])を優先とし、その他、RTECS® (2001、2002) Hazardous
149 Substances Data Bank を用いて調査した。

150 GHS 区分の予測性は、3T3 では 31% (21/67)、NHK 細胞では 29% (20/68)となった。

151 バリデーション試験は GLP または GLP の精神で実施された。GLP からの逸脱または不履行の多く
152 は小さなものであり、データの質に影響はなかった。GLP の精神で実施された施設では、データ移
153 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
154 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 GLP 施設で実施
155 された試験と同程度であった。

156 3Rs の寄与について、コンピュータでシミュレーションした結果、UDP 法用いた場合では、IC₅₀ 値か
157 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、
158 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
159 された。ATC 法では、IC₅₀ 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
160 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
161 されることが (Reduction) 示された。低毒性毒性物質の場合 (LD₅₀ 値: >2000 mg/kg 又は >5000
162 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
163 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
164 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。しかし、死亡動物数に
165 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
166 ず、*in vitro* 細胞毒性試験において、死亡動物数の削減及び動物への苦痛やストレスの軽減
167 (Refinement)を明確に示すことは困難と考えられた。

168 バリデーション試験において、培養液への溶解性が低く 50%の細胞毒性発現濃度が得ることがで
169 きない化合物、揮発性が高い化合物は試験の実施が困難であった。また、ライゾゾームへ特異的
170 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、
171 血清タンパクへの結合性が高い物質の評価は困難であることが予測される。 *in vitro* の試験
172 系では ADME(吸収、分布、代謝、排泄)が欠如していることから、代謝によって活性化される化合
173 物の評価には適当ではない。毒性機序として、神経毒性や心毒性を有する化合物の評価は適切
174 ではない。

175 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)
176 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
177 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張を図り、*in vitro* 細胞毒性試験
178 の有用性と限界を特徴づけることが必要と考えられる。

179 JaCVAM 評価委員会としては、NRU 法の導入に際し、以下のように結論する。

180 72 種類の化合物から得られた IC₅₀ 値と LD₅₀ 値の相関が認められ、低毒性の化合物については予
181 測性があり、動物数の削減できる可能性が示されている。しかしながら、GHS 区分において強毒性
182 に分類される化合物の予測性は低く、予測される初回投与量は真の LD₅₀ 値からかけ離れた高用
183 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
184 難い。揮発性、溶解度が低い物質は試験の実施が困難である。急性毒性試験の実施に際して、
185 一律に NRU 法を実施し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
186 合物の情報などと並んで、初回投与量決定の一助として位置付けることが望ましい。

187

188

189

190

191

192

193

195 **験法の科学的、規制の上での妥当性**

196 **1.1 背景**

197 化学物質の急性毒性試験はげっ歯類を使用して実施されているが、動物愛護の観点から、急性
198 毒性試験の代替法が検討されてきた。

199 1983 年にはスカンジナビアの Society for Cell Toxicology は The Multicentre Evaluation of *in vitro*
200 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
201 度とを比較検討した。

202 1992-1993 年には、The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (FRAME)が
203 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
204 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
205 (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
206 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
207 BALB/c 3T3)、暴露時間 (24-72h) 及びエンドポイント (MTT または NRU) によって評価が大きな差
208 異が認められないことが示された。

209 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
210 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
211 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
212 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
213 regression) で示された。

$$214 \mathbf{\log LD_{50} (mmol/kg) = 0.435 \times \log IC_{50} (mM) + 0.625}$$

215 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。

216 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
217 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
218 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
219 性毒性ガイドライン (420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure、423: Acute Oral toxicity –
220 Acute Toxic Class Method、425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure) のドラフトが提案
221 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 段階の用量から初回投与量
222 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流

223 れ図で化合物のハザードを分類す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
224 が使用動物数の削減の鍵となる。

225 1999年、The German Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal
226 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
227 回投与量を定めることにより、UDP 法(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
228 ることを示した。

229 2000年、NIEHS、NTP 及び EPA は協力して International Workshop on *in vitro* Methods for
230 Assessing Acute Systemic Toxicity (Workshop 2000)を主催した。このワークショップでは、①
231 ZEBET 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、②
232 ECVAMから提案された試験方法の構想、③他の急性毒性試験に用いる動物数削減を目的とした
233 *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
234 られた *in vitro* 細胞毒性試験では、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
235 切に評価された試験方法はなく、したがって急性毒性試験の代替法として規制当局が受け入れ可
236 能な信頼性、妥当性、有用性及び適応範囲を評価した *in vitro* 試験または試験バッテリーは存在
237 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
238 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
239 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
240 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
241 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
242 用い NRU 法を一つの代表例として検討した。

243 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、
244 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
245 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
246 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。

247

248

249

250

251 バリデーション試験は、以下のように4段階で実施された。

252 **Phase Ia: Laboratory Evaluation**

253 Development of a positive control database for each laboratory

254

255 **Phase Ib: Laboratory Evaluation**

256 Limited substance testing to demonstrate the reliability of the protocol

257

258 **Phase II: Laboratory Qualification**

259 Evaluation of protocol refinements

260

261 **Phase III: Laboratory Testing Phase**

262 Test of optimized protocols

263 **1.2 規制上の妥当性**

264 現在、各極における急性毒性試験による化合物分類を、Table 1に記載した。BRDに記載されてい
265 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
266 において、*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
267 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
268 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
269 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
270 投与量も試験計画の時点で得られている情報を元にするが、情報が入手できない場合には 300
271 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
272 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。

273 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
274 試験は利用されていると考えられる。

275

276

277

278

279

280

281 経口投与急性毒性試験による化合物の分類 (BRD より抜粋)

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.

282

283 1.3 科学的妥当性

284 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 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
285 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
286 は Borenfreund and Puerner (1985) が最初に報告された試験である。細胞毒性をエンドポイントとした
287 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
288 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
289 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
290 予測する RC millimole regression が既に得られている。加えて、この試験は自動化が可能であり、
291 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。NRU 試験法で評価可
292 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
293 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。

295 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
296 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

297 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
298 (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
299 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
300 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
301 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
302 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
303 ていると考えられる。

304 *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
305 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
306 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
307 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。

308 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
309 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
310 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
311 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
312 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
313 内の細胞よりも被験物質に長時間暴露される。

314 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、NRU 法での評価は適当ではな
315 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
316 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
317 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
318 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
319 心臓に特異的な毒性を発現する物質については、3T3 細胞あるは NHK 細胞を用いた NRU 試験
320 では過小評価されることが考えられる。

321 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、ライソゾームへ特異的な影響
322 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
323 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、
324 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
325 地は血清を含まないため、この懸念はない)。

326 **1.4 JaCVAM 評価委員会からの意見**

- 327 (1) NRU 法は、72 種類の化合物から得られた IC₅₀ 値と LD₅₀ 値の相関性を根拠として一
328 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
329 る。相関性は必ずしも因果関係を説明するものではない。
- 330 (2) 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の予測性は期待でき
331 ないため、このような化合物の評価に NRU 法は適当ではない。
- 332 (3) 暴露の条件が著しく異なる場合、例えば代謝されることによって毒性を発現する場合
333 には正しい評価はできない。
- 334 (4) 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)は
335 本実験を適用することが困難であるため、除外すべきである。
- 336 (5) 腐食性を有する化合物については、急性毒性試験を実施する必要がないことが
337 OECD 急性毒性ガイドラインに明記されており(423 ATC 法、425 UDP 法)¹、これには
338 *in vitro* の腐食性試験(430 TER、431 Human skin model test)の結果を利用している
339 と考えられる。初回投与量の決定とは目的が異なるが、試験実施の可否を判定するう
340 えでは、*in vitro* 試験の結果は利用されている。

341

342

343

344

345

346

347

¹ OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS 423 Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method

5. INITIAL CONSIDERATIONS; Test substances, at doses that are known to cause marked pain and distress due to corrosive or severely irritant actions, need not be administered.

349 2. 試験法の妥当性

350 2.1 試験方法の概要

351 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
352 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
353 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
354 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
355 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
356 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。

357 2.2 試験方法

358 2.2.1 細胞の種類と培養液

359 1)3T3 細胞(BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞)

360 培養液:10%新生児ウシ血清(非働化せず)含有 DMEM 培地

361 2)NHK 細胞(ヒト正常表皮角化細胞)

362 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
363 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
364 シウム、30 μg/mL ウシ下垂体抽出物含有)

365 3T3 細胞は NHK 細胞よりも実験結果の再現性は劣るが、わずかながら動物数を NHK 細胞より削
366 減することができ、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。

367 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
368 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
369 されている。以下のように、ICCVAM のレポートでは、2つの細胞を培養に必要な試薬代が記載さ
370 れている。

371 3T3 細胞:細胞(\$200)+培地 500 mL(\$20); 約\$220

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

373

374

375 2.2.2 溶解性試験

376 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
377 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
378 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。

379 攪拌方法は、以下のように実施する。

380 (1) 1-2 分、室温でゆっくりボルテックスをかける。

381 (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。

382 (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
383 間加温する。

384 1) 溶解性試験の手順

385 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。

386 (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
387 200 mg/mL に調製する。溶解しない場合は段階 2 を実施する。

388 (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
389 mg/mL に調製する。溶解しない場合は段階 3 を実施する。

390 (3) 段階 3: 段階 2 の被験物質溶液に、さらに 4.5mL の培養液を添加して全体を 5 mL と
391 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
392 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。
393 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
394 100 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
395 合は段階 4 を実施する。

396 (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
397 階 3 で溶解しなかった培養液 (2 mg/mL)、DMSO (200 mg/mL) 及び ETOH (200
398 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
399 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
400 5 を実施する。

401 (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
402 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。

403 (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
404 ETOH を添加して 0.2 mg/mL の溶液を調製する。

405 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。

406 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。

407 2) 被験物質溶液の希釈

408 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
409 た場合は、培養液中の有機溶媒含量は 0.5%以下とする。

410 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
411 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。
412 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 10mg/mL、有機溶媒を
413 使用した場合には 1 mg/mL である。

414 本試験では、用量設定試験より希釈率を小さくする。

415 2 段階希釈…希釈率 3.16 3 段階希釈…希釈率 2.15 4 段階希釈…希釈率 1.78

416 6 段階希釈…希釈率 $1.47(\sqrt[6]{10})$ 12 段階希釈…希釈率 $1.21(\sqrt[12]{10})$

417 バリデーション試験において、用量設定試験の上限濃度で毒性が出なかった場合、培養液で溶解
418 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
419 濃度として再度用量設定試験を実施した。

420 2.2.3 用量設定試験及び本試験

421 1) 陽性対照物質 (PC)

422 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
423 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。

424 2) 陰性対照物質 (VC)

425 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
426 を添加する。

427

428 3) 細胞の播種および前培養

429 3T3 細胞は、96-well マイクロプレートに $2-3 \times 10^3$ 個/ $100 \mu\text{L}$ /well 播種後 24 時間培養し、NHK
430 細胞は、 $1.6-2 \times 10^3$ 個/ $125 \mu\text{L}$ /well 播種後 48-72 時間培養する。

431 4) 被験物質の添加

432 規定時間前培養し(3T3 細胞: 24 ± 2 時間、NHK 細胞: 48-72 時間)、プレートを注意深くひっくり
433 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
434 ぐに、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ に温めた培養液を 3T3 細胞には $50 \mu\text{L}$ ずつ、NHK 細胞には $125 \mu\text{L}$ ずつ添加す
435 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 $50 \mu\text{L}$ ずつ、NHK
436 細胞には $125 \mu\text{L}$ ずつ添加する。添加後 48 ± 0.5 時間培養する。1 用量当たりの well 数は $N=6$ と
437 する。

438 5) 測定

439 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
440 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
441 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
442 (D-PBS) で洗浄後、NR 染色液(NR dye; 3T3: $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、NHK: $33 \mu\text{g}/\text{mL}$)を $250 \mu\text{L}$ 添加し
443 て 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で 3 時間培養する。染色液を除去して D-PBS で洗浄後 $100 \mu\text{L}$ の NR 抽出液を
444 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。振盪後、プレートは少なくとも 5
445 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。プレートリーダーで
446 $540 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$ ($\text{OD}_{540\text{nm}}$) の吸光度をする(測定前には泡を取り除く)。

447 6) 試験成立基準

448 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
449 験成立基準を記載する。

- 450 (1) PC として使用する SLS の IC_{50} 値は、各研究室で得られたヒストリカルデータの平均値
451 の 2.5 標準偏差(SD)の範囲に入っていること。
- 452 (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、
453 全ての VC から算出した平均値から 15%以内であること。
- 454 (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
455 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。
- 456 (4) PC の用量相関の R^2 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。

457

458 **7) データ解析**

459 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。

460 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
461 算には表計算ソフト(例:Microsoft EXCEL®)を使って計算してもよい。462 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
463 を行う。464 **8) 初回投与量の決定**465 IC₅₀ 値 (mM) を次の回帰式に代入して logLD₅₀ 値 (mg/kg) を算出する。

466
$$\text{LogLD}_{50}(\text{mmol/kg}) = 0.439 \log\text{IC}_{50}(\text{mM}) + 0.621 \quad (\text{ICCVAM, 2006a})$$

467 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。468 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、
469 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
470 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
471 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
472 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
473 階低い用量を開始用量とする。474 分子量不明の化合物については、 $\mu\text{g/mL}$ で算出した IC₅₀ 値からは、以下の回帰式で LD₅₀ 値
475 (mg/kg) を推測することができる。

476
$$\text{LogLD}_{50}(\text{mg/kg}) = 0.372 \log\text{IC}_{50}(\mu\text{g/mL}) + 2.024 \quad (\text{ICCVAM, 2006a})$$

477 **2.2.4 既知の適用限界**478 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
479 る。480 **1) 溶解性、沈殿物及び揮発性を有する化合物**481 培養液、また有機溶媒を用いても溶解性の低く、50%の細胞毒性発現濃度が得ることができな
482 い化合物は *in vitro* 試験で評価することはできない。

483 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
484 きない。

485 揮発性の化合物では、VC 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
486 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
487 の実施が困難であった。

488 2) 生物動力学測定 (Biokinetic determination)

489 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
490 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*
491 *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。

492 3T3 及び NHK 細胞を使用した NRU 試験は Biokinetics を考慮していない。

493 3) 臓器特異的毒性

494 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
495 特異的な毒性を評価することはできない。

496 2.3 JaCVAM 評価委員会からの意見

497 (1) Balb/c 3T3 細胞および NHK 細胞が推奨されているが、この2つの細胞が選択された
498 経緯・理由を記載すべきである。

499 (2) 用量設定試験で全く毒性が出ない場合や用量設定試験の希釈率を大きく (公比 3 程
500 度) することで、1 回の試験で適切な IC₅₀ 値を求めることができるケースも多いはずで
501 ある。このような場合は、本試験を実施する必要はないと考える。また、用量設定試験
502 や本試験の用量についても希釈率を規定することはなく、ある程度自由度を持たす
503 べきである。

504 (3) 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、含量分析が必
505 要な場合、培養液では分析困難な場合があるので、水や生理食塩液の使用も可能と
506 すべきである。

507 (4) DMSO や ETOH に溶解している被験物質が、培養液中で析出した場合の IC₅₀ 値の
508 取扱いについて詳細に説明すべきである。

509 (5) 被験物質によっては、ガラス製試験管に吸着する場合もあるため、使用可能な試験
510 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。

- 511 (6) 被験物質添加の際に、先に細胞へ培養培地を添加し次に 2 倍濃度の被験物質溶液
512 の添加となっているが、1 倍濃度の被験物質溶液調製液の直接添加も認めるべきで
513 ある。
- 514 (7) NRU 法の特長から標準物質を 5-10 物質程度規定しておき、その IC_{50} 値が所定の
515 範囲にはいる試験系であることを確認してから試験を行う必要がある。これを満たす
516 範囲において各試験施設での試験系の軽微な変更も可と考える。
- 517 (8) 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プレ
518 ート内で実施することが望ましいと考える。
- 519 (9) 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
520 要があると考えた。N=3-4 で十分な評価が可能と考える。
- 521 (10) 色素抽出後から測定までの時間は 2-3 時間後でも問題ないとする。抽出時のプレ
522 ート振盪時間についても各施設で規定すべき問題と考えるので、各処理における時
523 間の規定は自由度をもたせるべきである。
- 524 (11) NRU よりも MTT などミトコンドリア呼吸パラメータの方が、検出範囲が広いと考える。
525 他の細胞毒性検出方法の使用についても詳細にコメントをいただきたい。
- 526 (12) NRU 以外の細胞毒性試験法を使用する場合に必要な正確さと信頼性を保証するバ
527 リテーション試験はどの程度まで実施することを想定しているか？
- 528 (13) 3T3 細胞とNHK 細胞では、陽性対照 SLS での IC_{50} 値に 10 倍以上の差が認められる
529 にもかかわらず、 LD_{50} 値を求める相関式が同じでよいのか？また、このような差が認
530 められる 2 種の細胞を同時に推奨する妥当性はあるのか。
- 531 (14) LD_{50} 値の算出に使用するソフトウェアが共通ではない場合には計算結果が異なる事
532 が想定されるため、ソフトウェアの開発が望まれる。プレート内のサンプルの位置を任
533 意に変えることができ、プレートのデータをそのままコピー/ペーストして LD_{50} 値が計
534 算できる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する

535

536

537

538

540 3. バリデーションに用いられた物質の分類と妥当性

541 3.1 バリデーション試験に選択された 72 種類の化合物の論理的根拠

542 バリデーショ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)。

543

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

544 *試験には一水和物を用いた。

545 **試験には塩酸塩を用いた。

546 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
547 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
548 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
549 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
550 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
551 合物数は十分な数であると ICCVAM ATWG、ICCVAM、ECVAM は考えた。

552 評価に用いた LD₅₀ 値は、OECD ガイドラインでラットが推奨されていること RC millimole regression
553 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
554 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®
555 [1983/84])を優先とし、その他、RTECS® (2001、2002) Hazardous Substances Data Bank を用いて
556 調査した。選択した 72 種類の物質は RC を初めとし、各種のデータベースに登録されており、1 物
557 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。

558 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
559 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。

560 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、ブ
561 ラッド・ブレインバリアー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
562 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

563 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
564 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
565 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
566 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
567 まれていた。製品の種類、使用方法としては医薬品 27 物質、農薬 17 物質で他に溶媒、食品添加物、
568 殺菌剤/消毒剤などが含まれていた。

569 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
570 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
571 は全くないことが報告されている。

572 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
573 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;
574 Lithium I carbonate、Methanol、NHK;1,1,1-Trichloroethane、両細胞共通;Carbon tetrachloride、
575 Xylene)。

576 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。

577 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、
578 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
579 剤や家庭用品の評価が必要であるとした。

580 総じて、*in vivo* の急性経口毒性で作用のモードや機序がはっきりしていないことから、*in vitro* のバ
581 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
582 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
583 ると考えた。

584 3.2 JaCVAM 評価委員会からの意見

585 (1) 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
586 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
587 十分な記載がされていると考える。

588 (2) 被験物質数やある特性を持った被験物質名称について文中、表中および Appendix
589 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
590 判断した。

- 591 (3) 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試験されて
592 おらず、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データが得られて
593 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
594 判断はできない。
- 595 (4) 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
596 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
597 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
598 と考えられる。
- 599 (5) 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
600 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
601 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
602 であると判断した。
- 603 (6) 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が、RC millimole
604 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
605 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
606 いないことは大きな問題とはならないと考える。しかしながら代謝活性化により活性化
607 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、別途考察が必要と考
608 える。
- 609 (7) 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
610 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
611 本法が有効であるかについては、評価ができない。なお、化粧品業界は、初回投与
612 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。

613

614

615

616

617

618

620 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 621 タ

622 4.1 評価に使用したげっ歯類急性経口毒性試験における LD₅₀ 値の精度と信頼度

623 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
624 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
625 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
626 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
627 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
628 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。

629 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
630 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
631 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
632 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、
633 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。

634 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
635 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
636 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
637 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
638 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
639 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考え
640 られた。

641 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、
642 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
643 関を示した。

644 4.2 JaCVAM 評価委員会からの意見

- 645 (1) 当評価委員会はデータの取舍選択については十分な記載がされていると判断した。
646 (2) 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
647 はないと判断した。

- 648 (3) 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
649 性に関する記載は認められず、結果への影響が判断できなかった。
- 650 (4) ばらつきは全体的には LD₅₀ 値が 50 mg/kg を境にして低濃度の場合、比が大きい傾
651 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、
652 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かった。
- 653 (5) 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
654 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
655 られなかった。
- 656 (6) 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
657 LD₅₀ 値はその化合物が分類される GHS 区分に含まれていたが、うち複数物質におい
658 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
659 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はない。GHS 区分のボー
660 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考える。
- 661 (7) 全体として、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
662 能であると判断した。

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674 5. 試験法のデータと結果の利用性

675 5.1 実施施設と実施期間

676 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.
677 Army Edgewood Chemical Biological Center (ECBC)、Fund for the Replacement of Animals in
678 Medical Experiments Alternatives Laboratory (FAL)、Institute for in vitro Sciences (IIVS)の 4 つの
679 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
680 い、細胞毒性試験は ECBC、FAL 及び IIVS で実施した。

681 Bio Reliance、ECBC および IIVS は技術的な面の解決部分を除き GLP に従い実施した。FAL では
682 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。
683 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
684 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。

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

687 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} 値に差がある。陽性対照の SLS
688 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
689 0.1-10 の間にある事を示している。

690 5.2 JaCVAM 評価委員会からの意見

691 (1) 各化合物間では 10 倍以内の差であるが、2 つの細胞系全体として考えた場合一定
692 傾向を持つ差ではないことから、100 倍のばらつきがあると判断される。

693 (2) 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}
694 値から相関式を用いるが、このようなばらつきの中でも 2 つの細胞系を同様に使用で
695 きることの考察が不足していると考ええる。

696 (3) Aminopterin、hexachlorophene および digoxin では両細胞での IC_{50} 値に 100 倍を超
697 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
698 ムなどについて考察が必要であると考ええる。

699 (4) 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延
700 べられている事から、陽性対照 SLS の差については、施設間の手技の均一性につい
701 ても考察する必要があると考ええる。

702

703 6. 試験方法の正確性

704 6.1 3T3 及び NHK NRU 法のげっ歯類 LD₅₀ 値の予測性

705 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
706 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
707 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
708 低い用量を用いるとしているため、真の LD₅₀ 値に近い予測されると、試験に使用する動物の苦痛
709 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、強毒性側にバイアスが
710 かかる)。

711 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
712 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
713 と考える。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
714 来るとしていることも妥当であると考ええる。

715 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
716 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
717 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
718 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なもの
719 考えた (BRD Table 6-2)。

720 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
721 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
722 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
723 レンジがもっとも良好であった。一方、毒性の高い化合物、あるいは非常に毒性の弱い化合物の
724 予測性がよくなかった。

725 6.2 はずれ値を示した化合物について

726 はずれ値を示した化学品について、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
727 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
728 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学品において 8/22 (3T3)、
729 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。

730 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
731 合物ではずれ値が認められた。

732

733 はずれ値を示した化合物のまとめ (BRD より抜粋)

734 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
 735 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 (+)	
	<i>Arsenic III trioxide (-)</i>	<i>Arsenic III trioxide (-)</i>
		<i>Aminopterin (-)</i>
5-Aminosalicylic acid (+)		5-Aminosalicylic acid (+)
Busulfan (-)	Busulfan (-)	Busulfan (-)
Caffeine (-)		Caffeine (-)
Cycloheximide (-)	Cycloheximide (-)	Cycloheximide (-)
Dibutyl phthalate (+)	<i>Dibutyl phthalate (+)</i>	<i>Dibutyl phthalate (+)</i>
	<i>Diethyl phthalate (+)</i>	<i>Diethyl phthalate (+)</i>
Digoxin (-)	<i>Digoxin (-)</i>	
Disulfoton (-)	<i>Disulfoton (-)</i>	<i>Disulfoton (-)</i>
Epinephrine bitartrate (-)	Epinephrine bitartrate (-)	Epinephrine bitartrate (-)
Ethanol (+)	Ethanol (+)	Ethanol (+)
Lindane (-)	<i>Lindane (-)</i>	
Mercury II chloride (-)	Mercury II chloride (-)	Mercury II chloride (-)
		Methanol (+)

736

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>Fenpropathrin (-)</i>	<i>Fenpropathrin (-)</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.

737

738 6.3 JaCVAM 委員会からの意見

739 (1) 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
740 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
741 寄与できないと考える。

742 (2) 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
743 低いことが示されている。しかしながら、心臓及び CNS 以外の毒性メカニズムについ
744 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

745 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
746 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。

747 (3) 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
748 などが調査されリスト化(BRD AppendixL1)されているが、情報はまだ十分整っていな
749 いと考える。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
750 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。
751 現状では単独のパラメータの評価にとどまっている事から、複合的な解析も必要であ
752 ると考える。

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

763

764

765

766

767 7. 試験方法の信頼性

768 7.1 3T3 および NHK NRU 法の信頼性

769 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
770 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
771 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
772 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
773 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 IC_{50} 値を算出した結果
774 を用いた。3T3 NRU 法及び NHK NRU 法における IC_{50} 値データの施設内再現性及び施設間再現
775 性について、分散分析 (ANOVA)、変動係数 (CV) 解析、研究所別 IC_{50} - LD_{50} 回帰の比較及び研
776 究所内平均 IC_{50} 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
777 の再現性は概して NHK NRU 法の方が良好であった。

778 7.2 3T3 および NHK NR 法の信頼性を測定するために用いた物質

779 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
780 広範囲の領域から選択されている。

781 7.3 3T3 および NHK NRU 法の結果における CV の結果

782 施設別 IC_{50} - LD_{50} 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、
783 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
784 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
785 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、
786 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%
787 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
788 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、
789 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。

790 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、物理的性状、
791 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、 IC_{50}
792 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
793 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
794 間平均 CV は、 LD_{50} 値が5 mg/kg 以下の区分で72%、 LD_{50} 値が5 mg/kg 超50 mg/kg 以下の区
795 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
796 CV は、5 mg/kg 以下の区分で37%、 LD_{50} 値が5 mg/kg 超50 mg/kg 以下の区分で41%であり、全

797 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
798 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。
799 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
800 みられたが、NHK NRU 法 (p=0.809) では認められなかった。

801 3T3 NRU 法による陽性対照物質 (SLS) の IC₅₀ 値の ANOVA 解析では、施設間で有意差 (p=0.006)
802 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
803 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
804 小さな値であったが、施設内 CV は 5%から 24%であった。

805 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
806 (p<0.001) であった。Phase Ib 後に FAL では培養法が変更され SLS の IC₅₀ 値が経時的に低下傾
807 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、
808 NHK NRU 法による SLS の IC₅₀ 値の施設内 CV は 11%から 51%であるのに対し、3T3 NRU 法によ
809 る SLS の施設間 CV は Phase III の 8%から Phase I b の 39%であり、3T3 NRU 法に比較して NHK
810 NRU 法はばらつきが大きかった。

811 7.3 溶媒選択

812 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。
813 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。BioReliance は他の 3
814 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
815 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
816 かの参照化合物で IC₅₀ 値を算出することができていなかった。IC₅₀ 値が得られなかった化合物は、
817 その大部分が有機溶媒であった (Lithium I carbonate、Methanol、1,1,1-Trichloroethane、Carbon
818 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
819 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 に準拠した方法で実施し
820 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、
821 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
822 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
823 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
824 方法について、十分にトレーニングを受けるべきである。

825

826 **7.4 JaCVAM 評価委員会の意見**

- 827 (1) 施設間で生じるばらつきの理由について、考察することは有益と考える。FAL におい
828 ては、トレーニングを実施したにもかかわらず他の施設に比べ高い傾向を示す点に
829 ついて更に考察を加えるべきと考えた。
- 830 (2) 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
831 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
832 差が極めて少ない場合や、または有意差が見られないのは、施設間に極めて大きな
833 バラツキがある場合もある。したがって、JaCVAM 評価委員会としては、評価に際しこ
834 の点も十分考慮して評価を行うべきであると考える。
- 835 (3) NHK NRU 法の再現性が良好であった理由については考察を加えるべきであると考え
836 える。
- 837 (4) 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と考える。
838 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
839 ついても十分に協議すべきと思われる。
- 840 (5) 動物試験結果から得られる LD_{50} 値が 4 倍から 14 倍のばらつきを考慮すると IC_{50} 値を
841 正確に測定することは、必要とは思えない。複数の、しかも費用のかかる試験法によ
842 って IC_{50} 値を正確に特定しても、費用の面から非生産的と思われる。*in vitro* 細胞毒
843 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
844 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
845 あるかを議論すべきである。
- 846 (6) 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
847 するまでの必要性はないものと考える。

848

849

850

851

852

853

854 **8. 試験方法のデータの質**855 **8.1 バリデーショナル試験実施施設の GLP 適合性**

856 バリデーショナル試験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
 857 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
 858 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、バリデーショナル試験マ
 859 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、バリデーショナル試験開始以
 860 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
 861 ク、日誌に記録されており、その情報を SMT が確認できた。

862 **8.2 バリデーショナル試験におけるデータの質**

863 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
 864 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
 865 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
 866 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
 867 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
 868 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
 869 同程度であった。

870 試験法のデータの質に関わるデータ(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)	21 (3T3)	33 (3T3)
	23 (NHK)	14 (NHK)	42 (NHK)
予測した GHS 区分が一致した割合 [§] (%)	30 (3T3)	27 (3T3)	25 (3T3)
	31 (NHK)	31 (NHK)	29 (NHK)

871 #: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

872 8.3 JaCVAM 評価委員会からの意見

873 (1) 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
874 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
875 ータの質について問題無いと判断した。

876 (2) 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
877 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
878 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
879 から、データの質について問題無いと判断した。

880 (3) 急性毒性試験における初回投与量の予測を目的とした試験のため、試験成立条件
881 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
882 GLP で実施する必要はないと考える。

883 (4) 試験のデータの質を保証するには、各施設における参照化合物を使用した試験結
884 果が妥当であるかを確認する事が重要である。

885

886

887

888

889

890

891

893 9. その他の試験方法の科学的な報告

894 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
895 いる。

896 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
897 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
898 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
899 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
900 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
901 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。

902 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
903 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
904 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*
905 *vitro* 3T3 NRU 光毒性試験として採択されている。

906 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
907 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
908 性試験の投与開始用量が、真の 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
909 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
910 対し、UDP 法のコンピューターシュミ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～
911 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
912 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。

913 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
914 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、コンピューターシュミレーショ
915 ンモデルで測定した場合、4.8～10.2%であった。

916 JaCVAM 委員会からの意見

917 (1) NRU 試験の再現性について、光毒性のバリデーション研究をはじめ様々な検討が過
918 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推察
919 した。

920 (2) 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
921 の、相関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
922 減を図る利用方法は妥当なものと判断した。

923 (3) 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
924 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。

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939

940

941

942

943 **10. 3Rs への関与**

944 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
945 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
946 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
947 (Refinement)に繋がる可能性は考えられる。

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

- 950 1) UDP 法では、NRU 法の IC₅₀ 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
951 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%)
952 の動物数しか削減されないこと(Reduction)が示された。
- 953 2) ATC 法では、NRU 法の IC₅₀ 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
954 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
955 (10.2%)の動物が削減されることが(Reduction)示された。
- 956 3) 低毒性毒性物質の場合(LD₅₀ 値:>2000 mg/kg 又は>5000 mg/kg)、それぞれ UDP 法で
957 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
958 (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
959 較的多数の使用動物の削減(Reduction)が期待できると判断した。
- 960 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
961 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
962 苦痛やストレスの軽減(Refinement)を明確に示すことは困難と考えられた。

963 **JaCVAM 評価委員会からの意見**

964 (1) NRU 法は、Replacement を意図していないため、この点については評価されなかつ
965 た。

966 (2) 一定の基準を設けたシミュレーションにより Reduction について検証した結果、低毒性
967 物質の場合では *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
968 減が期待できると考えられる。

969 (3) 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
970 に示すことは困難と判断した。強毒性の化合物では、予測性が低く初回投与量が真
971 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
972 能性がある。

973 11. 試験方法の有用性と限界

974 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
975 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
976 試験として有用と考えられる。

977 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
978 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考
979 えられる。

980 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
981 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
982 いる。

983 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
984 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。

985 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
986 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、
987 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
988 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
989 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
990 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
991 あろう。

992 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
993 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
994 いられるべきである。

995 JaCVAM 委員会からの意見

- 996 (1) 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、計算過程が
997 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
998 ついては判断できない。
- 999 (2) NRU 法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
1000 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と考
1001 える。

- 1002 (3) 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
1003 性を評価するには適切ではない。
- 1004 (4) 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*
1005 *vivo* への外挿は困難である。
- 1006
- 1007
- 1008
- 1009
- 1010
- 1011
- 1012
- 1013
- 1014
- 1015
- 1016
- 1017
- 1018
- 1019
- 1020
- 1021
- 1022
- 1023

1024 **12. 結論**

1025 JaCVAM 評価委員会としては、NRU 法の導入に際し、以下のように結論する。

1026 BRD に記載されているように、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となると考えられ、必要に応じて活用可能である。

1030 NRU 法は、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。1035 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1040 言い難い。

1041 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。

1046 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と思われる。

1049 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

1053 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
1054 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。

1055 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、
1056 GLP 適用の試験を実施する必要性はないものとする。

1057

1058

1059

1060

1061

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068

1069

1070

1071

1072

1073

1074

1075 **13. 参考文献**

- 1076 BACKGROUND REVIEW DOCUMENT, in vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute
1077 Oral Systemic Toxicity, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative
1078 Methods (ICCVAM), National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of
1079 Alternative Toxicological Methods (NICEATM), National Institute of Environmental Health
1080 Sciences, National Institutes of Health, U. S. Public Health Service, Department of Health and
1081 Human Services, NIH Publication No: 07-4518
- 1082 Borenfreund E, Puerner JA. 1985. Toxicity determination in vitro by morphological alterations and
1083 neutral red absorption. *Toxicol Lett* 24:119-124.
- 1084 Clemedson C, Barile FA, Ekwall Ba, Gon. *Toxicol Lett* 24:119-124. K, et al. 1998a. MEIC
1085 evaluation of acute systemic toxicity. Part III. In vitro results from 16 additional methods used to
1086 test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. *Altern Lab Anim* 26
1087 (suppl 1):93-129.
- 1088 Clemedson C, Andersson M, Aoki Y, Barile FA, Bassi AM, Calleja MC, et al. 1998b. MEIC
1089 evaluation of acute systemic toxicity. Part IV. In vitro results from 67 toxicity assays used to test
1090 reference chemicals 31-50 and a comparative cytotoxicity analysis. *Altern Lab Anim* 26 (suppl
1091 1):131-183.
- 1092 Ekwall B. 1983. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Ann New York Acad Sci*
1093 407:64-77.
- 1094 Halle W. 1998. Toxizitätsprüfungen in Zellkulturen für eine Vorhersage der akuten Toxizität (LD₅₀)
1095 zur Einsparung von Tierversuchen. *Life Sciences/Lebenswissenschaften*, Volume 1, Jülich:
1096 Forschungszentrum Jülich.
- 1097 Halle W. 2003. The Registry of Cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute
1098 toxicity (LD₅₀) and to reduce testing in animals. *Altern Lab Anim* 31:89-198. (English translation of
1099 Halle 1998)
- 1100 ICCVAM. 2001a. Report Of The International Workshop On In vitro Methods For Assessing Acute
1101 Systemic Toxicity. NIH Publication No. 01-4499. Research Triangle Park, NC:National Institute

1102 for Environmental Health Sciences. Available: <http://iccvam.niehs.nih.gov/> [accessed 01
1103 November 2006].

1104 ICCVAM. 2001b. Guidance Document On Using In vitro Data To Estimate In vivo Starting Doses
1105 For Acute Toxicity. NIH Publication No. 01-4500. Research Triangle Park, NC: National Institute
1106 for Environmental Health Sciences. Available:<http://iccvam.niehs.nih.gov/> [accessed 01
1107 November 2006].

1108

1109 ガイドライン

1110 OECD. Guideline for Testing of Chemicals, 425, Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure.

1111 OECD. Guideline for Testing of Chemicals, 420, Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Method.

1112 OECD. Guideline for Testing of Chemicals, 423, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class
1113 Method.

1114 OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 19
1115 Guidance Document on The Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane
1116 Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation

1117

1118

1119

1120

1121

1122

1123

1124

1125

1126 **補遺**

1127 以下に当委員会で議論された事のなかで、少数の意見、試験実施の経験を基にしているデータ
1128 の裏付けがないなど、本文中に記載することが適当ではない意見を記載した。

1129 (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
1130 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
1131 あるかを議論すべきである。

1132 (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
1133 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。
1134 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
1135 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
1136 きである。

1137 (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。

1138 (4) 本当に動物削減に寄与するのか？

1139 (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
1140 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
1141 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
1142 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
1143 全体での動物数の削減がなされているのではないか。

1144 (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
1145 ことを望む。

1146 (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
1147 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
1148 あれば、外れることが多い試験と考えられる。

1149 (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
1150 関与する場合は考えられる。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
1151 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
1152 要である。

1153

1154