

# 化学物質の安全性評価に利用される インビトロアッセイ (*in vitro* 試験) 法

小島 肇夫

## 昨今の現状

化学物質の安全性評価法として、経済開発協力機構 (OECD: Organization for Economic Co-operation and development) の試験法ガイドライン (TG: test guideline) が著名である。昨今、TGの中においてもインケミコ (*in chemico*) またはインビトロアッセイ法 (*in vitro* 試験法) が汎用されている<sup>1)</sup>。本書ではこれらをインビトロアッセイ法としてまとめて扱わせていただく。OECDで公式に承認されたインビトロアッセイ法のTGの多くは、欧州では化学物質のリスク表示識別などに利用されている。特に昨今では国連化学品の分類および表示に関する世界調和システム (UN GHS: united nations globally harmonized system of classification and labelling of chemicals)<sup>2)</sup>に従って評価されている。TGとして承認されたインビトロアッセイ法のうち、遺伝毒性試験は1980年代から多くの試験法が承認された。2010年代には使用頻度が低い試験法が整理された経緯があり、2016年に多くのTGが改訂版となった。

## インビトロアッセイ法に関する試験法の国際標準化

OECDは2017年現在、23のTGの中で26のインビトロアッセイ法を採択している<sup>1)</sup>。これらの概要を紹介する。

### <腐食性>

- TG 430: インビトロ皮膚腐食性: 経皮電気抵抗 (TER: transcutaneous electrical resistance) 試験 (2015年改訂版採択)

TER試験は、TG 404: 急性皮膚刺激性/腐食性の動物実験を用いない動物実験代替法 (以下、代替法と記す) である。腐食性物質が角質層に吸収された後、拡散し、下層の細胞に障害を及ぼすという現象をもとに、被験物質曝露後のラット摘出皮膚の電気抵抗値を指標に皮膚腐食性を評価している。

- TG 431: インビトロ皮膚腐食性: ヒト表皮モデル (RHE: reconstructed human epidermis) 試験 (2016年改訂版採択)

ヒト表皮モデル試験は、TG 404: 急性皮膚刺激性/

腐食性の代替法である。角質層を有し、3次元的に再構築されたヒト表皮モデルを使用した皮膚腐食性試験法である。この試験法は、腐食性物質が角質層の侵食または角質層に吸収された後、拡散することにより、下層の細胞に到達して細胞毒性を示すという仮説に基づき、被験物質曝露後のMTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) の取り込み量で測定した細胞生存率を指標に皮膚腐食性を評価している。ヒト表皮モデルとしては、EpiSkin<sup>TM</sup>、EpiDerm<sup>TM</sup>、SkinEthics<sup>TM</sup>、epiCS<sup>®</sup>が利用できる。

- TG 435: 皮膚腐食性評価のためのインビトロ膜バリア試験 (2015年改訂版採択)

インビトロ膜バリア試験法は、TG 404: 急性皮膚刺激性/腐食性の代替法である。合成のマクロ分子生物バリアおよび化学物質検知システム (CDS: chemical detection system) からなる。この方法の原理は、皮膚上で作用する腐食の作用機構と同様に、適用された腐食性物質により引き起こされる膜バリア障害を検出するものである。商業的にはCorrositex<sup>®</sup>として利用できる。

### <皮膚刺激性>

- TG 439: インビトロ皮膚刺激性: ヒト表皮モデル (RHE) 試験 (2015年改訂版採択)

ヒト表皮モデル試験法は、TG 404: 急性皮膚刺激性/腐食性の代替法である。ヒト表皮モデルを用いる皮膚刺激性試験として、EpiSkin<sup>TM</sup>、EpiDerm<sup>TM</sup>、SkinEthics<sup>TM</sup>、LabCyte EPI-MODEL<sup>TM</sup>を用いた方法が利用できる。この中で、LabCyte EPI-MODEL<sup>TM</sup>は(株)ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) で開発された日本製のモデルである。正常ヒト由来表皮細胞からなる3次元構築モデルに化学物質を直接曝露し、MTTの取り込み量で測定した細胞毒性を指標に用いて皮膚刺激性を評価する試験法である。これらモデルを用いた皮膚刺激性試験をOECD TG439に記載された条件下で適切に用いれば、化学物質の皮膚刺激性の有無を区別できる。

### <光毒性>

- TG 432: 3T3 NRU光毒性試験 (2004年採択)

3T3 ニュートラルレッド取り込み (NRU: neutral red uptake) 光毒性試験はインビトロ光刺激性のスクリーニング法である。化学物質を曝露したBalb/c3T3細胞に擬似太陽光を照射し、NRUを指標として細胞毒性を評価することにより、化学物質の光毒性を検出できる方法である。

#### <皮膚感作性>

- TG 442C: インケミコ皮膚感作性: ペプチド結合性試験 (DPRA: direct peptide reactivity assay) (2015年採択)

DPRAは、化学物質の皮膚感作性を予測する試験法として、皮膚感作性成立の初期段階の反応であるハプテンとタンパク質の結合性を調べることにより、皮膚感作性の有無を予測する試験法である。高速液体クロマトグラフィーを用いて、結合性を測定する。

- TG442D: インビトロ皮膚感作性: 角化細胞株レポーターアッセイ (2015年採択)

角化細胞株レポーターアッセイは、多くの皮膚感作性物質がARE (antioxidant response element) により制御される遺伝子の発現を誘導することを利用し、この誘導活性について培養細胞を用いてアッセイする試験法である。ケラチノサイト由来HaCaT細胞にARE-Nrf2ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (keratinocyte-based ARE-Nrf2 luciferase reporter gene) を導入した細胞を用いた試験法としてKeratinoSens™が市販されている。

- TG442E: インビトロ皮膚感作性: ヒト細胞株活性化試験 (h-CLAT: human cell line activation test) (2016年採択)

h-CLATは、多くの皮膚感作性物質が樹状細胞を活性化することを利用し、ヒト単球系培養細胞であるTHP-1細胞を用い、活性化に伴い細胞表面上の発現量が変化するCD86とCD54を、FACS (fluorescence activated cell sorting) により測定することにより、皮膚感作性の有無を判定する試験法である。本試験法は花王(株)および(株)資生堂によって開発された試験法であり、日本での広範な普及を期待している。

以上の三つのインビトロアッセイ法が皮膚感作性試験の代替法TGとして採択されている。2017年中には、新たな試験法として、東北大で開発されたIL-8 Lucアッセイやロリアルが開発したU-SENSが採択される見込みである。これらを組み込んだ性能基準試験法ガイドライン (PBTG: performance based test guideline) 442Eとして採択される予定である。

ただし、上記試験法のいずれも単独では皮膚感作性を評価できない。作用機構に基づく有害性発現経路 (AOP: adverse outcome pathway)<sup>3)</sup>をもとに開発され、統合的に化学物質の安全性を評価するアプローチ (IATA: integrated approaches to testing and assessment) の中で<sup>4)</sup>、それぞれの主要因子 (KE: key element) に基づいた試験法を組み合わせ、皮膚感作性が評価されるべきである。

#### <皮膚吸収>

- TG 428: インビトロ皮膚吸収試験 (皮膚透過性試験) (2004年採択)

インビトロ皮膚吸収試験法は、TG 427: インビボ (*in vivo*) 皮膚吸収試験法の代替法である。このTGの目的は、実使用においてヒト全身循環系に入る可能性がある被験物質の質的および/または量的な情報を得ることである。適用条件を満たさないデータに適切な理由がないものは、結果として採用されるべきではない。特に、インビトロアッセイ法では被験物質の物性・溶媒、レセプター液、摘出皮膚の種およびその状態の選択が重要である。拡散セルや被験物質の適用量、適用時間、測定方法などの条件にも注意が必要である。

#### <眼刺激性>

- TG437: i) 眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品、およびii) 眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品を同定するための、ウシ角膜を用いる混濁度および透過性 (BCOP: bovine corneal opacity and permeability) 試験 (2013年改訂版採択)

BCOP試験は、ウシ眼球から採取した角膜を用いて化学物質に曝露された角膜の混濁度および透過性を測定する眼刺激性を評価する試験法である。ウサギを用いたドレイズ眼刺激性試験の代替法として、トップダウン方式におけるUN GHS区分1物質 (重篤な眼の傷害を引き起こす物質) ならびにボトムアップ方式におけるUN GHS区分外物質 (眼刺激性物質として分類されない) の範囲において行政的利用は可能である。

- TG438: i) 眼に対する重篤な損傷性を引き起こす化学品、およびii) 眼刺激性または眼に対する重篤な損傷性に分類する必要のない化学品を同定するための、ニワトリ摘出眼球 (ICE: isolated chicken eye) 試験 (2013年改訂版採択)

ICE試験は、ニワトリから摘出した眼球に被験物質を曝露し、その結果、眼球に生じる角膜の変性を、角膜の腫脹、混濁度およびフルオレセイン染色性の変化としてとらえる。これら3評価項目の変化をそれぞれ個別のスコアに変換して得られる総合評価をもとにド

レイズの眼刺激性を予測する。トップダウン方式におけるUN GHS区分1物質ならびにボトムアップ方式におけるUN GHS区分外物質の範囲において行政的利用は可能である。

- TG460：眼腐食性物質および眼に対する重篤な刺激性物質を同定するためのフルオレセイン漏出試験(2012年採択)

ドレイズ眼刺激性試験法の代替法として、フルオレセイン漏出試験法 (FL: fluorescein leakage) は、単層の細胞層を通過するNa-FL (sodium fluorescein) 量を測ることで、トップダウン方式においてUN GHS区分1物質被験物質による強度の眼刺激性と眼腐食性を代替的に評価するものである。ただし、水溶性物質のみが適用可能であることから、その有用性は限定的である。

- TG491：インビトロ短時間曝露法：STE (short time exposure) 試験 (2015年採択)

ドレイズ眼刺激性試験法の代替法として、ウサギ角膜由来の上皮細胞株 (SIRC細胞) に対する化学物質希釈液を5分間曝露した後、細胞を洗浄し、その後、MTTの取り込み量で測定した細胞毒性を指標に用いて眼刺激性を評価する試験法である。トップダウン方式においてUN GHS区分1を検出する方法、およびボトムアップ方式においてUN GHS区分外を検出する方法である。本試験法は花王 (株) で開発された簡単で安価な試験法であり、細胞毒性試験の代表的な試験法として普及することを期待している。

- TG492：再構築ヒト角膜上皮モデル法 (RhCE: reconstructed human cornea-like epithelium) 試験(2016年採択)

ドレイズ眼刺激性試験法の代替法として、化学物質を直接曝露したヒト角膜様上皮モデル組織に対するMTTの取り込み量で測定した細胞毒性を指標に用いて眼刺激性を評価する試験法である。ボトムアップ方式においてUN GHS区分外を検出する方法である。現在、EpiOcular™というモデルのみが記載されているが、年内にも改訂されるTG492にはSkinEthics™ RhCEというモデルも追加される予定である。

上記の試験法は、UN GHS分類1および/またはUN GHS区分外を分類できるに過ぎない。その適用範囲と適用限界を試験法ごとに確認してから利用されることをお勧めする。

#### <遺伝毒性>

遺伝毒性試験の多くは、1980年代に採択され、30

年近くにわたる試験の使用経験およびデータの解釈を反映して多く一連のTGがここ数年で改訂された。

- TG471：細菌復帰突然変異試験 (1997年採択)

通称エイムス試験と呼ばれる本試験法は、アミノ酸要求性のサルモネラ菌と大腸菌の株を用いて点変異を検出する復帰突然変異試験である。本試験は遺伝毒性活性、特に点変異を誘発する活性を評価する最初のスクリーニングとして一般に使用される。大規模なデータベースによって、この試験で陽性を示した多くの化学物質が他の試験でも変異原性を示すことが分かっている。

- TG473：哺乳類のインビトロ染色体異常試験 (2016年改訂版採択)

インビトロ染色体異常試験は、哺乳類培養細胞で染色体構造異常を引き起こす物質を検出することを目的としている。構造異常には染色体型と染色分体型の2種類がある。構造異常に加え、倍数性 (核内倍加を含む) を検出できる。

- TG476：Hprt遺伝子とxpprt遺伝子を用いる哺乳類細胞のインビトロ遺伝子突然変異試験 (2016年改訂版採択)

哺乳類細胞のインビトロ遺伝子突然変異試験は、化学物質によって誘発される遺伝子突然変異を検出することを目的としている。本試験に用いられる細胞株で、レポーター遺伝子、特に内因性ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) 遺伝子 (げっ歯類細胞ではHprt、ヒト細胞ではHPRTで、本ガイドラインではHprt遺伝子およびHPRT試験と称する) と、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (xanthine phosphoribosyltransferase) 導入遺伝子 (gpt) (XPRT試験と称する) の前進突然変異を測定する。

- TG487：哺乳類細胞を用いたインビトロ小核試験 (2016年改訂版採択)

インビトロ小核試験は、間期細胞の細胞質内における小核の検出を目的とする。小核は、無動原体染色体断片 (セントロメアが欠如していること)、または細胞分裂後期に細胞の極への移動ができない染色体全体から生じる可能性がある。したがって、本試験は、化学物質に曝露中または曝露後に細胞分裂した細胞において、異数性誘発物質と染色体構造異常誘発物質の両方を検出することが可能であるため、インビトロで染色体損傷性を調べるための包括的な基盤となるインビトロアッセイ法である。

- TG490：チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞のインビトロ遺伝子突然変異試験（2016年改訂版採択）

マウスリンフォーマ試験（MLA: mouse lymphoma assay），およびチミジンキナーゼ（TK: thymidine kinase）遺伝子座を用いたヒトリンパ芽球株化細胞（TK6）試験は，もともと1984年に採択されたTG476に含まれていた。TG 490はMLAならびにTK遺伝子座を使用するTK6試験のために作製された。MLAは規制対応目的に広く使用されている細胞株で，レポーター遺伝子，特に内因性チミジンキナーゼ遺伝子（ヒト細胞ではTK，げっ歯類細胞ではTk）の前進突然変異を測定する。

#### <内分泌かく乱スクリーニング>

- TG455：PBTG：エストロゲン受容体恒常発現性転写活性化試験法（ER TA: stably transfected transactivation to detect estrogen receptor agonists and antagonists）（2016年改訂版採択）

本PBTGは，化学物質がヒトエストロゲン受容体（ER: estrogen receptor）に対して活性物質（agonist）あるいは拮抗性物質（antagonist）であることを検出して，エストロゲン活性あるいは拮抗作用を示す内分泌攪乱性の予測に役立つものとして提案された。活性物質がERと結合することによって誘導されるDNA転写活性化をレポーター（luciferase）遺伝子の発現による luciferin の発光を指標として測定する。

本PBTGには，1) VM7Luc ER TA法：VM7Luc4E2細胞を用いた試験法，2) ER STTA法：hER $\alpha$ -HeLa-9903細胞を用いた試験法，3) ER $\alpha$  CALUX法：ER $\alpha$  CALUX細胞を用いた方法が含まれる。特に，ER STTA法は住友化学（株）および一般財団法人化学物質評価研究機構（CERI）で開発された試験法である。VM7Luc ER TA法は米国で開発された試験法ではあるが，国際バリデーションには（株）日吉も参加した。

- TG456:H295Rステロイドジェネシス法(2011年採択)

H295Rステロイドジェネシス法は，ヒトH295Rアデノカルシノーマ細胞株の産生するステロイドジェネシスに関する17 $\beta$ -エストラジオールおよびテストステロンの増加を化学物質の曝露により検出する試験法である。培養液中のホルモン濃度が市販されているホルモン測定キットまたは液体クロマトグラフィーにて測定して評価される。

- TG 458：アンドロゲン受容体恒常発現性転写活性化試験法（AR STTA: stably transfected transactivation to detect androgen receptor agonists and antagonists）

（2016年採択）

AR STTAは，化学物質がAR-EcoScreen<sup>TM</sup>細胞株のヒトアンドロゲン受容体（AR: androgen receptor）に対して活性物質（agonist）あるいは拮抗性物質（antagonist）であることを検出して，アンドロゲン活性あるいは拮抗作用を示す内分泌攪乱性の予測に役立つものとして提案されたものである。活性物質がARと結合することによって誘導されるDNA転写活性化をレポーター（Luciferase）遺伝子の活性化による luciferin の発光を指標として測定するものである。AR STTA法は大塚製薬（株）およびCERIで開発された試験法である。

- TG 493：PBTG：エストロゲン受容体（ER）結合親和性化学物質の検出のための，ヒト組換えエストロゲン受容体（hrER：human recombinant estrogen receptor）インビトロアッセイ法（2016年採択）

本PBTGは，遺伝子の転写を制御する特異的受容体のリガンド結合部位と物質との直接的な相互作用を基にしている。ヒト組換えエストロゲンアルファ受容体（hrER $\alpha$ ）結合試験の重要な要素として，化学物質（競合物質）存在下での放射標識リガンド（<sup>3</sup>H]-17 $\beta$ -エストラジオール）のER結合能を化学物質の濃度を上昇させながら測定する。本試験は，受容体とリガンドの相互作用パラメータを確認しERの特異性を実証するための飽和結合実験と，それに続くERへの結合に関する放射標識リガンドと被験物質との競合作用を確認する競合結合実験との二つの要素で構成されている。本PBTGには，1) 完全長ヒト組換えER $\alpha$ を用いたFW（freyberger-wilson）のインビトロエストロゲン受容体結合試験，および，2) CERIヒト組換えリガンド結合ドメインタンパク質を用いたインビトロエストロゲン受容体結合試験が含まれる。

#### インビトロアッセイ法の特徴と限界

試験法は科学的な根拠に加え，バリデーション研究で高い再現性および予測性が確認され，その過程で偽陰性が少ない適用限界を見極めねばならない。試験法の特徴と適用限界などの以下に示す留意点が明確に示されるべきである。

1. インビトロアッセイ法の多くは，難水溶性，揮発性，酸化還元，着色物質などの評価が妥当にできない場合が多い。それらの適用範囲を十分に把握すべきである。
2. インビトロアッセイ法は有害性の同定に有用であるが，適用濃度や曝露経路などを考慮したインビトロ皮膚透過性試験を除いてリスク評価には利用できない。

たとえば、インビトロ皮膚刺激性試験：ヒト表皮モデル (TG439) は、UN GHS分類 2にあたる刺激性化学物質 (単一物質および混合物) の有害性同定に有用な試験法である。このTGはUN GHS区分外を同定できるが、オプションであるUN GHS分類3 (弱い刺激性物質) を同定できない。皮膚刺激性のリスク評価のためには、TG439という単一試験からの情報のみで評価することは不十分である。

3. インビトロアッセイ法でも有害性の有無を正確に把握できない場合がある。たとえば、前述したインビトロ皮膚感作性試験のTGをそれぞれ用いても、感作性の有無を正確に把握できない。UN GHS分類1にあたる強い感作性をも同定できない場合もあり、組合せについてよく調査して用いるべきである。
4. 化学物質のリスク評価のためには、IATAの中で、AOPを念頭においた証拠の重みづけ (WoE: weight of evidence) と曝露情報をもとにした安全性情報を利用したアプローチが必要である。インビトロアッセイ法の科学的な結果は、基本的に毒性の一面を表しているに過ぎない。成分や化学物質、製品のリスクを予測するためには、現状では曝露に関するトキシコキネティックス、吸入・分布・代謝・排泄 (ADME: absorption, distribution, metabolism, and excretion) の情報を得るためには動物実験が必要となる。その場

合でも動物実験はできる限り、最低限に抑えられるべきである。

### 最後に

安全性評価項目のそれぞれに必要な試験法、たとえば、トキシコキネティックス、反復投与毒性試験、生殖毒性試験、発がん性試験などの系統的な毒性試験においては、ほとんどインビトロアッセイ法が開発されていない<sup>4)</sup>。2017年の時点で、これらの試験法のうち、上述したように、皮膚腐食性、皮膚刺激性、光毒性、皮膚感作性、経皮吸収しかインビトロアッセイ法が開発されていない。トキシコキネティックスでは肺吸収と腎臓と胆汁排出のモデル開発に5-7年、加えて完全なモデルによる置き換えのためには、組合せを考慮した、より長い検討が必要である。反復投与毒性、発がん性、生殖発生毒性のような系統的な毒性指標の評価モデルの置き換えに至っては目途も立っていない。

とはいえ、昨今、反復投与毒性試験や生殖発生毒性試験代替法の開発を目指すEU-ToxRiskというプロジェクトがEUにて進行中である<sup>5)</sup>。一方で、系統的な毒性試験を開発する手始めにAOPの確立が盛んになりつつある。米国の開発した手法ではあるが、昨今ではOECDも積極的に後押ししている。AOPとは、毒性経路を初期の分子的な反応から始まり、細胞レベル、組織レベル

表1. OECD TGとして採択されている日本で開発またはバリデートされたインビトロアッセイ法

分類	試験名	開発者または主なバリデーション参加施設	採択または改訂採択年
皮膚刺激性	<i>In Vitro</i> Reconstructed Human Epidermis (RhE) Test methods, LabCyte EPI-Model: TG439	(株) J-TEC <sup>a</sup>	2015
眼刺激性	Short Time Exposure <i>In Vitro</i> Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage: TG491	花王 (株)	2015
皮膚感作性	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation, h-CLAT: TG442E	(株) 資生堂および花王 (株)	2016
内分泌かく乱スクリーニング	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>In Vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, ER STTA: TG455	CERI <sup>b</sup>	2016
	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>In Vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, VM7Luc ER TA: TG455	(株) 日吉	2016
	Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals: TG458	CERI	2016
	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) <i>In Vitro</i> Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity: TG493	CERI	2016

<sup>a</sup> (株) ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

<sup>b</sup> 一般財団法人 化学物質評価研究機構

で考え、動物実験を経てヒトや環境への影響を毒性作用機構のレベルで把握しようというものである。開発されたAOPからKEまたはバイオマーカーを見つけ、*in silico*やインビトロアッセイ法の開発を促す。それらの試験結果とADMEを合わせ、WoEを網羅したIATA主導のリスク評価を推奨する計画をOECDは示している。これまで、皮膚感作性、腐食性/皮膚刺激性、眼刺激性でIATAが採択されている。

これらの状況下、OECDで採択された26の試験法のうち、表1に示すように、日本で開発またはバリデートされたインビトロアッセイ法は7に及ぶ。今や日本は欧米と並ぶ試験法開発大国である。新たな評価分野における、さらなる日本の関与に期待している。

## 文 献

- 1) OECD Test Guideline (2017) Available at: [http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en\\_2649\\_34377\\_370513\\_68\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en_2649_34377_370513_68_1_1_1_1,00.html) (2017/6/7)
- 2) 国連GHS (2017) Available at: [http://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/int/files/ghs/GHS\\_rev5\\_jp\\_document.pdf](http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/int/files/ghs/GHS_rev5_jp_document.pdf) (2017/6/7)
- 3) OECD Series on Testing and Assessment: Non-Testing Methods (2017), Available at: <http://www.oecd.org/env/ehs/testing/seriesontestingandassessmentadoptedguidanceandreviewdocuments.htm> (2017/6/7)
- 4) Adler, S. *et al.*: *Arch. Toxicol.*, **85**, 367 (2011).
- 5) EU-ToxRisk (2017) Available at: <http://www.eu-toxrisk.eu/> (2017/6/7)