

評価報告書

急性経口毒性を予測するための *in vitro* 細胞毒性試験

急性毒性試験資料編纂委員会

平成 30 年（2018 年）年 12 月 11 日

急性毒性試験資料編纂委員会

委員長	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所
委員	栗原 正明	国際医療福祉大学（元国立医薬品食品研究所）
	笠原 利彦	富士フイルム株式会社
	若栗 忍	一般財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所
	萩野 滋延	株式会社資生堂
	本山 径子	ヤンセンファーマ株式会社
オブザーバー	仲井 俊司	一般社団法人 日本化学工業協会

略語

CLP	Classification, labelling and packaging
CV	Coefficient of variation
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EU	European Union
EU CLP	European Union Classification, Labelling and Packaging
GD	Guidance document
UN GHS	Globally harmonised system of classification and labelling by United Nations
HSL	Health and Safety Laboratory, UK
IC ₅₀	Concentration producing 50% inhibition of the endpoint measured
ICCVAM	International Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
IIVS	The Institute for In Vitro Sciences
JRC	Joint Research Center
LD ₅₀	Dose that produces lethality in 50% of test animals
MW	Molecular weight
NCD	New chemical database
NICEATM	NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods
NR	Neutral red
NRU	Neutral red uptake cytotoxicity assay
NRU EUC	Neutral red uptake cytotoxicity assay for evaluation of unclassified chemicals. 本評価書の対象となった 3T3 NRU により LD ₅₀ が >2,000 mg/kg であることを予測する評価方法
NTP	National Toxicology Program
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
RC	Registry of Cytotoxicity
ROC	Receiver operating characteristic
3T3	Cell line derived from BALB/c mouse fibroblasts
TG	Test Guideline
TTX	Tetrodotoxin

要旨

急性経口投与毒性試験は、動物に化合物を投与したときに発現する有害な影響を質的・量的に明らかにする目的で実施される。毒性発現の究極である「死亡」をエンドポイントとして、投与された動物の半数を致死させる用量（50% Lethal Dose: LD₅₀）は化合物の毒性の強さを共通の指標で示すことができる利便性がある。このため国際的には UN GHS、我が国においては毒物および劇物取締法のもとで、化合物のハザードに応じて取り扱い方法を区別するための規制上の分類と表示のために使用されている。

動物を用いた急性経口毒性試験は、動物使用数を削減するように改良された代替法として、固定用量法（TG420）、急性毒性等級法（TG423）、上げ下げ法（TG425）の3種類が OECD から推奨されているが、生きた動物を用いること、また、動物への激しい苦痛を与える可能性が高いことから、依然として批判の対象となっており、その代替法の確立が望まれている。マウス線維芽細胞由来の細胞株である 3T3 細胞を用いた Neutral Red Uptake cytotoxicity assay（3T3 NRU）は、細胞毒性を評価する方法として広く一般に利用されている。ICCVAM から提案された「*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」は、3T3 NRU を用いて化合物の細胞毒性を評価した *in vitro* 試験の IC₅₀ とデータベースから得られた *in vivo* 試験の LD₅₀ 値の相関関係に注目し、その回帰分析によって得られた関係式から LD₅₀ 値を予測し、*in vivo* 急性毒性を実施する際の初回投与量を決定する試験である。本法は *in vivo* 急性経口毒性試験に要する動物数の削減を目的として OECD ガイダンスドキュメント（OECD GD 129）に記載されている。

Follow-up study on the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay to correctly identify substances not classified for acute oral toxicity under the EU CLP system (LD₅₀ >2,000 mg/kg、以下、本評価書) では既報の ICCVAM の関係式を用い、LD₅₀ 値が >2,000 mg/kg であるか、すなわち EU CLP 区分外（Unclassified、UC）、UN GHS 区分 5 と分類される化合物を識別する方法として ECVAM から提案されたものである。以下、本評価方法を NRU-EUC (Neutral Red Uptake cytotoxicity assay for Evaluation of Unclassified Chemicals) と記載する。

IC₅₀ から LD₅₀ の予測に使用された関係式は2種類あり、LD₅₀ 値と IC₅₀ 値の表記単位はモル濃度あるいは質量濃度が使用されている。

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

$$\log LD_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.439 \times \log IC_{50} (\text{mM}) + 0.621$$

(2) Weight regression model (重量濃度関係式)

$$\log LD_{50} (\text{mg/kg}) = 0.372 \times \log IC_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2.024$$

3T3 NRU の頑健性等の一般的な内容については、本報告書の基盤となった ICCVAM の既報告で確認されており、評価に使用するのに妥当であると判断した。

ECVAM のバリデーション研究の被験物質として、信頼できる *in vivo* データが入手可能であり、かつ、*in vitro* 試験の実施が可能である 56 化合物が選択されている。この選択方法

に妥当性はあるが、LD₅₀ 値が> 2,000 mg/kgであることを示すために必要となる濃度が、一般に *in vitro* 試験の上限とされる 10mM を超えるため適切な評価ができないと考えられる分子量 174 以下の化合物が 27 あり、適切な試験の実施という観点からは課題と考えられた。一方、同じく上限とされている 5 mg/mL とした場合には、適切な評価ができないと考えられる分子量 77 以下は 4 化合物であった。なお、本バリデーション研究のプロトコルでは試験最高濃度は 10 mg/mL と一般的な *in vitro* 試験の最高濃度 (10mM, 5mg/mL) と比較すると高濃度であるが、これにより、ほとんどの化合物で IC₅₀ 値が求められた。また、IC₅₀ 値が 10mg/mL より大きい場合には 10mg/mL とし式(2)に当てはめることにより評価が可能である。結果として、十分な数の化合物を用いて NRU-EUC が評価されていたと考えられた。

NRU-EUC のバリデーションの正確性および信頼性、並びに試験方法のデータの質については、*in vitro* 試験を実施するために適切な物性を有している化合物に対しては、バリデーション研究として十分であると結論した。一方、水に難溶解性である化合物および揮発性を有するなど *in vitro* 試験に適さない物性を有する化合物においては実験結果の再現性は低い。特に、NRU-EUC は LD₅₀ が>2,000mg/kgであることを評価することを目的とした試験であるため、3T3 NRU を高濃度において実施する必要があり被験物質の溶解性に対する考慮は重要である。

NRU-EUC は *in vivo* 急性経口毒性試験の代替 (Replacement) であり、急性経口毒性試験における使用動物数の削減 (Reduction) および死亡動物の削減や動物への苦痛・ストレスの軽減 (Refinement) に貢献できる。工業的に利用される化合物では、その約 87%が LD₅₀> 2,000 mg/kg に分類されているため、細胞毒性のみで判断する本アプローチを実施した場合、動物削減に大きく寄与し、費用対効果が妥当であることが推測される。しかしながら、物性面の制約から 3T3 NRU により適切に評価できる化合物は限定的であり、周辺情報が乏しいハザードが未知の物質に対して 3T3 NRU 試験を適用した場合、判断を誤る可能性がある。一方、市場で既に使用されており急性毒性について確度の高い情報がある化合物と規格が僅かに異なる物質あるいは製剤、既知の化合物と類似性が極めて高い物質についてのみ利用できる可能性がある。具体的には、毒物劇物を含む製剤の除外申請において利用できる可能性がある。劇物からの除外申請においては、原体に関する急性毒性の情報が存在しており、細胞毒性や *in vivo* での毒性が問題とならない溶媒に溶解または懸濁した状態で供される製剤では、本評価法の実施において問題となる溶解性の問題を回避でき、適切に評価できる可能性がある。

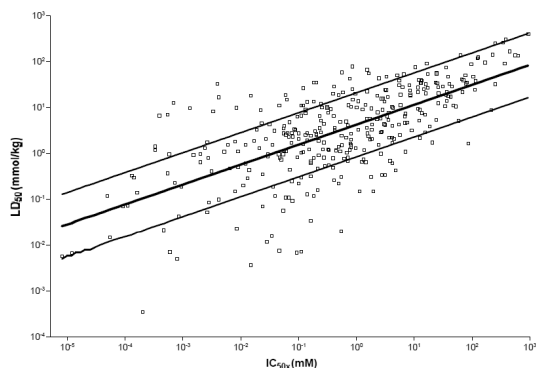
結論として、規制上の利用では新規化合物への適用はその化合物自体や類似物質の情報が十分に無い場合には困難であるが、十分な周辺情報がある化合物や製剤のスクリーニングや更に評価すべき物質をランク付けするために使用することは可能であると判断した。

1. 試験法の科学的、規制の上での妥当性

急性経口毒性試験から求められる LD_{50} は、化合物の危険度に応じて取り扱い方法の区別をするための「分類と表示」に使用されている。現在、 LD_{50} を推定するための OECD のガイドラインとしては固定用量法 (TG420、2001 年)¹⁾、急性毒性等級法 (TG423、2001 年)²⁾、上げ下げ法 (TG425、2006 年)³⁾ が使用されている。これらの TG は被験物質に規制上の限界用量である 2,000 mg/kg (例外的に 5,000 mg/kg) を超える用量でしか毒性を発現しない可能性が高いことを示す情報がある場合には、当該用量を開始用量とする「限度試験」が用いられる。EURL ECVAM Recommendation on the 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay for Acute Oral Toxicity Testing (以下、本評価書) は、これらの代替法として、 $LD_{50} > 2,000$ mg/kg であることを 3T3 細胞を用いた Neutral Red Uptake cytotoxicity assay (以下、3T3 NRU) により判定する方法として ECVAM より提案されたものである⁴⁾。 LD_{50} が 2,000 mg/kg を超える化合物は、UN GHS では区分 5 相当、EU CLP では区分外 (Unclassified、UC) に相当する。以下、本評価方法を NRU-EUC (Neutral red uptake cytotoxicity assay for evaluation of unclassified chemicals) と記載する。

In vitro の IC_{50} 値データから *in vivo* の LD_{50} 値を予測する方法は「*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 (2006)」として ICCVAM のバリデーション研究の結果から OECD で推薦されているが、その予測モデルの基盤となったのは、Helle の報告したげっ歯類の LD_{50} 値と *in vitro* 試験で得られた様々な細胞毒性試験の IC_{50} 値によるデータベース、Registry of Cytotoxicity (RC) である。これらのデータは *in vivo* の LD_{50} 値を mmol/kg として、*in vitro* のデータを mM として回帰式、RC millimole regression (図 1) として示されている。

Figure 1-1 RC Millimole Regression for *In Vitro* Cytotoxicity (IC_{50}) and Rat and Mouse Acute Oral LD_{50} Values for 347 Chemicals



Abbreviations: RC=Registry of Cytotoxicity; IC_{50} =Geometric mean (of multiple endpoints and cell types) test substance concentration that reduces cell viability by 50%; LD_{50} =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 LD_{50} values from cytotoxicity data (Halle 1998, 2003).

図 1 NRU-EUC の基盤となった IC_{50} と LD_{50} の RC millimole regression

Halle W. 2003. The Registry of Cytotoxicity: Toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD_{50}) and to reduce testing in animals. *Altern Lab Anim* 31:89-198. (English translation of Halle 1998)

ICCVAM. BACKGROUND REVIEW DOCUMENT *In Vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity, 2006.

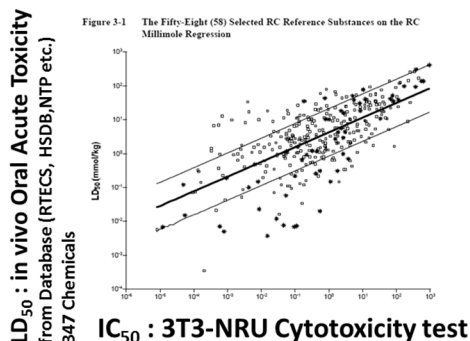
ニュートラル・レッド（NR）は水溶性の弱陽イオン超生体染色色素である。正常な細胞では、NR は細胞形質膜を透過して陰イオン性のライソゾームマトリクスに結合して濃縮されるが、化合物によって細胞毒性が生じた場合には取り込まれる NR が減少する。NR の取り込み量と生細胞数が比例関係にあることを利用して細胞毒性の評価が可能である。

NICEATM/ECVAM のバリデーション研究で 3T3 NRU を選択した理由としては、細胞の入手が容易であること、前出の ICCVAM のバリデーション研究^{5,6)}の報告において再現性が高く適用限界も明らかであること、また、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-EUC は、既報の ICCVAM バリデーション研究を基盤として構築された試験法である。OECD 毒性試験法ガイドラインの *in vivo* 急性経口毒性試験(TG420、TG423、TG425)は、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。既報の ICCVAM バリデーション研究では、*in vivo* 急性経口毒性試験に要する動物数の削減を目的として OECD ガイダンスドキュメント (GD129) に収載されている⁷⁾。具体的には、3T3 NRU により被験物質の IC₅₀ 値 (mM) を求め、RTECS[®]のデータから抽出した 347 種類の参照化合物の LD₅₀ 値 (mmol/kg) と実験によって得られた IC₅₀ 値から構築した回帰式を用いて被験物質の LD₅₀ を予測し *in vivo* 急性毒性試験の初回投与用量を決定する方法である。ICCVAM のバリデーション研究では 72 化合物が用いられている。その結果、被験物質が低毒性の場合は、使用動物数の削減が可能と考えられた。NRU-EUC は ICCVAM のバリデーション研究と同じプロトコールにより LC₅₀ を求め、それから予測される LD₅₀ が 2,000mg/kg を超えるものについては動物実験を実施せずに UN GHS 区分 5 相当、EU CLP では区分外とラベルする方法である。NRU-EUC と ICCVAM のバリデーション研究の比較を図 2 に示した。

既報告：初回投与量の予測

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



Chemical	LD ₅₀ (mmol/kg)	IC ₅₀ (μg/mL)
1	10	1
2	100	10
3	1000	100
4	10000	1000
5	100000	10000
6	1000000	100000
7	10000000	1000000
8	100000000	10000000
9	1000000000	100000000
10	10000000000	1000000000

LD₅₀の予測式 (347化合物のLD₅₀とIC₅₀による回帰式)

- $\log \text{LD}_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.439 \log \text{IC}_{50} (\text{mM}) + 0.621$
- $\log \text{LD}_{50} (\text{mg/kg}) = 0.372 \log \text{IC}_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2.024$
- $\log \text{LD}_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.435 \log \text{IC}_{50} (\text{mM}) + 0.625$

GHS区分に対応した6段階のLD₅₀を予測



予測されたLD₅₀を
初回投与量として
in vivo試験を実施

今回の報告：LD₅₀>2,000 mg/kgを予測

EURL ECVAM RECOMMENDATION on the 3T3 Neutral Red
Uptake (3T3 NRU) Cytotoxicity Assay for the Identification of
Substances not Requiring Classification for Acute Oral Toxicity

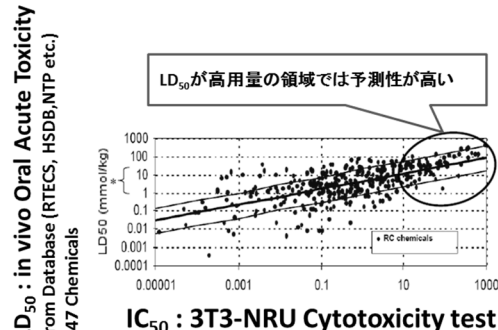


Table 26 Prediction of acute oral toxicity (classified according to the weight percentage in %)

Chemical	LD ₅₀ (mg/kg)	IC ₅₀ (μg/mL)	Total
1	10	1	10
2	100	10	100
3	1000	100	1000
4	10000	1000	10000
5	100000	10000	100000
6	1000000	100000	1000000
7	10000000	1000000	10000000
8	100000000	10000000	100000000
9	1000000000	100000000	1000000000
10	10000000000	1000000000	10000000000

2,000mg/kgを閾値としてLD₅₀予測

LD₅₀>2,000mg/kgと予測された場合は
in vivo試験は実施しない
(in vivo試験の限度試験に相当)

図 2. 3T3 NRU を用いた既報告（急性毒性試験の初回投与量設定）と本報告（LD₅₀>2,000 mg/kgを予測）の比較

3T3 NRU のエンドポイントは細胞死である。Ekwall は、*in vitro* 細胞毒性試験における細胞死は基本的な細胞機能への非特異的な影響の結果 (basal cytotoxicity) であり、化合物による細胞死が誘発される血中濃度域においては、細胞死と同様のメカニズムが *in vivo* でも働くと提唱している⁸⁾。すなわち、いずれの細胞にも共通して存在する構造や機能、例えば細胞膜および細胞骨格の正常性が損なわれ、代謝能及び合成能が阻害され、細胞構成物質の分解や機能の障害、細胞内外イオン濃度の調節及び細胞分裂に障害が生ずると細胞死に至る。細胞死が広範囲に生じると重篤な組織障害を引き起こし、結果として化合物に曝露されていない臓器にも影響し個体死に至る。

一方で、神経や心臓に特異的な毒性を発現する物質、代謝活性化によって毒性発現する物質については、3T3 NRU では評価できない^{5,9)}。神経の受容体やイオンチャンネルに特異的に作用する物質は、細胞毒性を生じることなく個体死を引き起こすことがある。例えば、フグ毒のテトロドトキシン (TTX) やトリカブトに含まれるアコニチンは TTX 感受性ナトリウムチャンネルに作用し、呼吸抑制により個体死を引き起こす。このような化合物では細胞死と個体死のメカニズムは異なり、basal cytotoxicity が発現する濃度域より遥かに低い濃度域において個体死を引き起こす。

3T3 NRU は、細胞培養液と反応せずに溶解する限りすべての物質について実施可能であるが、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。混合物でも評価可能と考えられるが、ECVAM が実施したバリデーション研究では検討されていない。

以上のように、*in vivo* 試験での LD₅₀ 値を推定することを目的とした場合、毒性発現機序および被験物質の物性に起因する制約があるが、3T3 NRU は前記したような意味での *basal cytotoxicity* による細胞毒性を検出する系として、その限界を熟知し、ICCVAM のバリデーション研究とそれを基盤にした ECVAM によるバリデーション研究のプロトコルに厳密に従って利用する限りにおいては、妥当な試験であると判断した。

以下に、3T3 NRU のプロトコルの概要を記載する。

試験方法の概要

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 時間曝露させる。その後、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（公比 10）。本試験では IC₅₀ の推定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、培養液及び Neutral Red (NR) 試薬

細胞：3T3 細胞 (BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞) 細胞培養液：DMEM 培地

被験物質希釈用培養液：4 mM グルタミン、200 IU/mL ペニシリン、
200 µg/mL ストレプトマイシン

NR 希釈用培養液：5 % NBCS/NCS、4 mM グルタミン、100 IU/mL ペニシリン、
100 µg/mL ストレプトマイシン

培養液は 2-8°C で保存し、2 週間以内に使用する。

NR ストック溶液の調製

組織培養グレードの NR ストック溶液 (例：SIGMA #N2889, 3.3 mg/mL) または、NR 粉末 0.25g を 100mL の水に溶解したものを使用する。NR 保存液は室温、暗所で保存し 2 箇月以内に使用する。

NRを含む培養液の調製

NR ストック溶液 0.758 mL (3.3 mg NR dye/mL solution) を予め 37°C に加温した NR 希釈用培養液で 100mL となるように希釈する (終濃度 25 µg NR dye/mL)。NR の結晶を除くため、フィルター (例：ミリポア, 0.2–0.45 µm) でろ過する。NR Medium は細胞へ添加する前に温水

浴槽で37℃に保温し、30分以内に使用する（温水浴槽から取り出してからは15分以内に使用する）。

NR抽出液の組成

- 1 % 氷酢酸
- 50 % エタノール
- 49 % 水

被験物質の溶解性試験

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、37℃のウォーターバスあるいは CO₂ インキュベーターで 50-60 分間加温する。

1) 溶解性試験の手順

- (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 4.5mL の培養液を添加して全体を 5 mL とし 2 mg/mL に調製する。それでも溶解しない場合は 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 でも溶解しない場合は 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) および ETOH (200 mg/mL) の被験物質溶液にそれぞれの溶媒を添加して 10 倍希釈して、培養液では 0.2 mg/mL、DMSO および ETOH では 20 mg/mL に調製する。それでも溶解しない場合は、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) および 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。

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。

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する。細胞毒性が二相性に発現する場合には、細胞毒性が強く発現する領域（傾きが大きい領域）を選択する。

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 用量で濃度反応を確認する。多数の被験物質の試験を実施する際には、陽性対照物質のプレートは単独で実施する。

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 時間培養する。

4) 被験物質の添加

規定時間前培養後 (24 時間)、培養液を除去する。すぐに、37°C に温めた新鮮な培養液をそれぞれのウェルに 50 μ L 添加し、その後 2 倍濃度の被験物質が入った培養液を 50 μ L 添加する。添加後 48 時間培養する。1 用量当たりの well 数は 6 とする。

5) NR 取り込み量の測定

被験物質の曝露終了後、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、細胞の播種エラーの有無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) を 250 μ L 添加して 37°C、5% CO₂ で 3 時間培養する。NR 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。振盪後、プレートは少なくとも 5 分間放置する。吸光

度の測定は、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、プレートリーダーの波長は 540 nm に設定する。泡を取り (OD_{540nm}) の吸光度をする。

6) 試験成立基準

- (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 100%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で 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。

2. 試験法の妥当性

3T3 NRU は化合物の細胞毒性試験方法として広く使用されており、ICCVAM が提案した「*in vitro* 細胞毒性試験による急性経口毒性試験の初回投与量設定試験」^{5,6)}において IC_{50} から LD_{50} を予測することに利用できることが検証された試験系である。ICCVAM のバリデーション研究において試験プロトコルが整備されており、その妥当性について検証されていることから 3T3 NRU は一般的な試験法としては妥当性がある。

ICCVAM のバリデーション研究において、3T3 NRU によって得られた IC_{50} から LD_{50} を予測する手法は、低毒性の化合物では LD_{50} の予測性が高いことが示されている。NRU-EUC は ICCVAM のバリデーション研究を基盤とし、予測性が高い低毒性の化合物 ($LD_{50} > 2,000$ mg/kg) に限定して評価することを目的とした手法であることから妥当性があると判断した。

3. ECVAM のバリデーション(2011)に用いられた物質の分類と妥当性

LD₅₀>2,000mg/kg を予測する ECVAM のバリデーション研究の被験物質として 56 種類の参照化合物が選択されている。基本的には、信頼できる *in vivo* データが入手可能であり、かつ、*in vitro* 試験の実施が可能である化合物が選択されている。

被験物質は、1) ORATS (Online European Risk Assessment Tracking System) database、2) Registry of Cytotoxicity(RC)、3) Annex I of Directive 67/548/EEC の 3 つのソースから選択されている。ただし、ICCVAM の「*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 (2006)」バリデーション研究⁵⁾において NICEATM/ECVAM が使用した被験物質、ACuteTox¹⁰⁾で使用した被験物質、医薬品と農薬は除外されている。例外として Annex I of Directive 67/548/EEC で very toxic に分類される Aconitine と Brucine はバリデーションに使用した被験物質に含まれている。

LD₅₀>2,000mg/kg と評価されている化合物の選択においては、ORATSとRCからは、最初に 691 の化合物をプールし、SIGMA 社から入手不可の化合物、引火性の化合物、Annex I of Directive 67/548/EEC と Registry of Cytotoxicity⁹⁾ で急性毒性区分が異なる化合物を除いたうえで、ラット経口LD₅₀>2,000 mg/kgである一般工業化合物が選択されている。最終的に26化合物(液体;13化合物、固体;13化合物)が選択され、そのうち19化合物はCosIng (the European Commission database for information on cosmetic substances and ingredients)に含まれている物質である。

LD₅₀≤2,000mg/kg と評価されている化合物の選択においては、Annex I of Directive 67/548/EEC からは、最初に 1,020 化合物 (harmful ; 531、toxic ; 339、very toxic ; 150) をプールし、段階的選抜により最終的に 30 化合物 (液体 ; 11 化合物、固体 ; 19 化合物) が選択された。そのうち 8 化合物は CosIng に含まれている物質である。選択された化合物の Annex I of Directive 67/548/EEC 区分の内訳は、harmful ; 22、toxic ; 6、very toxic ; 2 である (表 1)

バリデーションに用いられた 56 化合物の物性情報、*in vivo* データ (LD₅₀) 及び規制上の分類について表 2 にまとめた。*in vitro* 試験の被験物質については、物性面での制約が大きく、一般に揮発性が高い物質、水への溶解度が低い物質は適切な評価ができない。この点から、バリデーションに用いられた化合物の妥当性を考察した。

培養液中の溶解度に関しては、16 の化合物において沈殿が認められた (表 3)。そのうち 10 化合物は固体、6 化合物は液体である。ECVAM の報告書⁴⁾の Table 2~3 記載されている水溶性と培養液中での沈殿生成との関係は必ずしも対応していない。例えば、No3 1,2-Benzenedicarboxylic acid の水溶性は 0.2 mg/L であるが、沈殿は生じていない。一方で、No28 Diisopropanolamine は 870,000 mg/L の水溶性を有するが、沈殿を生じている。

蒸気圧については、No 44 の Sodium cyanate を除き、30 mmHg 以下であり、物性情報から揮発性が非常に高い物質は含まれていない。一方で、バリデーション研究においては揮発性

の影響が考えられた化合物が 17 あり、コントロール群の細胞にクロスコンタミネーションによる影響が認められた。

以上のように、ECVAM の報告書の Table2、Table3 に記載されている物性情報と、実際の試験において生じた現象について齟齬が認められる。これについては、三つの可能性が考えられる。一つは、物性情報に誤りがある可能性である。例えば、No 56 Zinc oxide の水溶性は 6,431mg/L であるが、バリデーションを行った 3 施設とも沈殿が生じている。PubChem 情報によると Zinc oxide は水に不溶である¹¹⁾。また、蒸気圧についても No 19 Barium chloride は 33,900mmHg とされているが、安全データシートの情報では 0mmHg¹²⁾、No 44 ; Sodium cyanate は 813mmHg とされているが、安全データシートの情報では 1mmHg (817°C)¹³⁾とされており、ECVAM の報告書に記載されたデータは明らかに誤っている。

もう一つは、溶解性の情報は 25°C (一部 12~30°C) の水に対するものであり、実際の実験に用いる培養液には血清を含め様々な成分が含まれているため、溶解性が向上する、あるいは、溶解性が低下することが想定される。そのため、JaCVAM 急性毒性資料編纂委員会では、NRU-EUC の基盤となった ICCVAM の 3T3 NRU のバリデーションに用いられた 67 種類の参照化合物の溶解性について、インターネット上に公開されているデータベースを用いて独自に調査を行い、ICCVAM のバリデーション研究の結果と比較を行った (表 4、Appendix 1)。データベースの情報では 67 化合物のうち 12 化合物において IC₅₀ 値を与える濃度がその化合物の溶解度を超え、そのうち 6 化合物が LD₅₀>2,000 mg/kg であった。一方、ICCVAM のバリデーション研究結果では、6 化合物において沈殿が認められている。また、データベースの情報では水溶性が高いが、実験では沈殿が認められている化合物が 1 化合物 (Sodium Oxalate) あった。

上記以外に、被験物質によって培養液中の成分が変性し沈殿した可能性も考えられる。

ECVAM バリデーション研究では、一部沈殿が生じる濃度域まで実験を行っているが、ほとんどの化合物で IC₅₀ 付近では沈殿が認められなかった。また、沈殿は 1 ないし 2 ラボにおいて認められた化合物が 16 物質あったが、3 ラボすべてで沈殿が認められた化合物はなく、当該バリデーションでは沈殿の影響はほとんどなかったものと考えられた。

以上の検討結果と、各委員の試験経験から、培養液中で沈殿が生じない均一な懸濁液の状態で得られる場合には評価が可能であると結論した。

本試験法は LD₅₀>2,000 mg/kg を予測する試験であるため、高濃度域におけるデータの取得が必要である。溶解性が乏しい化合物の場合、高濃度の試験が実施できない可能性がある。一方、溶解性が高い物質は高濃度域まで実験が可能である。低分子量の化合物では試験最高濃度を 5 mg/mL とした場合、例えば、バリデーション研究で使用された分子量 53.49 の Ammonium chloride は 5 mg/mL が 90 mM 以上に相当し、細胞培養液の浸透圧が非生理的な条件となり適切な細胞毒性評価ができないことが想定される。一般に *in vitro* 試験の上限濃度は 10 mM または 5 mg/mL が最高濃度とされる。この観点から、JaCVAM 資料編纂委員会では、LD₅₀ 値予測可能な分子量について考察した。

IC₅₀ 値から LD₅₀ の予測に使用された以下の 2 つの関係式は、347 のデータペア (282 ラットデータおよび 65 マウスデータペア) から得られた回帰直線であるオリジナルの RC millimole regression⁹⁾をもとに、ラットの急性経口毒性データ (282 データペア) のみを使用して得られたモル濃度及び重量濃度による回帰直線である⁵⁾。LD₅₀ 値と IC₅₀ 値の表記単位はモル濃度あるいは質量濃度が使用されており、(1) LD₅₀; mmol/kg IC₅₀; mM、(2) LD₅₀; mg/kg IC₅₀; µg/mL の組み合わせで関係式が求められている。

(1) Millimole regression model (モル濃度関係式)⁵⁾

$$\log LD_{50} \text{ (mmol/kg)} = 0.439 \times \log IC_{50} \text{ (mM)} + 0.621$$

(2) Weight regression model (重量濃度関係式)⁵⁾

$$\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372 \times \log IC_{50} \text{ (µg/mL)} + 2.024$$

関係式から LD₅₀ 値が 2,000 mg/kg として分子量を元に IC₅₀ 値を計算すると、分子量が 174 以下の化合物では、LD₅₀ 値 2,000 mg/kg を与える IC₅₀ 値を得るために必要となる濃度が 10 mM を超え、分子量 77 以下では、LD₅₀ 値 2,000 mg/kg を与える IC₅₀ 値を得るために必要となる実験濃度が 5 mg/mL を超える (Appendix 2)。ECVAM のバリデーション研究で用いられた参照化合物のうち、分子量が 174 以下のものは 27 化合物、77 以下のものは 4 化合物含まれている (表 5)。

通常、*in vitro* 試験を行う場合、5 mg/mL もしくは 10 mM が最高濃度として選択されるが、ECVAM のバリデーション研究において試験に供された分子量が 174 以下の化合物では、10 mM は 0.53~1.73 mg/mL であり、5 mg/mL は 29.0~93.5 mM であった。しかしながら、3T3 NRU により IC₅₀ から LD₅₀ を予測する基盤となった論文⁹⁾のプロトコルでは、試験最高濃度は 10 mg/mL であり、バリデーション研究における試験可能な最高濃度は通常の *in vitro* 試験の最高濃度を超えていたが、実際にはほとんどの化合物で IC₅₀ 値が求められていた。一部、沈殿等の認められた化合物もあったが、ほとんどの場合、IC₅₀ 値に影響しない濃度で認められた。したがって、バリデーション研究における評価可能物質数は表 7~9 に示されているとおり十分な数の化合物が評価されていると考える。

また、分子量が 174 以下の 27 化合物については、最高濃度を 10 mM とした場合、IC₅₀ 値が得られなくなる化合物があり、さらに試験最高濃度 (10 mM) で毒性が認められない化合物において、10 mM を用いて関係式により予測した場合、予測 LD₅₀ 値が 2,000 mg/kg 未満となり、評価ができなくなる物質が認められた (表 6)。

以上の検討結果から、信頼できる *in vivo* データが入手可能であり、かつ、*in vitro* 試験の実施が可能である化合物が選択されている点において、化合物の選択方法に妥当性はあるが、物性データの信頼性は低いと考えられた。加えて、LD₅₀ > 2,000 mg/kg を得るために必要となる濃度が、一般に *in vitro* 試験の上限とされる 10mM を超えるため適切な評価ができないと考えられる低分子量の化合物が約半数を占めていたため、汎用される場合は、最高濃度を考慮することで、分子量によって適用制限を受ける可能性があるという課題が認めら

れた。このようなことを考えると、3T3 NRUを用いた、LD₅₀ > 2,000 mg/kgを予測する ECVAM のバリデーション研究において使用した化合物を一般的な *in vitro* 試験で用いられる 5 mg/mL もしくは 10 mM で実験を行った場合、低分子の化合物において正しく UC と評価できた物質数はわずかであったと思われる。しかしながら、実際の ECVAM のバリデーション研究では非生理的な濃度である 10 mg/mL またはそれ以上の高濃度における試験がなされていながらも、評価可能な結果が得られおり、一致度は 64~67% であることから NRU-EUC においては非生理的な濃度域までの用量設定をする必要があると考えられる。

表 1 ECVAM のバリデーションに用いられた化合物の選択方法

Selection of classified chemicals (LD ₅₀ ≤ 2 000 mg/kg b.w.)	Annex I Dir 67/548/EEC			Total Number
	Xn	T	T+	
Starting pool Including only data from rat oral exposure experiments	531	339	150	1020
Only EINECS	296	265	119	680
<u>First reduction:</u> excluding chemicals with - CMR, E, O, F, C classification - T/T+ by alternative dose routes - T/T+ by chronic exposure (R48, R33) - Entries with mixed CAS	157	87	76	320
<u>Second reduction:</u> excluding pesticides and pharmaceuticals, chemicals used in previous studies, chemicals with inconsistent or missing LD ₅₀ values	38	11	7	56
<u>Third reduction:</u> excluding chemicals not available in SIGMA, potentially difficult to handle, insoluble metals, chemicals with uncertain classification	22	6	2	30 (19 solids, 11 liquids) 8 in CosIng

Selection of unclassified chemicals (LD ₅₀ > 2000 mg/kg b.w.)	ORATS and RC	Total Number
Starting pool		691
<u>Including:</u> chemicals with rat oral LD ₅₀ > 2000 mg/kg values; industrial chemicals		26 (13 liquids, 13 solids) 19 in CosIng
<u>Excluding:</u> chemicals not available in SIGMA, flammable and highly flammable chemicals; inconsistent classification when compared to RC and/or Annex I		

Xn = harmful; T = toxic; T+ = very toxic; R48 = prolonged exposure; R33 = cumulative effects; RC = Registry of Cytotoxicity; ORATS = Online European Risk Assessment Tracking System; CMR = carcinogenic, mutagenic, reproductive toxicity; E = explosive; O = oxidizing; F = flammable; C = corrosive; CosIng = the European Commission database with information on cosmetic substances and ingredients

EINECS : European Inventory of existing commercial chemical substances

C: Classified

UC: Unclassified

表2 バリデーションに用いられた 56 化合物一覧 (ECVAM 報告書 Table2,3,4 から作成)

Chem No	Chemical name	CAS No	Vapour press. mmHg (25°C)	MW	Solid/ liquid	Log Kow	Water Sol. mg/l (25°C)	Reference mean* (mg/kg)	C/UC	GHS toxicity category	EU CLP toxicity category
1	4-Ammonio-m-tolyl)ethyl(2-hydroxyethyl)ammonium sulphate	25646-77-9	6.01 E-6	292.35	solid	0.98	-	58	C	3	3
2	1,2,4-Trichlorobenzene	120-82-1	0.46	181.45	liquid	4.02	49	756	C	4	4
3	1,2-Benzenedicarboxylic acid	68515-48-0	8.61 E-7	418.61	liquid	9.37	0.20	2550	UC	5	UC
4	1,2-Dichlorobenzene	95-50-1	1.36	147	liquid	3.43	156	2065	UC	5	UC
5	1-Naphthylamine	134-32-7	0.012 hPa/(30°C) 0.004 hPa/(20°C)	143.19	solid	2.25	1700 (20°C)	540	C	4	4
6	1-Phenyl-3-pyrazolidone	92-43-3	1.63 E-5	162.19	solid	0.89	1.16 E+4	255	C	3	3
7	2-(2-Butoxyethoxy)ethanol	112-34-5	30 (130°C)	162.23	liquid	0.56	1.00E+06	6249	UC	UC	UC
8	2,2',6,6'-Tetrabromo-4,4'-isopropylidenediphenol	79-94-7	1.76 E-11 (20°C)	543.87	solid	7.2	1.00 E-3	5420	UC	UC	UC
9	2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	90-72-2	5.60 E-4	265.39	liquid	-0.66	>850 g/l (20°C)	1200	C	4	4
10	2,6-Diethylaniline	579-66-8	0.00383	149.23	liquid	3.15	670	2245	UC	5	UC
11	2-Butoxyethyl acetate	112-07-2	0.29 (20°C)	160.21	liquid	1.57	9000	4143	UC	5	UC
12	2-Chloro-4-nitroaniline	121-87-9	4.85 E-4	172.57	solid	2.12	933	6430	UC	UC	UC
13	2-Ethylhexyl acrylate	103-11-7	0.15 (20°C)	184.28	liquid	4.09	100	6007	UC	UC	UC
14	2-Phenoxyethanol	122-99-6	0.007	138.16	liquid	1.16	2.67 E+4	4565	UC	5	UC
15	4-Tert-butyl-2',6'-dimethyl-3',5'-dinitroacetophenone	81-14-1	1.22 E-5	294.31	solid	3.86	-	> 10000	UC	UC	UC
16	Acetophenone	98-86-2	0.397	120.15	liquid	1.58	6130	1701	C	4	4
17	Aconitine	302-27-2	1.38 E-20	645.74	solid	0.13	310	6	C	2	2
18	Ammonium chloride	12125-02-9	1 (160.4°C)	53.49	solid	-	-	1650	C	4	4
19	Barium chloride	10361-37-2	3.39 E4	208.23	solid	-	-	294	C	3	3
20	Benzaldehyde	100-52-7	0.127	106.12	liquid	1.48	6570	1300	C	4	4
21	Benzyl benzoate	120-51-4	2.24 E-4	212.24	liquid	3.97	15.4	1990	C	4	4
22	Brucine	357-57-3	3.13 E-10	394.46	solid	0.98	3200 (15°C)	1	C	1	1
23	Caprylic acid	124-07-2	1 (78°C)	144.21	liquid	3.05	789 (30°C)	5682	UC	UC	UC
24	Copper sulphate	7758-98-7	7.3	159.61	solid	-	-	666	C	4	4
25	Diallyl phthalate	131-17-9	1.16 E-3	246.26	liquid	3.23	182 (20°C)	822	C	4	4
26	Diepoxide 126	2386-87-0	1.8 E-5	252.31	liquid	1.78	-	4500	UC	5	UC
27	Di-"isodecyl" phthalate	26761-40-0	5.28 E-7	446.66	liquid	10.36	0.28	64000	UC	UC	UC
28	Diisopropanolamine	110-97-4	2.65 E-3	133.19	solid	-0.82	8.70E+05	6183	UC	UC	UC
29	Dimethyldioctadecyl ammonium chloride	107-64-2	-	586.5	solid	9.42	-	12150	UC	UC	UC
30	Edetic acid	60-00-4	4.98 E-13 (25°C)	292.24	solid	-3.86	1000	4500	UC	5	UC
31	Ethoxyquin	91-53-2	1.32 E-4	217.31	liquid	3.87	17.5	1407	C	4	4
32	Ethyl acetoacetate	141-97-9	1 (28.5°C)	130.14	solid	0.25	1.10E+5 (17°C)	3980	UC	5	UC
33	Ethyl chloroacetate	105-39-5	4.87	122.55	liquid	0.94	1.94 E+4 (30°C)	155	C	3	3
34	Glycerol triacetate	102-76-1	2.48 E-3	218.2	liquid	0.25	5.80E+04	3000	UC	5	UC
35	Maleic acid	110-16-7	5.19 E-6	116.07	solid	-0.48	4.41 E+5	708	C	4	4
36	Malononitrile	109-77-3	0.125	66.06	solid	-0.6	1.33 E+5	19.5	C	2	2
37	Methenamine	100-97-0	0.004	140.19	solid	-4.15	4.49E+5 (12°C)	9200	UC	UC	UC
38	N-isopropyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine	101-72-4	7.11 E-5	226.35	solid	3.28	54.6	1047	C	4	4
39	Octyl 3,4,5-trihydroxybenzoate	1034-01-1	2.90 E-9	282.33	solid	3.66	36	2335	UC	5	UC
40	p-penzoquinone	106-51-4	0.1	108.09	solid	0.2	1.11 E+4 (18°C)	79	C	3	3
41	Phthalic anhydride	85-44-9	<0.01	148.12	solid	1.6	6200	4500	UC	5	UC
42	Potassium sulfate	7778-80-5	3.35 E-5	174.26	solid	-1.03	-	6600	UC	UC	UC
43	Resorcinol	108-46-3	1	110.11	solid	0.8	7.17 E+5	535	C	4	4
44	Sodium cyanate	917-61-3	813	65.01	solid	-0.46	-	1500	C	4	4
45	Sodium salt of chloroacetic acid	3926-62-3	0.259	116.48	solid	0.22	-	328	C	4	4
46	Sorbitan monolaurate	1338-39-2	8.23 E-13	346.46	liquid	4.47	-	37425	UC	UC	UC
47	Tetramethylthiuram monosulphide	97-74-5	2.70 E-4	208.37	solid	0.75	5.00 E+4	400	C	4	4
48	Triethanolamine	102-71-6	0.01 (20°C)	149.19	liquid	7.76	1.00E+06	5530	UC	UC	UC
49	Triethylene glycol dimethacrylate	109-16-0	9.40 E-4	286.32	liquid	1.88	3600	10750	UC	UC	UC
50	Tripotassium citrate	866-84-2	5.73 E-5	324.41	solid	-0.28	6.06E+05	> 7 200	UC	UC	UC
51	Tris(nonylphenyl) phosphite	26523-78-4	5.68 E-18	689	liquid	21.56	-	14750	UC	UC	UC
52	Trizinc bis(orthophosphate)	7779-90-0	1.41	386.11	solid	-2.15	-	30000	UC	UC	UC
53	Tween 20	9005-64-5	2.16 E-22	1228	liquid	5.37	-	40370	UC	UC	UC
54	Urea	57-13-6	1.20 E-5	60.06	solid	-2.11	5.45E+05	12590	UC	UC	UC
55	Zinc distearate	557-05-1	8.58 E-6	632.33	solid	14.44	-	> 5000	UC	UC	UC
56	Zinc oxide	1314-13-2	2.64 E-12	81.39	solid	1.53	6431	7950	UC	UC	UC

表3 沈殿および揮発性による影響がみられた化合物のリスト

沈殿が認められた化合物 (16)

Chemical number	Chemical	HSL	JRC	IIVS
2.	1,2,4-Trichlorobenzene			x
4.	1,2-Dichlorobenzene			x
8.	2,2',6,6'-Tetrabromo-4,4'-isopropylidenediphenol	x		
11.	2-Butoxyethyl acetate	x		
13.	2-Ethylhexyl acrylate			x*
15.	4'-Tert-butyl-2',6'-dimethyl-3',5'-dinitroacetophenone	x		x
17.	Aconitine			x
19.	Barium chloride		x	x*
28.	Diisopropanolamine	x		
29.	Dimethyldioctadecylammonium chloride	x		
30.	Edetic acid		x	
47.	Tetramethylthiuram monosulphide			x
52.	Trizinc bis(orthophosphate)	x	x	x*
53.	Tween 20	x		
55.	Zinc distearate	x	x	x
56.	Zinc oxide	x	x	x*

* = IIVS observed precipitates in all of the 2x dosing dilutions (see also Table 7)

揮発性物質 (17)

Chemical number	Chemical	HSL	JRC	IIVS
1.	(4-Ammonio- <i>m</i> -tolyl)ethyl(2-hydroxyethyl)ammonium sulphate	x		x
5.	1-Naphthylamine	x	x	x
10.	2,6-Diethylaniline	x		x
11.	2-Butoxyethyl acetate	x	x	
13.	2-Ethylhexyl acrylate			x
14.	2-Phenoxyethanol	x		x
16.	Acetophenone	x	x	x
18.	Ammonium chloride	x	x	x
20.	Benzaldehyde		x	x*
31.	Ethoxyquin		x	x
32.	Ethyl acetoacetate	x	x	x*
33.	Ethyl chloroacetate	x	x	x*
36.	Malononitrile		x	x
37.	Methenamine	x		x
40.	<i>P</i> -benzoquinone	x		x
41.	Phthalic anhydride		x	
44.	Sodium cyanate	x		x

x = chemicals were identified as volatile and plate sealers were used during the cytotoxicity assays; * = extreme volatility was observed even when plate sealers were used

表4 NRU-EUCの基盤となったICCVAMのバリデーション研究で用いられた参照化合物のうち不溶性と判断された化合物についてJaCVAMで検討した結果

No.	Substance	CAS	Molecular Weight (g/mole)	Reference LD ₅₀ (mg/kg) ²	IC ₅₀ (mg/mL)	Reference (Pubchem) Water solubility at 20~25℃ (mg/L)	Judge	PPT in ICCVAM Validation Study
1	1,1,1-Trichloroethane	71-55-6	133.41	12078.1	20452.7	1290	Insoluble	
3	5-Aminosalicylic Acid	89-57-6	153.10	3428.0	1666.8	840	Insoluble	
15	Carbamazepine	298-46-4	236.30	2807.0	103.2	17.7	Insoluble	PPT
21	Dibutyl Phthalate	84-74-2	278.30	8892.0	43.4	11.2	Insoluble	
24	Digoxin	20830-75-5	780.90	28.3	445.5	64.8	Insoluble	PPT
27	Disulfoton	298-04-4	274.42	5.0	399.6	16.3	Insoluble	PPT
28	Endosulfan	115-29-7	406.91	27.8	5.9	0.5	Insoluble	
31	Fenpropathrin	39515-41-8	349.43	75.7	23.3	0.014	Insoluble	PPT
32	Gibberellic Acid	77-06-5	346.38	6039.5	7810.3	5000	Insoluble	
38	Lindane	58-89-9	290.80	100.0	111.5	7.3	Insoluble	PPT
44	Parathion	56-38-2	291.30	6.1	37.4	11	Insoluble	
57	Sodium Oxalate	62-76-0	134.00	633.0	37.1	37000	Soluble	PPT
67	Xylene	108-38-3	106.17	4665.0	720.6	161	Insoluble	

PubChem : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Judge: IC₅₀ 値がデータベースから得られた溶解性を超える場合に Insoluble と判定

PPT(Precipitate) : ICCVAM のバリデーション研究の細胞培養ウエル内で沈殿が認められたもの

表5 NRU-EUCの基盤となったICCVAMのバリデーション研究で用いられた参照化合物のうち分子量174以下の参照化合物のリスト

Chem No	Chemical name	CAS No	MW	Solid/liquid	Log Kow	Water Sol. mg/l (25℃)	Reference mean* (mg/kg)	C/UC	GHS toxicity category	EU CLP toxicity category
18	Ammonium chloride	12125-02-9	53.49	solid	-	-	1650	C	4	4
54	Urea	57-13-6	60.06	solid	-2.11	5.45E+05	12590	UC	UC	UC
44	Sodium cyanate	917-61-3	65.01	solid	-0.46	-	1500	C	4	4
36	Malononitrile	109-77-3	66.06	solid	-0.6	1.33 E+5	19.5	C	2	2
56	Zinc oxide	1314-13-2	81.39	solid	1.53	6431	7950	UC	UC	UC
20	Benzaldehyde	100-52-7	106.12	liquid	1.48	6570	1300	C	4	4
40	p-penzoquinone	106-51-4	108.09	solid	0.2	1.11E+4 (18℃)	79	C	3	3
43	Resorcinol	108-46-3	110.11	solid	0.8	7.17 E+5	535	C	4	4
35	Maleic acid	110-16-7	116.07	solid	-0.48	4.41E+05	708	C	4	4
45	Sodium salt of chloroacetic acid	3926-62-3	116.48	solid	0.22	-	328	C	4	4
16	Acetophenone	98-86-2	120.15	liquid	1.58	6130	1701	C	4	4
33	Ethyl chloroacetate	105-39-5	122.55	liquid	0.94	1.94E+4 (30℃)	155	C	3	3
32	Ethyl acetoacetate	141-97-9	130.14	solid	0.25	1.10E+5 (17℃)	3980	UC	5	UC
28	Diisopropanolamine	110-97-4	133.19	solid	-0.82	8.70E+05	6183	UC	UC	UC
14	2-Phenoxyethanol	122-99-6	138.16	liquid	1.16	2.67E+04	4565	UC	5	UC
37	Methenamine	100-97-0	140.19	solid	-4.15	4.49E+5 (12℃)	9200	UC	UC	UC
5	1-Naphthylamine	134-32-7	143.19	solid	2.25	1700 (20℃)	540	C	4	4
23	Caprylic acid	124-07-2	144.21	liquid	3.05	789 (30℃)	5682	UC	UC	UC
4	1,2-Dichlorobenzene	95-50-1	147	liquid	3.43	156	2065	UC	5	UC
41	Phthalic anhydride	85-44-9	148.12	solid	1.6	6200	4500	UC	5	UC
48	Triethanolamine	102-71-6	149.19	liquid	7.76	1.00E+06	5530	UC	UC	UC
10	2,6-Diethylaniline	579-66-8	149.23	liquid	3.15	670	2245	UC	5	UC
24	Copper sulphate	7758-98-7	159.61	solid	-	-	666	C	4	4
11	2-Butoxyethyl acetate	112-07-2	160.21	liquid	1.57	9000	4143	UC	5	UC
6	1-Phenyl-3-pyrazolidone	92-43-3	162.19	solid	0.89	11600	255	C	3	3
7	2-(2-Butoxyethoxy)ethanol	112-34-5	162.23	liquid	0.56	1.00E+06	6249	UC	UC	UC
12	2-Chloro-4-nitroaniline	121-87-9	172.57	solid	2.12	933	6430	UC	UC	UC

表 6. ECVAM のバリデーション研究で使用された MW 174 以下の化合物 27 物質の最高試験濃度の違いによる評価可能な化合物数

1. Millimole regression model

試験施設	バリデーション研究における 評価可能化合物数*		最高濃度別の評価可能化合物数			
			最高濃度 5 mg/mL		最高濃度 10 mM	
	UC 化合物**	C 化合物	UC 化合物**	C 化合物	UC 化合物**	C 化合物
HSL (評価可能 24 化合物)*	13 (5)	11	13 (5)	11	8 (0)	11
JRC (評価可能 25 化合物)*	12 (5)	13	12 (5)	13	6 (0)	12
IIVS (評価可能 26 化合物)*	13 (4)	13	13 (4)	13	8 (0)	13

2. Weight regression model

試験施設	バリデーション研究における 評価可能化合物数*		最高濃度別の評価可能化合物数			
			最高濃度 5 mg/mL		最高濃度 10 mM	
	UC 化合物**	C 化合物	UC 化合物**	C 化合物	UC 化合物**	C 化合物
HSL (評価可能 22 化合物)*	11 (1)	11	11 (1)	11	9 (1)	11
JRC (評価可能 24 化合物)*	11 (2)	13	11 (2)	13	7 (1)	11
IIVS (評価可能 24 化合物)*	11 (1)	13	11 (1)	13	9 (1)	13

UC: unclassified, C: classified

*バリデーション試験において MW174 以下の化合物 27 物質（うち UC14 化合物、C13 化合物）から各施設で試験しなかった物質及び、試験最高濃度で毒性がなく、かつ、予測ができなかった化合物を除いたもの

**カッコ内は UC を正しく評価できた化合物数

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

資料編纂委員会では 56 種類の参照化合物のげっ歯類の LD₅₀ はインターネットで公開されているデータベースから収集し、原著論文を入手した。参照化合物を EU CLP および UN GHS で分類した場合、それぞれの数は以下のとおり。

(1) EU CLP acute oral toxicity categories:

category 1 (LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg)	1	(2%)
category 2 (5 < LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg)	2	(4%)
category 3 (50 < LD ₅₀ ≤ 300 mg/kg)	5	(9%)
category 4 (300 < LD ₅₀ ≤ 2,000 mg/kg)	16	(29%)
unclassified (LD ₅₀ > 2,000 mg/kg)	32	(57%)

(2) UN GHS acute oral toxicity categories:

category 1 (LD ₅₀ ≤ 5 mg/kg)	1	(2%)
category 2 (5 < LD ₅₀ ≤ 50 mg/kg)	2	(4%)
category 3 (50 < LD ₅₀ ≤ 300 mg/kg)	5	(9%)
category 4 (300 < LD ₅₀ ≤ 2,000 mg/kg)	16	(29%)
category 5 (2,000 < LD ₅₀ ≤ 5,000 mg/kg)	11	(20%)
unclassified (LD ₅₀ > 5,000 mg/kg)	21	(38%)

毒性の強い区分 1 および 2 は全体の 6%であるが、2,000 mg/kg を閾値と設定した場合に
は、EU CLP では LD₅₀ ≤ 2,000 mg/kg が 43%、LD₅₀ > 2,000 mg/kg が 57%、UN GHS では LD₅₀
≤ 2,000 mg/kg が 43%、LD₅₀ > 2,000 mg/kg が 57%である。本試験の目的を考慮すると、妥当
な配分数と判断された。

5. 試験方法の正確性

ECVAM のバリデーション研究における試験は 3 施設 Health and Safety Laboratory, UK (HSL)、Joint Research Center (JRC)、The Institute for In Vitro Sciences (IIVS)において実施された。再現性については、施設内 IC₅₀ の CV を用いた解析と Millimole regression model（モル濃度関係式）と Weight regression model（重量濃度関係式）を用いて予測される LD₅₀ の再現性を検討した（「3. バリデーションに用いられた物質の分類と妥当性」を参照）。なお、この項で記載する再現性は、同一施設内で実施された試験間で LD₅₀ の予測値が再現できるか否かという点についての検討であり、*in vivo* 試験における LD₅₀ を必ずしも反映していない事に注意が必要である。LD₅₀>2,000 mg/kg および LD₅₀≤2,000 mg/kg の予測性については、Millimole regression analysis と Weight regression analysis に加えて Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve 分析により検討された。

5.1 施設内 IC₅₀ の CV を用いた解析

ECVAM のバリデーション研究において、IC₅₀ の CV の検討は HSL と JRC の 2 施設が実施している。全ての化合物の IC₅₀ の CV の平均値は HSL および JRC それぞれ 28.3% (N=39)、19.1% (N=44) であり同等であるとみなされた。CV への影響要因を化合物の特性（固体、液体、揮発性の高低、培養液中での沈殿の有無、保存条件、Classified 及び Unclassified）によって検討した結果、培養液中での沈殿生成が変動要因としてあげられている。

5.2 施設内予測 LD₅₀ の再現性

各施設においては通常、1 つの化合物について複数回の試験が行われており、それぞれの試験で得られた結果からはほとんどの場合、classified または unclassified の判定が得られている。複数回の試験における判定に再現性があるかについて検討した。複数の予測 LD₅₀ 値が得られなかった物質、試験を行わなかった物質、censored により評価ができなかった物質は検討から除外された。

Millimole regression model による判定では HSL においては評価可能な複数回のデータが得られた化合物は 40 物質で、その再現性は 98%(39/40)であった。再現性が確認されなかった物質は 2-(2-Butoxyethoxy) ethanol のみであった。同様に JRC で評価可能な化学物質は 47 物質で、再現性は 94%(44/47)であった。再現性が確認されなかった物質は、2-(2-Butoxyethoxy) ethanol、Aconitine および Barium chloride であった。IIVS では 53 化合物すべてが同じ判定であり、IIVS における再現性は 100% (53/53) であった。

Weight regression model においては、HSL では評価可能な化合物は 39 物質で、再現性は 97%(38/39)、再現性が確認されなかった物質は Triethanolamine のみであった。JRC では再現性は 93%(43/46)で、再現性が確認されなかった物質は 2-(2-Butoxyethoxy) ethanol、2-Butoxyethoxy acetate および Glycerol triacetate であった。IIVS では再現性は 98%(45/46)で、再現性が確認されなかった物質は 2-(2-Butoxyethoxy) ethanol のみであった。

再現性に関して施設間差についても評価され、施設内再現性と同様に、揮発性、溶解性等に問題のある化合物の再現性は低い、それ以外の化合物についての再現性は高かった。

5.3 予測性

Millimole regression model の回帰式を用いた解析においては、HSL では 44 化合物中、LD₅₀ 値が 2,000mg/kg 以上であるか否かが正しく予測された化合物は 28 種類（64%）、LD₅₀>2,000mg/kg であるものが予測 LD₅₀≤2,000mg/kg と判定（過大評価）された化合物は 15 種類、LD₅₀≤2,000mg/kg のものが予測 LD₅₀>2,000mg/kg と判定（過小評価）された化合物は Benzyl benzoate のみであった。JRC では 51 化合物中、毒性が正しく予測された化合物は 34 種類（67%）、過大評価された化合物は 15 種類、過小評価された化合物は 1,2,4-Trichlorobenzene および Benzyl benzoate のみであった。IIVS では 54 化合物中、毒性が正しく予測された化合物は 35 種類（65%）、過大評価された化合物は 18 種類、過小評価された化合物は Aconitine のみであった。3 施設すべてで判定が得られた化合物は 41 物質であった。そのうち、いずれにおいても正しく予測された化合物は 24 種類（8 unclassified および 16 classified）、過大評価された化合物は 12 種類であった。また、いずれかの施設で過小評価された化合物は 3 種類であった [1,2,4-Trichlorobenzene (JRC), Aconitine (IIVS), Benzyl benzoate (HSL、JRC)]（表 7）。

Weight regression model を用いた解析においては、HSL では 40 化合物中、毒性が正しく予測された化合物が 21 種類（53%）、過大評価された化合物は 19 種類、過小評価された化合物は認められなかった。JRC では 46 化合物中、毒性が正しく予測された化合物が 26 種類（57%）、過大評価された化合物は 20 種類、過小評価された化合物は認められなかった。IIVS では 47 化合物中、毒性が正しく予測された化合物は 26 種類（55%）、過大評価された化合物は 21 種類、過小評価された化合物は認められなかった（表 8）。

Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve 分析においては、感度が高くなることを重視して、感度と特異度を適正化して閾値を設定している（IC₅₀: 485.6μg/mL）。HSL では 47 化合物中、毒性が正しく陰性（LD₅₀>2,000mg/kg）と予測された化合物（区分外物質: unclassified test chemicals）は 15 種類、過大評価された化合物は 12 種類、過小評価された化合物は Barium chloride, Benzaldehyde, Benzyl benzoate であった。JRC では 52 化合物中、毒性が正しく陰性と予測された化合物は 17 種類、過大評価された化合物は 11 種類、過小評価された化合物は 7 種類（1,2,4-Trichlorobenzene, Acetophenone, Ammonium chloride, Barium chloride, Benzaldehyde, Benzyl benzoate および Maleic acid）であった。IIVS では 53 化合物中、毒性が正しく陰性と予測された化合物は 15 種類、過大評価された化合物は 15 化合物、過小評価された化合物は Benzyl benzoate および Maleic acid であった（表 9）。

Millimole regression model および ROC Curve で過小評価された Benzyl benzoate はバリデーション研究の報告書に記載の通り、reference oral LD₅₀ value を算出するために使用されたデータベースからの値は 2,080 mg/kg および 1,900 mg/kg で、平均値の 1,990 mg/kg が採用された。

5.4 正確性

3T3 NRU により急性毒性を評価する際の課題は、物性と毒性発現機序に依存する。過小評価される予測率は低いものの、「細胞毒性のみで急性経口毒性が区分外」と判断するアプローチにおいては、試験精度をより正確なものとするべきである。そのためには、化合物の揮発性、粘度、吸収性などの物性や保管および取り扱い等の影響、並びに作用機序に関する情報が必要となるものと判断される。

5.5 有用性

NRU-EUC による予測 $LD_{50} > 2,000 \text{ mg/kg}$ の一致度は 64～67%、特異度は 40～44%と予測性は限定的であるが、感度が 94%、偽陰性率は 4～8%であり毒性があるものを見逃す確率は小さい。一般工業化合物において陰性物質(substances not requiring classification)を示す比率は 87% であることを考慮すると¹⁴⁾、細胞毒性のみで急性経口毒性試験を実施しない本アプローチを実施した場合、動物削減に大きく寄与し、費用対効果が妥当であることが推測される。

表 7. 3施設における予測性の比較 (Millimole regression model を用いた評価)

	HSL	JRC	IIVS
評価物質 (総数)	44	51	54
毒性を正しく予測 (一致度)	64% (28/44)	67% (34/51)	65% (35/54)
「 LD_{50} 値 $> 2,000 \text{ mg/kg}$ 」を正しく予測 (特異度)	42% (11/26)	44% (12/27)	40% (12/30)
毒性を過大評価 (偽陽性率)	58% (15/26)	56% (15/27)	60% (18/30)
「 LD_{50} 値 $\leq 2,000 \text{ mg/kg}$ 」を正しく予測 (感度)	94% (17/18)	92% (22/24)	96% (23/24)
毒性を過小評価 (偽陰性率)	6% (1/18)	8% (2/24)	4% (1/24)
毒性を過小評価した 物質名	Benzyl benzoate	1,2,4- Trichlorobenzene, Benzyl benzoate	Aconitine

表 8. 3施設における予測性の比較 (Weight regression model を用いた評価)

	HSL	JRC	IIVS
評価物質 (総数)	40	46	47
毒性を正しく予測 (一致度)	53% (21/40)	57% (26/46)	55% (26/47)
「LD ₅₀ 値 > 2,000 mg/kg」を正しく予測 (特異度)	17% (4/23)	17% (4/24)	13% (3/24)
毒性を過大評価 (偽陽性率)	83% (19/23)	83% (20/24)	88% (21/24)
「LD ₅₀ 値 ≤ 2,000 mg/kg」を正しく予測 (感度)	100% (17/17)	100% (22/22)	100% (23/23)
毒性を過小評価 (偽陰性率)	0% (0/17)	0% (0/22)	0% (0/23)

表 9. 3施設における予測性の比較 (ROC Curve 分析)

	HSL	JRC	IIVS
評価物質 (総数)	47	52	53
毒性を正しく予測 (一致度)	68% (32/47)	65% (34/52)	68% (36/53)
「LD ₅₀ 値 > 2,000 mg/kg」を正しく予測 (特異度)	56% (15/27)	61% (17/28)	50% (15/30)
毒性を過大評価 (偽陽性率)	44% (12/27)	39% (11/28)	50% (15/30)
「LD ₅₀ 値 ≤ 2,000 mg/kg」を正しく予測 (感度)	85% (17/20)	71% (17/24)	91% (21/23)
毒性を過小評価 (偽陰性率)	15% (3/20)	29% (7/24)	9% (2/23)
毒性を過小評価した 物質名	Barium chloride, Benzaldehyde, Benzyl benzoate	1,2,4-Trichlorobenzene, Acetophenone, Ammonium chloride, Barium chloride, Benzaldehyde, Benzyl benzoate, Maleic acid	Benzyl benzoate, Maleic acid

6. 試験方法の信頼性

細胞毒性試験 3T3 NRU については、ICCVAM (2006)の「*in vitro* 細胞毒性試験による急性経口投与毒性試験の初回投与量設定試験」^{5, 6)}において再現性の良い方法であると結論されている。NRU-EUC は ICCVAM のバリデーション研究を基盤としており、本試験法で予測される LD₅₀ 値の再現性は良い事が示されている。しかし、この LD₅₀ と *in vivo* 試験における LD₅₀ との相関は必ずしも良いとは言えないが、2,000 mg/kg を閾値とした「区分外」の判定においては過小評価される予測率は低いと考えられた。

7. その他の試験方法の科学的な報告

細胞毒性試験は、培養細胞に化合物を曝露し細胞の生死により評価を行う。評価法には大きく分けて2種類あり、一つは生細胞数または死細胞数、増殖可能な細胞からできたコロニー数など直接的に細胞数を計数する方法であり、もう一つは、細胞に含まれる特定の物質の量や活性、あるいは外部から添加した物質の取り込み量を定量して間接的に細胞数を見積もる方法である。

間接的に細胞数を見積もる方法は、色素取り込み量、細胞内 ATP 量、各種酵素活性を指標にしており、光学的な方法により評価できるため効率的に評価が可能である。

3T3 NRU は、NR が細胞内のライソソームに蓄積することを利用した細胞毒性試験法である。NR を細胞に取り込ませるのに3~4時間要し、細胞外のNRを除く洗浄操作、細胞からNRを抽出する操作が必要であり、比較的作業量の多い測定法である¹⁵⁾。ATP アッセイは非常に感度がよく、10分程度の反応時間であることからハイスループット化しやすい利点がある¹⁶⁾。酵素活性を利用する測定法としてMTTアッセイがある¹⁷⁾。ミトコンドリアに取り込まれたテトラゾリウム塩が還元されて不溶性のホルマザンとなる反応を利用した方法であるが、3~4時間の反応時間と不溶性のホルマザンを細胞から抽出する作業が必要である。この点を改良した測定方法として、可溶性のホルマザンに変換され抽出操作を必要としないWST-8法¹⁸⁾、reazurinが蛍光物質であるresorufinに還元されることを利用したAlamar blue法¹⁹⁻²²⁾がある。

間接的に細胞数を見積もる方法は、細胞の大きさ、ATP 含量及び酵素活性が化合物処理によって影響を受けた場合、直接的に細胞数を計数する方法と結果が異なってくる。実際に、ある種の抗がん剤や変異原物質はミトコンドリア肥大を伴う細胞肥大によってATPおよびNADH含量を増加させるためATPアッセイ、MTTアッセイの結果と細胞数に乖離が生じることが報告されている^{23,24)}。一方、画像解析装置を用いたHigh-Content Image Analysis (HCIA) は細胞が肥大した状態においても、コールターカウンターのように細胞数を計数する方法とほぼ同等の細胞生存率を算出できることが報告されている^{25,26)}。

JaCVAM 急性毒性資料編纂委員会では、独自に選択した16化合物について実際に3T3 NRUによる評価を行い、細胞生存率の測定結果への測定法による影響を検討した(Annex)。その結果、細胞周期へ影響する化合物では3T3 NRU法でのIC₅₀値が高く評価されるため、LD₅₀値を大きく評価する可能性が示唆された。

以上のように、種々の細胞毒性評価方法が報告されているが、NRU-EUC以外には急性経口毒性におけるUN GHS区分外物質識別のための*in vitro*代替試験法の報告はない。

8. 3Rs への関与

(1) Replacement

適応される化合物は限定的であるが *in vivo* 急性経口毒性試験に置き換えるものである。

(2) Reduction

JRC により維持されている New Chemical Database (NCD)によれば、一般工業化合物の約 87%が $LD_{50} > 2,000 \text{ mg/kg}$ に分類されている。動物を用いる急性経口毒性試験を実施する前に *in vitro* 代替法として NRU-EUC により $LD_{50} > 2,000 \text{ mg/kg}$ を予測する本アプローチを導入した場合、動物使用数削減に大きく寄与し、費用対効果が妥当であることが推測される。しかしながら、NRU-EUC により適切に評価できる化合物は極めて限定的であると考えられる（「9. 試験方法の有用性と限界」参照）。

(3) Refinement

動物を使用しない評価であるため、動物への苦痛やストレスはない。

9. 試験方法の有用性と限界

9.1 物理化学的性質による適用限界

既報告^{5,6)}において議論されているように、①水や培養液への溶解性が低い物質、②揮発性の高い物質、③NR の OD 測定を阻害する物質は 3T3 NRU の適用範囲外である。

一般に水溶性が乏しい化合物の *in vitro* 試験は困難であり適切に評価できないが、JaCVAM 急性毒性資料編纂委員会では、各委員の試験経験から、培養液に混和した場合に沈殿が生じず、均一な懸濁液の状態が得られる場合には評価が可能であると結論した。一方、均一な懸濁状態が得られず、沈殿が生じる場合には 3T3 NRU を適用することはできない。仮に実施可能であったとしてもデータの信頼性が乏しい。実際に、JaCVAM 急性毒性資料編纂委員会では、独自に選択した 10 化合物について、3T3 NRU を実施した。その結果、溶解性が低く沈殿が生じる Digoxin は再現性のある結果が得られなかった (Appendix 3)。したがって、3T3 NRU の実施に際しては、事前に細胞培養液への溶解性の試験を実施してデータを得る必要がある。

In vivo 急性経口毒性試験では、規制上の限界用量 (2,000 mg/kg または 5,000 mg/kg) において被験物質に毒性がない可能性が高いことを示す周辺情報がある場合には、数段階の用量を用いた完全な試験は不要であり、2,000 mg/kg または 5,000 mg/kg の一用量のみの「限度試験」が実施される。一般に、高分子かつ難溶解性物質は生体への吸収性が乏しく、経口投与による毒性が弱いため、限度試験が適当と思われる。

水溶性が高く、培養液中で沈殿を生じない物質は適切な評価が可能であるが、本試験法は $LD_{50} > 2,000 \text{ mg/kg}$ を評価するため高濃度での実験が必要である。本試験法では、 LD_{50} 値の予測にモル濃度と重量濃度を使用した 2 種類の関係式が使用されている。関係式から LD_{50} 値が 2,000 mg/kg として分子量を元に IC_{50} 値を計算すると、分子量が 174 以下の化合物では、 LD_{50} 値 2,000 mg/kg を与える IC_{50} 値を得るために必要となる濃度が 10 mM を超え、分子量 77 以下では、 LD_{50} 値 2,000 mg/kg を与える IC_{50} 値を得るために必要となる実験濃度が 5 mg/mL を超える (Appendix 2)。従って、本試験方法では、モル濃度を用いる場合には分子量 174 以下の物質、重量濃度を用いる場合には分子量 77 以下の物質は適用範囲外である。

9.2 毒性発現機序による適用限界

3T3 NRU には化合物の代謝活性化系が含まれていないため、代謝活性化により毒性発現をする物質の評価はできない。化合物の代謝物の構造についてはある程度の予測は可能であるが、各代謝物の量的関係を予測することは困難である。また、代謝物による細胞毒性を調べるためには代謝物の合成が必要となるが合成が困難な場合もあるため、3T3 NRU で代謝物を評価することは現実的ではない。

3T3 NRU による毒性評価は basal cytotoxicity に起因する細胞死であり、心臓毒性、神経毒性など臓器特異的な毒性を有する化合物の評価には適切ではないとされている。臓器特異的な毒性を示す化合物は、一般に低濃度で生体影響を示し個体死を招く。化合物の構造から

臓器特異的な生体影響を推測することは難しく、一般に急性経口毒性試験が実施される開発初期段階においては生体影響に関する情報が得られることは少ないため、新規化合物については本試験のみで評価することは困難と考えられる。

生体影響に関する周辺情報がある場合には、本試験法により評価が可能である。Bulgheroni ら(2009)は 28 日間反復投与毒性試験の情報をを用い、NOAEL が 200 mg/kg/day より大きい場合には $LD_{50} > 2,000$ mg/kg と判断することができると報告している¹⁴⁾。このような情報が得られる場合には本試験法により評価が可能であろう。

JaCVAM 資料編纂委員会では、臓器特異的な毒性を有する化合物の本試験系への適用について、ICCVAM のバリデーション研究で用いられた 67 化合物のデータ (<http://ntp.niehs.nih.gov/pubhealth/evalatm/test-method-evaluations/acute-systemic-tox/in-vitro-validation>)と、独自に実施した 3T3 NRU 実験成績を基に議論を行った。

3T3 NRU による LD_{50} の予測は、低濃度で毒性を発現する化合物においては IC_{50} から予測される LD_{50} が *in vivo* 試験から得られた LD_{50} よりも大きな値を示し、例えば、*in vivo* LD_{50} が 50 mg/kg 以下である化合物の予測値は 14~270.4 倍大きな値を示すことから (表 10)、本評価法による予測性は極めて低いと考察される。一方、NRU-EUC は $LD_{50} > 2,000$ mg/kg である化合物を分類する方法として提案されており、2,000 mg/kg を閾値として分類すると GHS 区分内化合物に含まれる化合物の内では Digoxin (強心配糖体) のみが区分外となる。Amitriptyline (三環系抗うつ薬、アミントランスポーター阻害)、Nicotine (ニコチン受容体作動薬)、Strychnine (グリシンレセプターアンタゴニスト、強直性痙攣誘発)、Verapamil (抗不整脈薬、L型カルシウムチャネルアンタゴニスト) など、受容体またはイオンチャネル選択的に作用を及ぼすことが知られている薬物においても、予測される LD_{50} 値は *in vivo* LD_{50} と乖離があるものの $LD_{50} < 2,000$ mg/kg と予測され、「区分外」と判断されることはなかった。

JaCVAM 資料編纂委員会で独自に実施した試験結果においても、臓器特異的な毒性発現を示すことが知られている物質(Aconitine、Coumarine、Acetamiprid、Imidacloprid)において IC_{50} から予測される LD_{50} は $< 2,000$ mg/kg であり、区分外と判断されることはなかった (Appendix 3)。

以上の結果より、2,000mg/kg を閾値として 3T3 NRU による急性経口毒性の評価が可能であることが示唆される。ただし、評価した化合物は限定的であり、個体死を引き起こす機序と細胞死を引き起こす機序が解離していることがある点に注意が必要である。

9.3 行政的利用の観点からの有用性

本評価法が適用可能であるものは、*in vitro* 試験が適切に実施できる物理化学的性質を有し、全ての細胞に共通した構造あるいは機能に対する毒性 (basal cytotoxicity) によって発現する毒性が致死毒性の機構であることが条件であり、臓器特異的な毒性を示す化合物は適用範囲外である。従って、3T3 NRU のみで評価が可能であると判断できる物質は、極めて豊富

な情報が明らかな化合物である。本評価法が適用可能と想定される化合物は、急性経口毒性試験以外の生体影響評価がなされている場合に限定される。

一方で、規制上の利用を考えると、急性経口毒性試験が求められる法律またはガイドラインは、毒劇物の指定、医薬部外品の製造販売承認および化粧品ポジティブリストの改正要請に絞られる。JaCVAM 資料編纂委員会では、NRU-EUC の規制上の利用性について議論を行い、以下の条件においては適用できる可能性があると結論した。

- (1) 市場で既に使用実績があるもので豊富な情報がある物質
- (2) 既知の化合物と類似性が極めて高い物質

(1) の条件に関しては、市場で既に使用されており、急性毒性に関する情報あるいは急性毒性を予測可能な情報が入手できる物質、もしくは規格が僅かに異なる物質の評価において *in vivo* 急性毒性試験を代替することは可能と考えられる。具体的には、急性毒性に関する情報は存在するものの試験が実施された年代が非常に古い場合、あるいはデータの信頼性が乏しいと考えられる場合、急性毒性試験成績は存在しないが Bulgheroni ら¹⁴⁾の報告にあるように $LD_{50} > 2,000 \text{ mg/kg}$ を予測し得る情報がある場合において急性毒性試験のデータを必要とする場合が想定される。

(2) の条件に関しての課題は、化学物質の有害性評価に Read Across が導入されているものの、化合物の類似性を客観的に評価できる手法が確立されていないことである。一般論として構造式の類似性は毒性予測に有効であるが、毒性に差が認められる場合もあることから構造式を用いた予測に加えて、類似化合物の毒性情報や代謝についても検討が必要である。JaCVAM 急性毒性資料編纂委員会では、化合物の類似性を客観的に評価できる手法の開発は、NRU-EUC の適用範囲を広げるために有効であると結論した。

NRU-EUC の具体的な利用法としては、劇物にラベルされた化合物を含む製剤の劇物からの除外申請において適用できる可能性がある。原体が劇物に指定されている物質を含む製剤について、普通物への除外申請がなされる場合には当該製剤の急性経口毒性試験のデータの提出が求められる。除外申請においてはいくつかの原則が定められているが、「2,000 mg/kg の用量を用いた経口投与毒性試験において毒性徴候が観察されないこと」が一つの条件である。除外申請される時点においては原体に関する急性毒性の情報が存在しており、溶解性等の物理化学的性状についての情報もあるため、製剤の NRU-EUC への適用性を判断しやすく、結果の解釈もしやすい。一般に製剤は溶媒に溶解または懸濁した状態で供されるため NRU-EUC の実施において問題となる溶解性の問題を回避できる利点がある。一方で溶解性を高めるために添加される界面活性剤の濃度によっては適切に評価できない場合があるため注意が必要である。ICCVAM のバリデーション研究において、3T3 NRU は強毒性の物質については予測性が低いことが示されているが、毒物に判定された化合物の製剤は原則として除外を行わないため、NRU-EUC による評価の対象となることはない想定される。NRU-EUC を製剤の劇物からの除外申請に適用する際に考慮すべきこととして、並行して原体の *in vivo* 試験における LD_{50} を 3T3 NRU により予測できることを示す必要がある。

また、NRU-EUC は有機シアン化合物の除外申請において使用できる可能性がある。有機シアン化合物およびこれを含有する製剤は自動的に劇物指定となるが、これらを普通物とするためには、毒性データを提出して劇物からの除外申請が必要である。NRU-EUC は、ICCVAM のバリデーション研究⁵⁾において Potassium cyanide を $LD_{50} < 2,000 \text{ mg/kg}$ と評価できている。有機シアン化合物においてはニトリル基が遊離することで発現する毒性が問題である。有機化学の専門家であれば相当の精度をもってニトリル基が遊離するか否かを予測できるが、その評価を行う際に化合物の周辺情報として利用できる可能性がある。なお、3T3 NRU 法では薬物代謝系が欠損していることも念頭にいれておく必要がある。既に評価されているシアン毒性を有する有機シアン化合物と毒性が無い有機シアン化合物の細胞毒性データを整備することで、有機シアン化合物の劇物からの除外を代替法により達成できる可能性がある。

表 10 ICCVAM バリデーション研究で用いられた参照化合物の *in vivo* LD₅₀ 値と予測 LD₅₀ 値の比較

Substance	Log Original LD ₅₀ (mmol/kg)	Molecular Weight (g/mole)	IC ₅₀ (mM)	Reference LD ₅₀ ² (mmol/kg)	Original LD ₅₀ (mg/kg)	Reference LD ₅₀ (mg/kg)	Predicted LD ₅₀ (mg/kg) by RC rat-only mM Regression	Ratio Predictede LD ₅₀ /Reference LD ₅₀	Predicted Category	GHS Category
Cycloheximide	-2.148	281.40	0.001	0.007	2.00	2.0	47	23.7	C	C
Phenylthiourea	-1.705	152.20	0.519	0.020	3.00	3.0	477	158.9	C	C
Sodium selenate	-2.072	188.94	0.154	0.008	1.60	3.0	347	115.6	C	C
Triethylenemelamine	-2.310	204.23	0.001	0.005	1.00	4.0	47	11.7	C	C
Physostigmine	-1.787	275.40	0.097	0.016	4.50	5.0	412	82.5	C	C
Disulfoton	-2.137	274.42	1.456	0.007	2.00	5.0	1352	270.4	C	C
Parathion	-2.161	291.30	0.128	0.007	2.01	6.1	494	81.1	C	C
Strychnine	-2.144	334.40	0.472	0.007	2.40	6.3	1005	159.5	C	C
Aminopterin	-2.167	440.47	0.000	0.007	3.00	7.0	14	2.0	C	C
Potassium Cyanide	-0.824	65.12	0.532	0.150	9.77	7.2	206	28.6	C	C
Busulfan	-2.090	246.31	0.315	0.008	2.00	12.1	620	51.2	C	C
Thallium Sulfate	-1.241	504.80	0.011	0.057	29.00	25.0	288	11.5	C	C
Arsenictioxide	-1.000	197.84	0.010	0.100	19.78	25.1	112	4.5	C	C
Endosulfan	-1.354	406.91	0.014	0.044	18.00	27.8	265	9.5	C	C
Digoxin	-1.637	780.90	0.570	0.023	18.00	28.3	2550	90.2	UC	C
Mercury Chloride	-2.434	271.50	0.015	0.004	1.00	40.2	180	4.5	C	C
Sodium Arsenite	-0.501	129.90	0.006	0.316	41.00	43.6	57	1.3	C	C
Sodium Dichromate Dihydrate	-0.719	298.00	0.002	0.191	56.87	50.5	81	1.6	C	C
Dichlorvos (DDVP)	-1.114	220.98	0.080	0.077	17.00	58.7	305	5.2	C	C
Nicotine	-0.511	162.20	2.225	0.308	50.00	69.7	963	13.8	C	C
Fenprothrin	-1.288	349.43	0.067	0.052	18.00	75.7	445	5.9	C	C
Hexachlorophene	-0.824	406.91	0.010	0.150	61.00	82.0	228	2.8	C	C
Paraquat	-0.509	257.20	0.078	0.310	79.73	92.7	351	3.8	C	C
Lindane	-0.585	290.80	0.384	0.260	75.61	100.0	798	8.0	C	C
Verapamil HCl	-0.658	491.08	0.071	0.220	108.00	111.0	643	5.8	C	C
Sodium fluoride	0.632	41.99	1.858	4.290	180.14	126.8	230	1.8	C	C
Cadmium chloride	-0.319	183.30	0.003	0.480	88.00	135.2	58	0.4	C	C
Diquat Dibromide Monohydrate	-0.173	362.10	0.022	0.671	243.10	160.0	284	1.8	C	C
Phenobarbital	-0.154	232.23	2.524	0.702	163.00	224.0	1457	6.5	C	C
Caffeine	-0.005	194.20	0.785	0.989	192.00	310.0	730	2.4	C	C
Triphenyltin Hydroxide	-0.921	367.02	0.000	0.120	44.00	329.0	19	0.1	C	C
Haloperidol	-0.468	375.90	0.016	0.341	128.00	330.0	258	0.8	C	C
Amiripryline HCl	0.061	313.90	0.022	1.150	360.92	349.0	248	0.7	C	C
Propranolol	0.201	295.84	0.048	1.589	470.00	466.0	325	0.7	C	C
Cupric Sulfate Pentahydrate	0.080	249.70	0.151	1.201	300.00	475.0	455	1.0	C	C
Phenol	0.643	94.11	0.705	4.400	414.10	548.0	337	0.6	C	C
Lithium carbonate	1.206	73.89	7.601	16.064	1187.00	590.0	752	1.3	C	C
Glutethimide	0.441	217.30	0.833	2.761	600.00	600.0	838	1.4	C	C
Sodium Oxalate	0.063	134.00	0.277	1.157	155.00	633.0	319	0.5	C	C
Chloral Hydrate	0.462	165.40	1.107	2.896	479.00	638.0	723	1.1	C	C
Atropine Sulfate	-0.036	694.80	0.109	0.920	639.47	819.0	1099	1.3	C	C
Valproic Acid	1.009	144.20	5.727	10.200	1470.84	996.0	1296	1.3	C	C
Meprobamate	0.561	218.30	2.245	3.637	794.00	1386.8	1301	0.9	C	C
Acetylsalicylic Acid	0.744	180.20	3.754	5.549	999.94	1506.0	1346	0.9	C	C
Procainamide HCl	0.856	271.79	1.621	7.175	1950.00	1950.0	1404	0.7	C	C
Acetaminophen	1.201	151.20	0.315	15.899	2404.00	2162.0	381	0.2	C	UC
Potassium chloride	1.543	74.55	47.682	34.903	2602.00	2802.0	1699	0.6	C	UC
Carbamazepine	0.918	236.30	0.437	8.282	1957.00	2807.0	686	0.2	C	UC
Boric Acid	1.634	61.83	29.924	43.021	2660.00	3426.0	1149	0.3	C	UC
5-Ammosalicylic Acid	1.704	153.10	10.887	50.614	7749.00	3428.0	1825	0.5	C	UC
Chloramphenicol	1.021	323.15	0.403	10.500	3393.00	3490.0	906	0.3	C	UC
Acetonitrile	1.966	41.05	193.701	92.521	3798.00	3595.0	1731	0.5	C	UC
Lactic Acid	1.617	90.08	33.792	41.408	3730.00	3635.0	1765	0.5	C	UC
Sodium Chloride	1.710	58.44	81.207	51.300	2998.00	4050.0	1683	0.4	C	UC
Xylene	1.607	106.17	6.787	40.501	4300.00	4665.0	1028	0.2	C	UC
2-Propanol	1.988	60.11	58.037	97.205	5843.00	5105.0	1494	0.3	C	UC
Trichloroacetic Acid	1.486	163.40	5.519	30.594	4999.00	5229.0	1445	0.3	C	UC
Dimethylformamide	1.583	73.10	71.463	38.304	3800.00	5305.0	1990	0.4	C	UC
Citric Acid	1.194	192.10	3.981	15.617	2000.00	5929.0	1472	0.2	C	UC
Gibberellic Acid	1.260	346.38	22.548	18.201	6304.60	6039.5	5683	0.9	UC	UC
Ethylene glycol	2.140	62.08	393.615	138.000	8567.04	7161.0	3574	0.5	UC	UC
Dibutyl Phthalate	1.635	278.30	0.156	43.112	11998.18	8892.0	514	0.1	C	UC
Diethyl Phthalate	1.588	222.20	0.483	38.713	8602.00	9311.0	674	0.1	C	UC
Sodium Hypochlorite	2.078	74.44	13.971	119.694	8910.00	10327.6	990	0.1	C	UC
Ethanol	2.483	46.07	141.588	304.066	14008.32	11324.0	1693	0.1	C	UC
1,1,1-Trichloroethane	1.888	133.41	153.307	77.194	10298.48	12078.1	5078	0.4	UC	UC
Glycerol	2.139	92.09	264.365	137.812	12691.10	19770.0	4452	0.2	UC	UC

10. 結論

3T3 NRU の頑健性等の一般的な内容については、既報告の「*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」で既に評価が行われ、その妥当性が確認されている。また、LD₅₀ 値が 2,000mg/kg 以下であるか否かを判定する方法としても、その再現性や予測性が確認されており、妥当な評価方法である。

バリデーション研究の被験物質として、信頼できる *in vivo* データが入手可能であり、かつ、*in vitro* 試験の実施が可能である化合物が選択されている点において、化合物の選択方法に妥当性はあるが、LD₅₀ 値 >2,000 mg/kg を得るために必要となる濃度が、一般に *in vitro* 試験の上限とされる 10 mM を超えるため適切な評価ができないと考えられる低分子量の化合物が約半数を占めており、適切な試験の実施という観点からは課題と考えられる。一方、上限を 5 mg/mL とした場合には、評価できる化合物は 9 割を超え、一部、沈殿等の認められた化合物もあったが、ほとんどの場合、IC₅₀ 値に影響しない濃度で認められたことから適切に評価されたと考えられる。

NRU-EUC は *in vivo* 急性経口毒性試験の代替 (Replacement) であり、急性経口毒性試験における使用動物数の削減 (Reduction) および死亡動物の削減や動物への苦痛・ストレスの軽減 (Refinement) に貢献できるものである。しかしながら、物性面の制約から 3T3 NRU により適切に評価できる化合物は限定的であると考えられる。

本評価法が適用可能であるものは、*in vitro* 試験が適切に実施できる物理化学的性質、特に溶解性が高く basal cytotoxicity によって生体毒性が発現する物質であることが条件である。周辺情報が乏しいハザードが未知の物質に対して 3T3 NRU 試験を適用した場合、判断を誤る可能性がある。一方で、規制上の利用を考えると、市場で使用実績があるもので豊富な情報がある物質や既知の化合物との類似性が極めて高い物質については適用できる可能性がある。具体的な利用法として原体に関する豊富な情報がある劇物を含む製剤の除外申請に利用できる可能性があると判断された。今後、さらにデータを蓄積・整備する必要がある。

11. 参考文献

1. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, 10.1787/20745788
2. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, 10.1787/9789264071001-en
3. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, 10.1787/9789264071049-en
4. ECVAM : Pilar Prieto, Agnieszka Kinsner-Ovaskainen, Anita Tuomainen. Follow-up study on the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay to correctly identify substances not classified for acute oral toxicity under the EU CLP system ($LD_{50} > 2,000$ mg/kg)2011.
5. ICCVAM. BACKGROUND REVIEW DOCUMENT In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity2006.
6. JaCVAM. 新規試験法提案書 単回投与毒性試験代替法 国立医薬品食品衛生研究所, 平成23年6月17日.
7. OECD. Guidance Document on using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. Series on Testing and Assessment No. 1292010.
8. Ekwall B, Clemenson C, Crafoord B, et al. MEIC Evaluation of Acute Systemic Toxicity: Part V. Rodent and Human Toxicity Data for the 50 Reference Chemicals. Altern Lab Anim 1998;26 Suppl 2:571-616. PMID: 26042662
9. Halle W. The Registry of Cytotoxicity: toxicity testing in cell cultures to predict acute toxicity (LD_{50}) and to reduce testing in animals. Altern Lab Anim 2003;31:89-198. PMID: 15612878
10. Clothier R, Dierickx P, Lakhanisky T, et al. A database of IC_{50} values and principal component analysis of results from six basal cytotoxicity assays, for use in the modelling of the in vivo and in vitro data of the EU ACuteTox project. Altern Lab Anim 2008;36:503-19. PMID: 19025321
11. Zinc Oxide; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14806#section=SolubilityReport>, 2017
12. 職場の安全サイト 塩化バリウム [online]. Available at: <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/10361-37-2.html>.
13. 職場の安全サイト シアン化ナトリウム [online]. Available at: <http://anzeninfo.mhlw.go.jp/anzen/gmsds/0028.html>.
14. Bulgheroni A, Kinsner-Ovaskainen A, Hoffmann S, et al. Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) from the 28 day repeated dose toxicity studies in rats. Regul Toxicol Pharmacol 2009;53:16-9. PMID: 18977273
15. Abud AP, Zych J, Reus TL, et al. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. Regul Toxicol Pharmacol 2015;73:992-8. PMID: 26382612

16. Kuzmits R, Aiginger P, Muller MM, et al. Assessment of the sensitivity of leukaemic cells to cytotoxic drugs by bioluminescence measurement of ATP in cultured cells. *Clin Sci (Lond)* 1986;71:81-8. PMID: 3458552
17. Elisia I, Popovich DG, Hu C, et al. Evaluation of viability assays for anthocyanins in cultured cells. *Phytochem Anal* 2008;19:479-86. PMID: 18435529
18. Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, et al. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J Microbiol Methods* 2012;90:160-6. PMID: 22642794
19. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high throughput screening. *Toxicol In Vitro* 2004;18:703-10. PMID: 15251189
20. Davoren M, Herzog E, Casey A, et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro* 2007;21:438-48. PMID: 17125965
21. Bopp SK, Lettieri T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacol* 2008;8:8. PMID: 18513395
22. Zwolak I. Increased Cytotoxicity of Vanadium to CHO-K1 Cells in the Presence of Inorganic Selenium. *Bull Environ Contam Toxicol* 2015;95:593-8. PMID: 26201834
23. Chan GK, Kleinheinz TL, Peterson D, et al. A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. *PLoS One* 2013;8:e63583. PMID: 23691072
24. Tahara H, Yamamoto Y, Matsuda S, et al. Chemically induced strong cellular hypertrophy often reduces the accuracy of cytotoxicity measurements obtained using the ATP assay. *J Toxicol Sci* 2017;42:205-21. PMID: 28321047
25. Haruna Tahara YY, Hiroe Yoshizawa, Shun Matsuda, Masaharu Fujita, Yasuhiro Katsuoka, Toshihiko Kasahara. Validation of usefulness for multiple item measurable-cytotoxicity assay using image analysis; Comparison of various conventional cytotoxicity assays. *The Journal of Toxicological Sciences* 2016;41:S342.
26. 笠原利彦. 画像解析装置を用いた HCIA (High-Content Image Analysis) 細胞毒性試験の有用性. *Medical Science Digest (ニューサイエンス社)*. 2017;43:33-6.

Appendix 1

ICCVAM バリデーション試験で使用された参照化合物の溶解度評価

目的

In vitro 試験は評価する化学物質の物性による制約が大きく、中でも溶解性は重要なファクターであり、水に難溶解性である化学物質においては実験結果の再現性は低い。ECVAM から提案された評価方法は、 $LD_{50} > 2,000 \text{ mg/kg}$ (GHS 区分外) を 3T3 NRU により評価するため、高濃度域においても十分な溶解性を有していることが必要である。

JaCVAM 急性毒性資料編纂委員会では、ICCVAM の 3T3 NRU 試験のバリデーションに用いられた 67 種類の参照化学物質の溶解性について独自に調査を行い、3T3 NRU を用いて GHS 区分外を判断する評価方法の妥当性を考察する一助とした。この参照化合物の調査を行った理由は、①ECVAM の評価方法の基盤となった試験であること、②参照化合物に臓器特異的な毒性を示す強毒性の化合物 ($LD_{50} < 50 \text{ mg/kg}$) が 17 化合物 (25%) 含まれていること、③ECVAM の参照化合物とは 1 種類 (Cupric Sulfate Pentahydrate) を除き重複していないことである。

方法

インターネット上に公開されているデータベース (PubChem) により溶解性の調査を行った。得られた溶解性データが 3T3 NRU の IC_{50} 値を与える濃度を下回っている場合には Insoluble と判定した。

結果

67 化合物のうち 12 化合物において IC_{50} 値を与える濃度がその化学物質の溶解度を超え、そのうち 6 化合物が $LD_{50} > 2,000 \text{ mg/kg}$ であった。一方、ICCVAM のバリデーション試験結果では、6 化合物において沈殿が認められている。また、データベースの情報では溶解性が高いが、実験では沈殿が認められている化合物が 1 化合物 (Sodium Oxalate) あった。以上の検討結果と、各委員の試験経験から、沈殿が生じない均一な懸濁液の状態が得られる場合には評価が可能であると結論した。

表 1 ICCVAM の 3T3 NRU 試験のバリデーションに用いられた 67 種類の参照化学物質の溶解性調査結果

No.	Substance	CAS	Molecular Weight (g/mole)	Reference LD ₅₀ ² (mg/kg)	IC ₅₀ (mg/mL)	Reference (Pubchem)		Judge
						Water solubility at 20~25°C (mg/L)		
						Value	Source (URL)	
1	1,1,1-Trichloroethane	71-55-6	133.41	12078.1	20452.7	1290	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1,1,1-trichloroethane	Insoluble
2	2-Propanol	67-63-0	60.11	5105.0	3488.6	1000000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/isopropanol	Soluble
3	5-Aminosalicylic Acid	89-57-6	153.10	3428.0	1666.8	840	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5-Aminosalicylic_acid	Insoluble
4	Acetaninophen	103-90-2	151.20	2162.0	47.7	14000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetaminophen	Soluble
5	Acetonitrile	75-05-8	41.05	3595.0	7951.4	>800000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/acetonitrile	Soluble
6	Acetylsalicylic Acid	50-78-2	180.20	1506.0	676.4	4600	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/aspirin	Soluble
7	Aminopterin	54-62-6	440.47	7.0	0.006	3000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/aminopterin	Soluble
8	Amitriptyline HCl	50-48-6	313.90	349.0	7.1	9.71	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/amitriptyline	Soluble
9	Arsenictrioxide	1327-53-3	197.84	25.1	2.1	37000	http://www.chemicalbook.com/CASEN_1327-53-3.htm	Soluble
10	Atropine Sulfate	51-55-8	694.80	819.0	76.0	2200	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/atropine	Soluble
11	Boric Acid	10043-35-3	61.83	3426.0	1850.2	47200	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/boric_acid	Soluble
12	Busulfan	10043-35-3	246.31	12.1	77.7	68900	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/busulfan	Soluble
13	Cadmium chloride	10108-64-2	183.30	135.2	0.5	1200000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cadmium_chloride	Soluble
14	Caffeine	58-08-2	194.20	310.0	152.5	21600	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/caffeine	Soluble
15	Carbamazepine	298-46-4	236.30	2807.0	103.2	17.7	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/carbamazepine	Insoluble
16	Chloral Hydrate	302-17-0	165.40	638.0	183.1	793000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chloral_hydrate	Soluble
17	Chloranphenicol	56-75-7	323.15	3490.0	130.2	2500	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chloranphenicol	Soluble
18	Citric Acid	77-92-9	192.10	5929.0	764.7	383000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/citric_acid	Soluble
19	Cupric Sulfate Pentahydrate	7758-99-8	249.70	475.0	37.6	230500	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Copper_II_sulfate_pentahydrate	Soluble
20	Cycloheximide	66-81-9	281.40	2.0	0.2	21000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cycloheximide	Soluble
21	Dibutyl Phthalate	84-74-2	278.30	8892.0	43.4	11.2	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dibutyl_phthalate	Insoluble
22	Dichlorvos (DDVP)	62-73-7	220.98	58.7	17.7	8000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/dichlorvos	Soluble
23	Diethyl Phthalate	84-66-2	222.20	9311.0	107.3	1080	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diethyl_phthalate	Soluble
24	Digoxin	20830-75-5	780.90	28.3	445.5	64.8	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/digoxin	Insoluble
25	Dimethylformamide	68-12-2	73.10	5305.0	5224.0	1000000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/n_n-dimethylformamide	Soluble
26	Diquat Dibromide Monohydrate	2764-72-9	362.10	160.0	8.0	708000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/115268	Soluble
27	Disulfoton	298-04-4	274.42	5.0	399.6	16.3	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/disulfoton	Insoluble
28	Endosulfan	115-29-7	406.91	27.8	5.9	0.53	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/endosulfan	Insoluble
29	Ethanol	64-17-5	46.07	11324.0	6523.0	1000000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethanol	Soluble
30	Ethyleneglycol	107-21-1	62.08	7161.0	24435.6	100000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethylene_glycol	Soluble
31	Fenpropathrin	39515-41-8	349.43	75.7	23.3	0.014	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fenpropathrin	Insoluble
32	Gibberellic Acid	77-06-5	346.38	6039.5	7810.3	5000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/439551	Insoluble
33	Glutethimide	77-21-4	217.30	600.0	181.0	999	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glutethimide	Soluble
34	Glycerol	56-81-5	92.09	19770.0	24345.4	5296000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glycerol	Soluble
35	Haloperidol	52-86-8	375.90	330.0	6.1	14	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/haloperidol	Soluble
36	Hexachlorophene	70-30-4	406.91	82.0	4.2	140	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hexachlorophene	Soluble
37	Lactic Acid	50-21-5	90.08	3635.0	3044.0	1000000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lactic_acid	Soluble
38	Lindane	58-89-9	290.80	100.0	11.5	7.3	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lindane	Insoluble
39	Lithium carbonate	554-13-2	73.89	590.0	561.6	13100	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/lithium_carbonate	Soluble
40	Meprobamate	57-53-4	218.30	1386.8	490.0	3400	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/meprobamate	Soluble
41	Mercury Chloride	7487-94-7	271.50	40.2	4.1	69000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/mercuric_chloride	Soluble
42	Nicotine	54-11-5	162.20	69.7	360.9	1000000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/nicotine	Soluble
43	Paraquat	1910-42-5	257.20	92.7	20.1	620000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/paraquat	Soluble
44	Parathion	56-38-2	291.30	6.1	37.4	11	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/parathion	Insoluble
45	Phenobarbital	50-06-6	232.23	224.0	586.1	1110	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phenobarbital	Soluble
46	Phenol	108-95-2	94.11	548.0	66.3	82800	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phenol	Soluble
47	Phenylthiourea	103-85-5	152.20	3.0	79.0	2470	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylthiourea	Soluble
48	Physostigmine	57-47-6	275.40	5.0	26.6	7760	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/physostigmine	Soluble
49	Potassium Cyanide	151-50-8	65.12	7.2	34.6	716000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/potassium_cyanide	Soluble
50	Potassium chloride	3447-40-7	74.55	2802.0	3554.7	355000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/potassium_chloride	Soluble
51	Procainamide HCl	614-39-1	271.79	1950.0	440.7	50000	http://www.scbt.in/datasheet/202297-procainamide_hydrochloride.html	Soluble
52	Propranolol	318-98-9	295.84	466.0	14.1	61.7	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/propranolol	Soluble
53	Sodium Arsenite	7784-46-5	129.90	43.6	0.8	100000	https://www.scbt.in/scht/ia/product/sodium-meta-arsenite-7784-46-5	Soluble
54	Sodium Chloride	7647-14-5	58.44	4050.0	4745.8	360000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sodium_chloride	Soluble
55	Sodium Dichromate Dihydrate	10588-01-9	298.00	50.5	0.6	1870000	http://anzeninfo.mhlw.go.jp/aznen/qmstds/10588-01-9.html	Soluble
56	Sodium Hypochlorite	7681-52-9	74.44	10327.6	1040.0	293000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sodium_hypochlorite	Soluble
57	Sodium Oxalate	62-76-0	134.00	633.0	37.1	37000	http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_3P_C85369366.htm	Soluble
58	Sodium fluoride	7681-49-4	41.99	126.8	78.0	43000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/sodium_fluoride	Soluble
59	Sodium selenate	10102-18-8	188.94	3.0	29.0	898000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dsodium_selenite	Soluble
60	Strychnine	57-24-9	334.40	6.3	157.9	160	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/strychnine	Soluble
61	Thallium Sulfate	7446-18-6	504.80	25.0	5.4	48700	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thallium_1_sulfate	Soluble
62	Trichloroacetic Acid	76-03-9	163.40	5229.0	901.8	54000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/trichloroacetic_acid	Soluble
63	Triethylenemelamine	51-18-3	204.23	4.0	0.3	400000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triethylenemelamine	Soluble
64	Triphenyltin Hydroxide	76-87-9	367.02	329.0	0.0	1	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triphenyltin_hydroxide	Soluble
65	Valproic Acid	99-66-1	144.20	996.0	825.8	2000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/valproic_acid	Soluble
66	Verapamil HCl	152-11-4	491.08	111.0	34.9	83000	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Verapamil_hydrochloride	Soluble
67	Xylene	108-38-3	106.17	4665.0	720.6	161	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/m-xylene	Insoluble

Appendix 2

関係式から 2,000 mg/kg の LD₅₀ 値を与える IC₅₀ 値により規定される評価可能な分子量

目的

In vitro 試験の実施においては被験物質の物性面での制約が大きい。本試験法は $LD_{50} > 2,000$ mg/kg を予測する試験であるため、高濃度域におけるデータの取得が必要である。溶解性が乏しい化学物質の場合、高濃度の試験が実施できない可能性がある。一方、溶解性が高い物質は高濃度域まで実験が可能であるが、低分子量の化学物質では細胞培養液の浸透圧が非生理的な条件となり適切な細胞毒性評価ができない。一般に *in vitro* 試験の上限濃度は 10 mM または 5 mg/mL が最高濃度とされる。この視点から、 LD_{50} 値予測可能な分子量について考察した。

方法

ICCVAM、ECVAM の評価書では、 LD_{50} の予測値はデータベースより得られた数値を基に回帰分析により関係式を求めて算出している。予測に使用された関係式は 2 種類あり、 LD_{50} 値と IC_{50} 値の表記単位はモル濃度あるいは質量濃度が使用されており (1) LD_{50} ; mmol/kg IC_{50} ; mM、(2) LD_{50} ; mg/kg IC_{50} ; μ g/mL の組み合わせで関係式が求められている。

高いモル濃度域で 3T3 NRU を実施する場合、低分子量の化学物質ほど多くの溶質を細胞培養液に添加することになる。そこで、モル濃度単位を用いた関係式において LD_{50} 値が 2,000 mg/kg である場合に、試験濃度が 10 mM または 5 mg/mL 未満で IC_{50} 値が算出可能な分子量を計算した。

計算には以下の 3 種類の関係式を使用した。

1) ICCVAM の「*In vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing*」および ECVAM の「*Follow-up study on the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay to correctly identify substances not classified for acute oral toxicity under the EU CLP system ($LD_{50} > 2,000$ mg/kg)*」で評価された EURL ECVAM Recommendation on the 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay for Acute Oral Toxicity Testing (Report EUR 25946 EN, April 2013), P7, "2. Test method definition", "12)" より、ECVAM DB-ALM Protocol no 139, p3 に記載の 2 式

1-a) Validated millimole regression model (the RC rat-only millimole regression):

$$\text{Log } LD_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.439 \text{ Log } IC_{50} (\text{mM}) + 0.621$$

1-b) Validated weight regression model (RC rat-only weight regression):

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

2) Halle のデータを基にしたデータベース「The Registry of Cytotoxicity (RC)」からの millimole regression formula:

$$\text{Log } LD_{50} (\text{mmol/kg}) = 0.435 \text{ log } IC_{50} (\text{mM}) + 0.625$$

1-a および 1-b の 2 式は「The Registry of Cytotoxicity (RC)」 に記載のデータベース中の 347 物質のうちラット経口 LD₅₀ 値の得られた 282 物質を用いて得られたものである。ECVAM の follow-up study では millimole regression で高い予測性が示されている。

1-a および 1-b の式の運用については ECVAM DB-ALM Protocol no 139 中に以下が記載されている。

「Millimole regression model は、分子量がわかっていて純度の高い物質に適している。Weight regression model は混合物や構造/分子量がわからない物質および不純物の割合が高い物質に使用できる。Weight regression model では高分子量の物質では明らかに overestimate することが validation study からわかっている。」

ただし、実際のバリデーション研究では混合物については試験が行われていない。

1) ICCVAM, ECVAM で評価された式を用いた計算

(1) 1-a ; Validated millimole regression model

$$\log LD_{50} (mmol/kg) = 0.439 \times \log IC_{50} (mM) + 0.621$$

(a) *In vitro* 試験での最高濃度を 10 mM と設定した場合

LD₅₀ = 2,000 mg/kg, IC₅₀ = 10 mM のとき、以下の式より分子量 (MW) は 174.2

$$\log (2,000 \text{ mg/kg} \div [\text{MW}]) = 0.439 \times \log (10 \text{ mM}) + 0.621 = 1.06$$

$$2,000 / [\text{MW}] = 10^{1.06} = 11.482$$

$$[\text{MW}] = 2,000 / 11.482 = 174.2$$

(b) *In vitro* 試験での最高濃度を 5 mg/mL と設定した場合

LD₅₀ = 2,000 mg/kg, IC₅₀ = 5 mg/mL のとき、以下の式より MW は 76.3

$$\log (2,000 \text{ mg/kg} \div [\text{MW}]) = 0.439 \times \log (5 \text{ mg/mL} \times 1,000 \div [\text{MW}]) + 0.621$$

$$\log [\text{MW}] = 1.8827$$

$$[\text{MW}] = 76.327$$

表 1

MW	2000 mg (mmol)	計算値		
		(log IC ₅₀ , mM)	(IC ₅₀ , mM)	(IC ₅₀ , mg/mL)
50	40.00	2.235	171.696	8.585
70	28.57	1.902	79.780	5.585
76.3	26.21	1.817	65.560	5.002
80	25.00	1.770	58.857	4.709
90	22.22	1.653	45.006	4.051
100	20.00	1.549	35.403	3.540
150	13.33	1.148	14.058	2.109
174	11.49	1.001	10.025	1.744
175	11.43	0.995	9.895	1.732
200	10.00	0.863	7.300	1.460
500	4.00	-0.043	0.905	0.453
800	2.50	-0.508	0.310	0.248
1000	2.00	-0.729	0.187	0.187

関係式から LD₅₀ 値が 2,000 mg/kg とし分子量を基に IC₅₀ 値を計算すると、表 1 の結果となる。分子量が 174 以下の化学物質では、LD₅₀ 値 2,000 mg/kg を与える IC₅₀ 値を得るために必要となる実験濃度が 10 mM を超え、分子量 76 以下では、LD₅₀ 値 2,000 mg/kg を与える IC₅₀ 値を得るために必要となる実験濃度が 5 mg/mL を超える。

(2) 1-b ; Validated weight regression model

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

表 2

IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	LD ₅₀ (mg/kg)
500	1067
1000	1380
2000	1786
2710	2000
5000	2512
8000	2992
10000	3251

分子量が特定できない場合（混合物、不純物が多い等）は、Weight regression model を用いる。試験最高濃度を 5 mg/mL とすると、LD₅₀ 値 2,000mg/kg を超える予測は可能となる。

(3) Original RC regression

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

(a) *In vitro* 試験での最高濃度を 10 mM と設定した場合

$LD_{50} = 2,000 \text{ mg/kg}$, $IC_{50} = 10 \text{ mM}$ のとき、以下の式より分子量 (MW) は 174.2

$$\log(2,000 \text{ mg/kg} \div [\text{MW}]) = 0.435 \times \log(5 \text{ mg/mL} \div [\text{MW}]) + 0.625 = 1.06$$

$$2,000/[\text{MW}] = 10^{1.06} = 11.482$$

$$[\text{MW}] = 2,000/11.482 = 174.193$$

(b) *In vitro* 試験での最高濃度を 5 mg/mL と設定した場合

$LD_{50} = 2,000 \text{ mg/kg}$, $IC_{50} = 5 \text{ mg/mL}$ のとき、以下の式より MW は 77.3

$$\log(2,000 \text{ mg/kg} \div [\text{MW}]) = 0.435 \times \log(5 \text{ mg/mL} \times 1,000 \div [\text{MW}]) + 0.625$$

$$\log[\text{MW}] = 1.8885$$

$$[\text{MW}] = 77.349$$

表 3

MW	2000 mg (mmol)	計算値		
		(log IC ₅₀ , mM)	(IC ₅₀ , mM)	(IC ₅₀ , mg/mL)
50	40.00	2.246	176.244	8.812
70	28.57	1.910	81.318	5.692
77.3	25.87	1.811	64.737	5.004
80	25.00	1.777	59.824	4.786
90	22.22	1.659	45.633	4.107
100	20.00	1.554	35.817	3.582
150	13.33	1.149	14.102	2.115
174	11.49	1.001	10.025	1.744
175	11.43	0.995	9.894	1.731
200	10.00	0.862	7.279	1.456
500	4.00	-0.053	0.886	0.443
800	2.50	-0.522	0.301	0.240
1000	2.00	-0.745	0.180	0.180

関係式から LD_{50} 値が 2,000 mg/kg とし、分子量を基に IC_{50} 値を計算すると、表 11-3 の結果となる。分子量が 174 以下の化学物質では、 LD_{50} 値 2,000 mg/kg を与える IC_{50} 値を得るために必要となる実験濃度が 10 mM を超え、分子量 77 以下では、 LD_{50} 値 2,000 mg/kg を与える IC_{50} 値を得るために必要となる実験濃度が 5 mg/mL を超える。

結論

以上の検討結果から、バリデーション研究により評価された 2 種の関係式 (millimole regression model と weight regression model) とオリジナルの関係式 (millimole regression) の 3 種類の関係式中、計算にモル濃度単位を使用した関係式では、分子量 174 以下では LD₅₀ 値 > 2,000 mg/kg を得るために必要となる実験濃度が、一般に *in vitro* 試験の上限とされる 10mM を超えるため、適切な評価ができないと結論された。

Appendix 3

3T3 NRU の評価に適さないと考えられる化合物の評価

目的

ECVAM の参照化合物では、強毒性の化合物及び臓器特異的な化合物の割合が少ない。これらは 3T3 NRU の適応限界から外れると考えられる化合物である。JaCVAM 急性毒性資料編纂委員会では独自に選択した化合物について試験を実施し、LD₅₀ 値を算出し評価の一助とした。

評価物質と選択理由

(1) Thiourea :

ICCVAM リストにおいて、IC₅₀ が 5 mg/mL 以上で急性毒性が 2,000 mg/kg 未満

(2) Piperazine :

ICCVAM リストにおいて、IC₅₀ が 5 mg/mL 以上で急性毒性が 2,000 mg/kg 未満

(3) 1-Nitropropane :

ICCVAM リストにおいて、IC₅₀ が 5 mg/mL 以上で急性毒性が 2,000 mg/kg 未満

(4) 1,3,5-Trioxane :

ECVAM 評価書において 3 施設のうち 1 施設が FN を示した物質

(5) Digoxin :

心臓特異的な毒性を有するため 3T3 NRU の適応限界から外れる物質

(6) Aconitine :

神経特異的な毒性を有するため 3T3 NRU の適応限界から外れる物質

(7) Coumarin :

化粧品関連の物質であり、血液凝固系を特異的に阻害するため 3T3 NRU の適応限界から外れる物質

(8) 2,4-Diamino-6-Phenyl-s-Triazine :

細胞毒性が弱い LD₅₀ が 1,000 mg/kg である

(9) Imidacloprid :

神経特異的な毒性を有するため 3T3 NRU の適応限界から外れる物質

(10) Acetamiprid :

神経特異的な毒性を有するため 3T3 NRU の適応限界から外れる物質

対照物質と陽性対照物質

陰性対照物質（溶媒）は、Dimethyl sulfoxide（DMSO、和光純薬）および注射用水（光製薬）を使用した。陽性対照材料として、Sodium dodecyl sulfate（SDS）は、Sigma 社から購入した。

細胞および細胞播種

Balb/c 3T3 クローン A31 細胞（マウス胎児由来繊維芽細胞）は DS ファーマより購入した。入手した時点で 3 代のものを、さらに 10 代まで継代して凍結保存した。これを解凍後 2 代で試験に用いた。培養は、ウシ新生児血清（NBS, ロット番号 : 07C001、Biowest 社）を 10 % 含む DMEM 培地（GIBCO）を用い、CO₂ インキュベーター（CO₂ 濃度 5%、37°C）内で培養した。

試験 1 日目に培養フラスコで増殖させた 3T3 細胞をトリプシン溶液で剥離／洗浄後、10% NBS 含有 DMEM 培地に懸濁し、20,000 個/mL に調製した。96well クリアボトムブラックプレート（グライター）に、100 μ L ずつ（2,000 個/well）播種して約 24 時間、5% CO₂、37°C で培養した。3 つのアッセイを実施するため、同じプレートを 3 枚作製した。

薬液調製

薬液調製は、用事調製とし、試験 2 日目に実施した。

用量設定試験では、OECD GD129 に従って、化合物の最終最高濃度については、DMSO に溶解する化合物は 1 mg/mL、水に溶解する化合物は、10 mg/mL とし、公比 3 でばく露した（n=2）。溶媒が DMSO の場合は、深底マイクロプレートのウエルに DMSO を 6 μ L ずつ分注しておき、DMSO に溶解した薬液を 3 μ L ずつ、ピペッティングしながら公比 3 の希釈系列を作成した後、594 μ L の血清不含の DMEM 培地を添加した。

水に溶解したピペラジンについては、深底マイクロプレートのウエルに水を 60 μ L ずつ分注しておき、水に溶解したピペラジン溶液を 30 μ L ずつ、ピペッティングしながら公比 3 の希釈系列を作成した後、540 μ L の血清不含の DMEM 培地を添加した。陽性対照物質の SDS については、10% SDS 水溶液を調製し、同様に公比 3 の希釈系列を作成し、540 μ L の血清不含の DMEM 培地を添加した。

本試験では、表 1 に示すように、用量設定試験から化合物の最終最高濃度を決定し、本試験は公比 2 でばく露した（n=3）。溶媒が DMSO の場合は、深底マイクロプレートのウエルに DMSO を 7 μ L ずつ分注しておき、DMSO に溶解した薬液を 7 μ L ずつ、ピペッティングしながら公比 2 の希釈系列を作成した後、693 μ L の血清不含の DMEM 培地を添加した。Aconitin は、DMSO への溶解限度が 100 mg/ml であったので、用量設定試験では最終濃度を 0.5 mg/ml で試験を実施したが、IC₅₀ 値を算出するのに必要な毒性が得られなかったので、100 mg/mL を 100 倍希釈した 1 mg/ml（最終濃度）で本試験を実施した。水に溶解した Piperazine については、深底マイクロプレートのウエルに水を 70 μ L ずつ分注しておき、水に溶解した Piperazine 溶液を 70 μ L ずつ、ピペッティングしながら公比 2 の希釈系列を作成した後、630 μ L の血清不含の DMEM 培地を添加した。また、陽性対照物質の SDS については、用量設定試験の結果から、最終濃度を 0.02% としたため、0.4% SDS 水溶液を調製し、血清不含 DMEM 培地で 10 倍希釈し、0.04% とした。

薬液添加

24 時間、前培養した 96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨てた。ウエルに残った培地を捨てるために滅菌したペーパータオルにプレートを丁寧に押し付けた。あらかじめ 37°C に温めた 10% NBS 含有 DMEM 培地を各ウエルに 50 μ L ずつ分注し、速やかに所定のウエルに 2 倍濃度の薬液を 50 μ L ずつ分注した。CO₂ インキュベーター（CO₂ 濃度 5%、37°C）内で 48 時間培養した。この操作により、化合物ばく露中の培地の血清濃度は 5% になる。

試験方法

薬物を添加して 48 時間培養した後、NRU アッセイを実施した。

96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨てた。あらかじめ 37°C に温め

た PBS を各ウェルに 250 μ L ずつ添加した。マイクロプレート逆さまにして PBS を除去した後、ウェルに残った培地を捨てるために滅菌したペーパータオルにプレートを丁寧に押し付けた。50 μ g/mL ニュートラルレッド（関東化学）を含んだ 5%NBS 含有 DMEM 培地を各ウェルに 100 μ L ずつ分注し、CO₂ インキュベーター（CO₂ 濃度 5%、37℃）内で 3 時間培養した。培養後、96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨てた。あらかじめ 37℃に温めた PBS を各ウェルに 250 μ L ずつ添加した。マイクロプレート逆さまにして PBS を除去した後、ウェルに残った培地を捨てるために滅菌したペーパータオルにプレートを丁寧に押し付けた。100 μ L の NR 脱離液（水：エタノール：氷酢酸＝49：50：1）を各ウェルに添加してマイクロシェイカーで、30 分間、振盪した。5 分間静置してから、ウェル内に泡が入っていないことを確認して、マルチプレートリーダー（サーモフィッシュサイエンティフィック、バリオスキャンフラッシュ）で吸光度（OD:540nm）を測定した。

IC₅₀ 値の算出

IC₅₀ 値の算出は、2 種類の方法（①および②）で算出した。

- ① IC₅₀ 値は、下記のように細胞生存率が 50%を挟む濃度とその濃度の細胞生存率を結んだ直線の式から算出した(表 5-1 および 5-2)。

IC₅₀=50% 細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制率 = (100% - 細胞生存率)

$$IC_{50} = \frac{(50\% - A:50\%より低い細胞増殖抑制率)}{(B:50\%より高い細胞増殖抑制率 - A:50\%より低い細胞増殖抑制率)} \times (Bの時の濃度 - Aの時の濃度) + (Aの時の濃度)$$

- ② IC₅₀ 値は、GraphPad Prism ver.5（エム・デー・エフ社より購入）を使用して算出した(表 6-1 および 6-2)。

試験結果

1-ニトロプロパンおよび 1,3,5-トリオキサンについて細胞毒性は認められなかった。ジゴキシンは培養液中に析出が認められ再現性のある結果が得られなかったため、正確な評価はできないと判断した。IC₅₀ 値は、生存率 50%を挟む 2 点の用量の細胞生存率の直線式から算出した IC₅₀ 値と GraphPad Prism から算出した IC₅₀ 値と大きな違いはなかった。

Thiourea、Piperazine、1,3,5-Trioxane、Coumarin、2,4-Diamino-6-Phenyl-s-Triazine、Imidacloprid および Acetamiprid の 3T3 NRU アッセイ（IC₅₀ 値）から換算された LD₅₀ 値は、実際の動物試験の LD₅₀ 値（文献値）と大きな違いはなかった。Digoxin の細胞毒性試験の IC₅₀ 値から換算された LD₅₀ 値は 1,000 mg/kg になり毒性を示す結果にはなったが、実際の急性毒性は約 20 mg/kg で強い毒性を示す結果となり、実際の動物の結果と大きな乖離があった。1-Nitropropane の細胞毒性試験の IC₅₀ 値から換算された LD₅₀ 値は、>2,000 mg/kg になり区分外の判定になったが、実際の急性毒性は 500 mg/kg であり、区分外を予測することはできなかった。Aconitine も細胞毒性試験の IC₅₀ 値から換算された LD₅₀ 値は 2,000 mg/kg 程度の値になり区分外の判定になったが、実際の急性毒性は 6 mg/kg であり、強い毒性を示す結果となり大きな乖離があった。

表 1 本研究に使用した化合物の情報

No	化合物名	CAS No	分子量	性状 *1	溶媒 *2	用量設定試験			本試験		
						調製 濃度 mg/mL	最終 最高 濃度 mg/mL (mM)	公 比	調製 濃度 mg/mL	最終 最高 濃度 mg/mL (mM)	公 比
1	Thiourea	62-56-6	76.12	WC	D	200	1 (13.1)	3	400	2 (26.3)	2
2	Piperazine	110-85-0	86.14	WC	W	200	10 (116.1)	3	40	2 (23.3)	2
3	1-Nitropropane	108-03-2	89.09	TL	D	200	1 (11.2)	3	1000	5 (56.1)	2
4	1,3,5-Trioxane	110-88-3	90.08	TC	D	200	1 (11.1)	3	500	2.5 (27.8)	2
5	Digoxin	20830-75-5	780.95	WC	D	200	1 (1.28)	3	400	2 (2.56)	2
6	Aconitine*2	302-27-2	645.74	WC	D	100	0.5 (0.774)	3	100	1 (1.55)	2
7	Coumarin	91-64-5	146.14	WC	D	200	1 (6.84)	3	200	1 (6.84)	2
8	2,4-Diamino-6-Phenyl-s-Triazine	91-76-9	187.2	WC	D	200	1 (5.3)	3	100	0.5 (2.67)	2
9	Imidacloprid	138261-41-3	255.66	WC	D	200	1 (3.9)	3	400	2 (7.82)	2
10	Acetamiprid	138261-41-3	222.67	WC	D	200	1 (4.49)	3	400	2 (8.98)	2
陽性	SDS	135410-20-7	424.08	WC	W	10%	0.5% (11.7)	2	0.4%	0.02% (0.0467)	-

*1 : WC ; White Crystal, WL ; White Liquid, TC ; Transparent Liquid

*2 : D ; DMSO, W ; Water

*3 : Aconitine は、DMSO に 100 mg/mL までしか溶解しなかったため、用量設定試験では最高用量を 0.5 mg/mL とし、本試験では 100 mg/mL を培地に 1%になるように添加し、最終濃度を 1 mg/mL にした。

表2 3T3 NRU アッセイの IC₅₀ 値（直線式及び GraphPad Prism）から算出した本 LD₅₀ 値と急性毒性 LD₅₀ 値の比較

A

No.	化合物名	CAS No.	細胞毒性 NRU IC ₅₀		LD ₅₀ 換算値 (mg/kg)			急性毒性LD ₅₀ (文献値)	
			生存率50%を挟む2点の直線式より算出		NRU IC ₅₀ 値より下記の3つの式で換算			ラットLD ₅₀ (No.5はマウス)	
			μg/ml	mM	①-a	②	①-b	LD ₅₀ (mg/kg)	出典
1	Thiourea	62-56-6	1134.4	14.9	1041	1040	1447	1750	NITE
2	Piperazine	110-85-0	439.9	5.11	736	738	1017	1280	NITE
3	1-Nitropropane	108-03-2	>5000	>56.1	>2181	>2166	>2512	455-528	NITE
4	1,3,5-Trioxane	110-88-3	>2500	>27.8	>1620	>1614	>1941	6010	NITE
5	Digoxin	20830-75-5	78.3	0.100	1189	1211	535	17.8	平成22年度食品確保総合調査
6	Aconitine	302-27-2	348.5	0.540	2058	2082	933	5.97	平成22年度食品確保総合調査
7	Coumarin	91-64-5	88.4	0.605	490	495	560	290-680	NITE
8	2,4-Diamino-6-Phenyl-s-Triazine	91-76-9	25.4	0.135	325	331	352	933	NITE
9	Imidacloprid	138261-41-3	605.8	2.37	1560	1569	1146	410	NITE
10	Acetamiprid	135410-20-7	647.2	2.91	1486	1494	1174	140-200	AGRITOX

①-a: Validated millimole regression model (the RC rat-only millimole regression)

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

②: Halleのデータを基にした「The Registry of Cytotoxicity (RC)」から

$$\text{Log LD}_{50}(\text{mmol/kg}) = 0.435\text{LogIC}_{50}(\text{mM}) + 0.625$$

①-b: Validated weight regression model (the RC rat-only weight regression)

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

B

No.	化合物名	CAS No.	細胞毒性 NRU IC ₅₀		LD ₅₀ 換算値 (mg/kg)			急性毒性LD ₅₀ (文献値)	
			GraphPad Prismより算出		NRU IC ₅₀ 値より下記の3つの式で換算			ラットLD ₅₀ (No.5はマウス)	
			μg/ml	mM	①-a	②	①-b	LD ₅₀ (mg/kg)	出典
1	Thiourea	62-56-6	866.9	11.4	925	925	1309	1750	NITE
2	Piperazine	110-85-0	616.8	7.16	854	855	1153	1280	NITE
3	1-Nitropropane	108-03-2	>5000	>56.1	>2181	>2166	>2512	455-528	NITE
4	1,3,5-Trioxane	110-88-3	>2500	>27.8	>1620	>1614	>1941	6010	NITE
5	Digoxin	20830-75-5	71.9	0.092	1145	1167	518	17.8	平成22年度食品確保総合調査
6	Aconitine	302-27-2	311.1	0.482	1958	1982	894	5.97	平成22年度食品確保総合調査
7	Coumarin	91-64-5	99.1	0.678	515	521	584	290-680	NITE
8	2,4-Diamino-6-Phenyl-s-Triazine	91-76-9	25.3	0.135	325	330	351	933	NITE
9	Imidacloprid	138261-41-3	711.0	2.78	1674	1682	1216	410	NITE
10	Acetamiprid	135410-20-7	557.1	2.50	1392	1399	1110	140-200	AGRITOX

①-a: Validated millimole regression model (the RC rat-only millimole regression)

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

②: Halleのデータを基にした「The Registry of Cytotoxicity (RC)」から

$$\text{Log LD}_{50}(\text{mmol/kg}) = 0.435\text{LogIC}_{50}(\text{mM}) + 0.625$$

①-b: Validated weight regression model (the RC rat-only weight regression)

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

A: 直線式から算出した本 LD₅₀ 値と急性毒性 LD₅₀ 値の比較

B: (GraphPad Prism) から算出した本 LD₅₀ 値と急性毒性 LD₅₀ 値の比較

Annex

急性毒性試験代替法に関する研究

画像解析装置を用いた HCIA (High-Content Image
Analysis)

アッセイを含む各種細胞毒性試験の精度比較

平成 29 年 4 月

小島 肇

(国立医薬品食品衛生研究所)

協力研究者：笠原 利彦 (富士フイルム 安全性評価センター)

1. 要旨

経済協力開発機構（Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD）ガイドランス文書 No.129 “Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systematic Toxicity Tests”では、動物を用いた急性毒性試験の最高用量を予測するツールとして、3T3 細胞を用いた NRU(neutral red uptake)アッセイが推奨されている。ただし、NRU アッセイは、比較的古い細胞毒性試験法であり、間接的に細胞数を計数する方法であることから、細胞周期に影響を与える化合物の評価では精度が低下する可能性が考えられる。本研究では、精度よく細胞生存率を算出できる方法を探すため、最近汎用されている ATP アッセイおよび WST-8 アッセイに加え、笠原らが開発した画像解析装置を使用した HCIA (High-Content Image Analysis) アッセイ¹⁾について 16 化合物を用いて検討した。HCIA は細胞数を直接カウントするコールターカウンターと非常に良く相関することが報告されている。HCIA による解析結果との比較により、NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイから算出した IC₅₀ 値は抗がん剤や変異原物質のような細胞周期を特異的に停止するような生理活性物質は、実際の細胞数を反映しておらず、IC₅₀ 値が高めに算出されることが明らかとなった。さらに、HCIA アッセイは、細胞毒性のメカニズムを説明できる周辺データも同時に取得することができ、精度の高い細胞毒性試験であり、急性毒性試験代替法として有効である可能性が示唆された。

2. 序論

医薬、農薬、医療機器および工業用途などで使用される化学物質のヒトに対する毒性を評価するために、これまで実験動物が中心に使用されてきた。その一つである急性毒性試験（単回投与毒性試験）は、化学物質におけるヒトでの過量投与時の影響を予測するために有用である一方、毒劇物の指定²⁾や化学物質安全性データシート（{M} SDS: {Material} Safety Data Sheet）の有害性情報の中で、その物質の毒性程度を計る有用な試験法である。投与経路に関しては、化学物質の特性を考慮し、必要に応じて経皮、又は吸入経路を用いるとされている³⁾。

経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）テストガイドライン（TG: Test Guideline）では、急性経口毒性試験として1987年に設定されたTG401に代わり⁴⁾、TG420固定用量法およびTG423毒性等級法が2002年に、TG425上げ下げ法が2008年に公定化されている⁵⁻⁷⁾。これらは動物実験の3Rs（Replacement：置き換え、Reduction：使用数の削減、Refinement：苦痛の軽減）を考慮して慎重に被験物質を投与して、毒性分類を行うプロトコルになっている。

本試験法の動物を用いない動物実験代替法（*in vitro*試験）については多くの検討がなされてきた⁸⁻¹¹⁾。その一つとして、NICEATM (The NTP Interagency Center for the Evaluation of

Alternative Toxicological Methods)/EURL ECVAM(European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing) はこのデータを利用し、回顧的なバリデーション試験を実施した。その結果、3T3細胞を用いたNRU (Neutral Red Uptake) アッセイがUN GHS (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) によって定義された急性経口毒性を十分に予測することはできないと報告している。この報告書は、3T3細胞を用いるNRUアッセイが、*in vivo*急性毒性試験の開始用量を決定するために有用であることのみを結論づけている。これを受けて作成されたOECDガイダンス文書No.129 “Guidance Document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity testing” では、*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が定められた¹²⁾。JaCVAM (日本動物実験代替法評価センター) においても、このガイダンスのもとになったNICEATM/ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods)の資料をもとに¹³⁻¹⁵⁾、本分野の専門家による評価がなされており、当該試験法の有用性はそれほど大きなものでない。しかし、これを採用することの利点は存在し、しかも欠点は致命的なものでない。強制力を持たせないで、これを行政的に提案し、推奨することは3Rs原則にそったものであると結論している¹⁶⁾。

細胞毒性試験とは、基本的には培養細胞を化学物質で曝露した後に、細胞数をカウントし細胞の生存率や増殖抑制率を評価する試験である。しかしながら、一般的に接着細胞の数をカウントするには、酵素処理で細胞を単離し、血球計算盤やコールターカウンターを用いて細胞数を計数する必要があるため、ある程度の細胞数が必要である。我々の経験では、余裕を持ってカウントするには12wellプレート以上の面積が必要である。しかし、実際の現場では、効率的に実施するため、96well マイクロプレート等のwellより小さい面積のマイクロプレートを使用されていることが多い。96wellプレートのwellの面積では細胞を剥離して、細胞数を直接測定するには細胞数が少なすぎるので、細胞内ATP量、酵素活性および色素取り込みなどの生物学的機能を指標した測定法が使用されてきた。

ガイダンス文書No.129に記載されているNRUアッセイは、ニュートラルレッドが細胞内のライソソームに蓄積することを利用した細胞毒性試験法であるが、ニュートラルレッドを細胞に取り込ませるのに3～4時間かかり、さらに細胞外のNRを除くために、細胞を洗浄し細胞内のニュートラルレッドを抽出する作業が必要なことから、手間のかかる測定系である¹⁷⁾。一方、ATPアッセイは非常に感度がよく、反応も10分程度で終わることから、ハイスループット化しやすいなどの利点がある¹⁸⁾。酵素活性を利用する測定法の代表的な試験法はMTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 法であり、MTTが細胞内の脱水素酵素の活性化に必要なNADHによって不溶性のホルマザンに還元されることを利用した方法である¹⁹⁾。しかし、MTT法は、反応時間が3～4時間かかり、さらに細胞内の不溶性のホルマザンを抽出する作業が必要なことから、最近では細胞内で還元されると可溶性のホルマザンに変換され、抽出作用を必要としないWST-8法(2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)²⁰⁾や同様の原理でreazurin

が蛍光物質であるresorufinに還元されることを利用したAlamar blue法²¹⁻²⁴⁾が使用されることが多くなった。これらの生物学的指標を利用する測定法で細胞毒性を評価する場合の大前提は、これらの指標がどの細胞にも一定量含まれており、化合物で処理した細胞でもその指標の量に変化しないことである。

また、最近、Chanらや笠原らは抗がん剤や変異原物質が、ミトコンドリア肥大を伴う細胞肥大を誘導することによりミトコンドリア内のATPおよびNADH含量を増加させ、ATPアッセイやMTSアッセイから算出された細胞生存率が、直接細胞数をカウントすることによって算出した細胞生存率と大きく乖離するケースがあることを報告した^{25,26)}。さらに、笠原は画像解析装置を用いたHCIA (High-Content Image Analysis) アッセイを用いることにより、このように細胞が肥大した状態においても、直接細胞数を計数することによりコールターカウンターとほぼ同等の細胞生存率を出すことができることを報告した¹⁾。

本研究では、細胞毒性試験の精度をより向上させ、急性毒性試験代替法としての利用価値を上げるため、工業、試薬用途に使用される10化合物に加えて、すでにCHL細胞において細胞肥大作用があることが知られている6化合物²⁶⁾を加えた16化合物を曝露した際の上記の細胞毒性試験の結果について比較検証した。また、細胞毒性試験に使用する細胞については、3T3細胞の他に、すでに抗がん剤や変異原物質で肥大が誘導することが知られているCHL細胞についても、同様の操作を行った。

3. 材料と方法

3-1) 被験物質

本研究では、16化合物について、以下に示す4種類の細胞毒性試験を実施した。化合物の種類、メーカー、最高濃度、公比および溶媒をTable 1に示した。No.1 から No.10 の化合物については重量濃度で調製し、No.11 から No.16 についてはモル濃度で調製した。

3-2) 細胞および細胞播種

Balb/c 3T3 クローン A31 細胞(マウス胎児由来繊維芽細胞、以下 3T3 細胞と略称) および CHL/IU 細胞(チャイニーズハムスター肺細胞、以下 CHL 細胞と略称) は DS ファーマより購入した。3T3 細胞の培養は、10%ウシ新生児血清(NBS, Biowest 社)含有 DMEM 培地(GIBCO)を用い、CHL 細胞の培養は、10%仔牛血清(CS, GIBCO 社) CS 含有 MEM 培地(GIBCO)を用いて、CO₂ インキュベーター(CO₂ 濃度 5%、37°C) 内で培養した。

試験 1 日目に培養フラスコで増殖させた 3T3 細胞および CHL 細胞をそれぞれトリプシン溶液で剥離/洗浄後、3T3 細胞は 10% NBS 含有 DMEM 培地に、CHL 細胞は 10 %CS 含有 MEM 培地に懸濁し、それぞれ 20,000 個/mL に調製した。96well クリアボトムブラックプレート(グライター)に、それぞれ 100μL ずつ(2,000 個/well) 播種して約 24 時間、

CO₂ インキュベーターで培養した。4 種類の細胞毒性試験を実施するため、同じプレート
を 4 枚作製した。

3-3) 被験物質の調製

被験物質の調製は、用事調製とし、試験 2 日目に実施した。

ピペラジン以外の化合物は、表 1 に示した最高用量の 200 倍の濃度になるように化合物
を DMSO に溶解した。被験物質の希釈系列は、深底マイクロプレートのウェルに DMSO
を 6μL ずつ分注しておき、公比 3 の場合は DMSO に溶解した被験物質を 3μL ずつ、公比
2 の場合は 6μL ずつ、ピペッティングしながら希釈系列を作成した後、594μL の血清不含
の DMEM 培地 (3T3 細胞) あるいは MEM 培地 (CHL 細胞) を添加した。水に溶解した
ピペラジンについては、深底マイクロプレートのウェルに水を 60μL ずつ分注しておき、
水に溶解したピペラジン溶液を 60 μL ずつ、ピペッティングしながら公比 2 の希釈系列を
作成した後、540μL の血清不含の DMEM 培地を添加した。

3-4) 被験物質の添加

24 時間、前培養した 96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨てた。ウ
ェルに残った培地を捨てるために滅菌したペーパータオルにプレートを丁寧に押し付け
た。あらかじめ 37℃に温めた 10%NBS 含有 DMEM 培地 (3T3 細胞用) あるいは 10%CS 含
有 MEM 培地 (CHL 細胞用) を各ウェルにすばやく 50μL ずつ分注し、所定のウェルに 2
倍濃度の被験物質を 50μL ずつ分注した。CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養した。こ
の操作により、化合物曝露中の培地の血清濃度は 5%になる。

3-5) 各種試験法

被験物質を添加して 48 時間培養した後、4 種類の細胞毒性試験 (NRU アッセイ、ATP ア
ッセイ、WST-8 アッセイおよび HCIA アッセイ) を実施した。

3-5-1) NRU アッセイ

48 時間、被験物質の曝露後、96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨
てた。あらかじめ 37℃に温めた PBS を各ウェルに 250μL ずつ添加した。マイクロプレート
を逆さまにして PBS を除去した後、50 μg/mL ニュートラルレッド (関東化学) を含んだそ
れぞれの 5%血清含有培地を各ウェルに 100 μL ずつ分注し、CO₂ インキュベーター内で 3 時
間培養した。培養後、96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨てた。あら

はじめ 37℃に温めた PBS を各ウェルに 250μL ずつ添加した。マイクロプレート逆さまにして PBS を除去した後、ウェルに残った NR 含有培地を完全に除去するためにペーパータオルにプレートを丁寧に押し付けた。100 μL の NR 脱離液（水：エタノール：氷酢酸＝49：50：1）を各ウェルに添加してマイクロシェイカーで、30 分間、振盪した。5 分間静置してから、ウェル内に泡が入っていないことを確認して、マルチプレートリーダー（サーモフィッシャーサイエンティフィック、バリオスキャンフラッシュ）で吸光度（OD:540nm）を測定した。

3-5-2) ATP アッセイ

48 時間、被験物質の曝露後、96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨てた。あらかじめ 37℃に温めた PBS を各ウェルに 100 μL ずつ添加した。マイクロプレートを逆さまにして PBS を除去した後、ウェルに残った培地を捨てるためにペーパータオルにプレートを丁寧に押し付け、素早く PBS を各ウェルに 50 μL 添加した。CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay（プロメガ）の ATP 反応液を 50 μL 添加して、プレートシェイカーで 10 分間振盪し、5 分間静置した後、ウェル内に泡が入っていないことを確認して、マルチプレートリーダーで発光強度を測定した。

3-5-3) WST-8 アッセイ

48 時間、被験物質の曝露後、96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨てた。あらかじめ 37℃に温めた PBS を各ウェルに 100 μL ずつ添加した。マイクロプレートを逆さまにして PBS を除去した後、あらかじめ WST-8 溶液 1 に対して、10 の割合で 5%血清含有培地を混ぜて調製した WST-8 含有培地を 100 μL ずつ分注し、CO₂ インキュベーター内で 3 時間培養した。培養後、ウェル内に泡が入っていないことを確認して、マルチプレートリーダーで吸光度（OD:450nm、リファレンス 650nm）を測定した。

3-5-4) HCIA アッセイ

48 時間、被験物質の曝露後、96well マイクロプレートを注意深く逆さまにして培地を捨てた。あらかじめ 37℃に温めた PBS を各ウェルに 100 μL ずつ添加した。マイクロプレートを逆さまにして PBS を除去した後、ウェルにエタノールを 100 μL ずつ添加して約 30 分間、室温で固定した。エタノールをデカントで除去し、100 μL の PBS を添加し、測定するまで冷蔵保存した。PBS をデカントで除去した後、ウェルに 5μM ヘキスト 33342（モレキュラープローブ）および 1 μg/ml セルマスキレッド（モレキュラープローブ）を含有した PBS を 100μL ずつ添加して室温、遮光下で 30 分、染色した。染色液をデカントで除去した後、100

μL の PBS で 1 回洗浄後、フレッシュな PBS を 100μL 添加して、インセルアナライザー2000 (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて、2 つの蛍光波長 (Ex/Em=350nm/ 461(ヘキスト)、Ex/Em=588nm/ 612(セルマस्क)) の画像を 1 ウェルあたり 12 箇所自動取得し、得られた画像を自動解析することで、細胞数、核面積、細胞面積、小核出現率、真円率および細胞周期を算出した。

3-6) IC₅₀ 値の算出

IC₅₀ 値は、下記の式で算出した。

IC₅₀ 値は、下記のように細胞生存率が 50%を挟む濃度とその濃度の細胞生存率を結んだ直線の式から算出した。

IC₅₀=50% 細胞増殖抑制濃度

細胞増殖抑制率 = (100% - 細胞生存率)

$$IC_{50} = \frac{(50\% - A:50\%より低い細胞増殖抑制率)}{(B:50\%より高い細胞増殖抑制率 - A:50\%より低い細胞増殖抑制率)} \times (Bの時の濃度 - Aの時の濃度) + (Aの時の濃度)$$

4. 結果

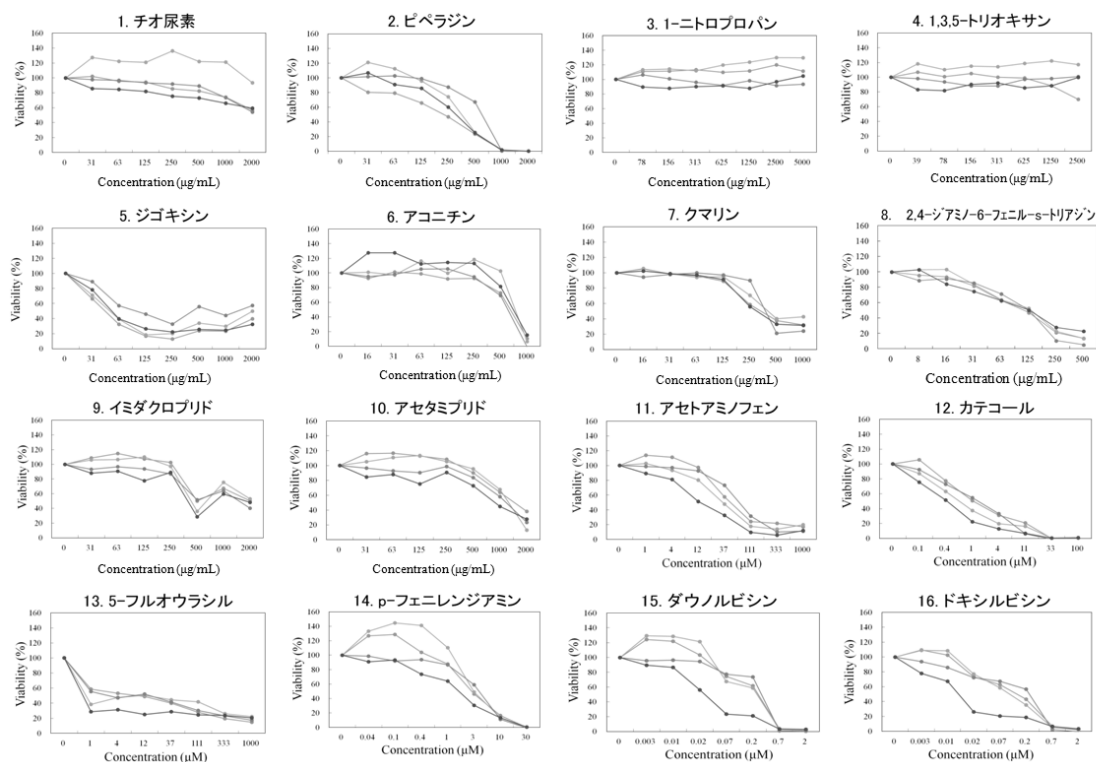
3T3 細胞および CHL 細胞を用いた 4 種類の細胞毒性試験の結果 (細胞生存率) を図 1-1 および 1-2 に示した。3T3 細胞では、No.1~No.10 の化合物における NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイの細胞生存率は、チオ尿素で WST-8 の生存率が高値を示した以外は、どの方法も HCIA アッセイのそれとほぼ同じ値を示した。No.11~No.16 の NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイの細胞生存率は、どの試験法も HCIA アッセイの細胞生存率よりも高値を示した。CHL 細胞についても、No.1~No.10 の化合物における NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイの細胞生存率は、3T3 細胞の場合と同様に、どの方法も HCIA アッセイのそれと同様な細胞生存率のパターンを示したが、全体的に 3T3 細胞よりも細胞生存率の一致性が低かった。No.11~No.16 については、NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイの細胞生存率は、ダウロルビシン(No.15)以外、3T3 細胞の場合と同様に HCIA アッセイの細胞生存率よりも高値を示した。表 2-1、2-2、2-3 および 2-4 には、図 1 の各細胞毒性試験における細胞生存率の数値だけでなく、HCIA アッセイで解析した各用量での核の平均面積のコントロール倍、細胞の平均面積のコントロール倍、小核出現率のコントロール倍、細胞真円率が 90%以上になった細胞の割合および細胞周期を示した。細胞真円率は、細胞の形態が丸いかどうかを示す指標であり、真円率が

100%の細胞は完全な円を意味する。表 2 では、真円率の数値を 90%以上に設定し、ほぼ丸い細胞の出現率を数値化することにより、細胞の形態変化を評価項目に加えた。両細胞とも、No.11～No.16 のあらかじめ変異原性があることが報告されている化合物の小核出現率は 2 倍以上の誘導を示した。ジゴキシン (No.5) においては、CHL 細胞では小核出現率の増加を誘導しなかったが、3T3 細胞では小核出現率の増加が認められた。図 2 では、HCIA アッセイにおいて、細胞肥大を示した化合物について、核と細胞質を染色した写真を示した。3T3 細胞は、敷石状に細胞が増えていくので、細胞が肥大したかどうかは見た目では分かりにくい。CHL 細胞は細胞間接着により増殖しないので、細胞 1 個 1 個の肥大が明確であった。図 3 では、NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 の IC₅₀ 値と HCIA アッセイの IC₅₀ 値の相関を示した。3T3 細胞では、WST-8 アッセイの相関係数が 0.92、NRU アッセイが 0.87、ATP アッセイが 0.83 であった。一方、CHL 細胞では、WST-8 アッセイの相関係数が 0.77、NRU アッセイが 0.53、ATP アッセイが 0.50 であり、相関性の順番は 3T3 細胞と同じであったが、相関係数は全体的に 3T3 細胞より低かった。

表 1 化合物情報および試験濃度

No	化合物	CAS No.	メーカー	最高用量	公比	溶媒
1	チオ尿素	62-56-6	和光純薬	2mg/mL (26.3mM)	2	DMSO
2	ヒペラジン	110-85-0	東京化成(TCI)	2mg/mL (23.3mM)	2	水
3	1-ニトロプロパン	108-03-2	東京化成(TCI)	5mg/ml (56.1mM)	2	DMSO
4	1,3,5-トリオキサン	110-88-3	東京化成(TCI)	2.5mg/mL (27.8mM)	2	DMSO
5	ジゴキシン	20830-75-5	東京化成(TCI)	2mg/mL (2.56mM)	2	DMSO
6.	アコニチン	302-27-2	Sigma-Aldrich	1mg/mL (1.55mM)	2	DMSO
7.	クマリソ	91-64-5	関東化学	1mg/mL (1.55mM)	2	DMSO
8	2,4-ジアミノ-6-フェニル-s-トリアジン	91-76-9	関東化学	0.5mg/mL (2.67mM)	2	DMSO
9	イミダクロプリド	105827-78-9	関東化学	2mg/mL (7.82mM)	2	DMSO
10	アセタミプリド	135410-20-7	関東化学	2mg/ml (8.98mM)	2	DMSO
11	アセトアミノフェン	103-90-2	Sigma-Aldrich	0.15mg/mL (1mM)	3	DMSO
12	カテコール	106-50-3	東京化成(TCI)	0.0011mg/mL (0.1mM)	3	DMSO
13	5-フルオロウラシル	154-93-8	Sigma-Aldrich	0.13mg/mL (1mM)	3	DMSO
14	p-フェニレンジアミン	66-81-9	Sigma-Aldrich	0.0032mg/mL (0.03mM)	3	DMSO
15	ダウノルピシン	23541-50-6	Wako	0.0011mg/mL (0.001mM)	3	DMSO
16	ドキシノルピシン	25316-40-9	Wako	0.0012mg/mL (0.001mM)	3	DMSO

図 1-1 16 化合物を用いた NRU アッセイ、ATP アッセイ、WST-8 アッセイおよび HCIA アッセイの細胞生存率
の比較 (3T3 細胞)



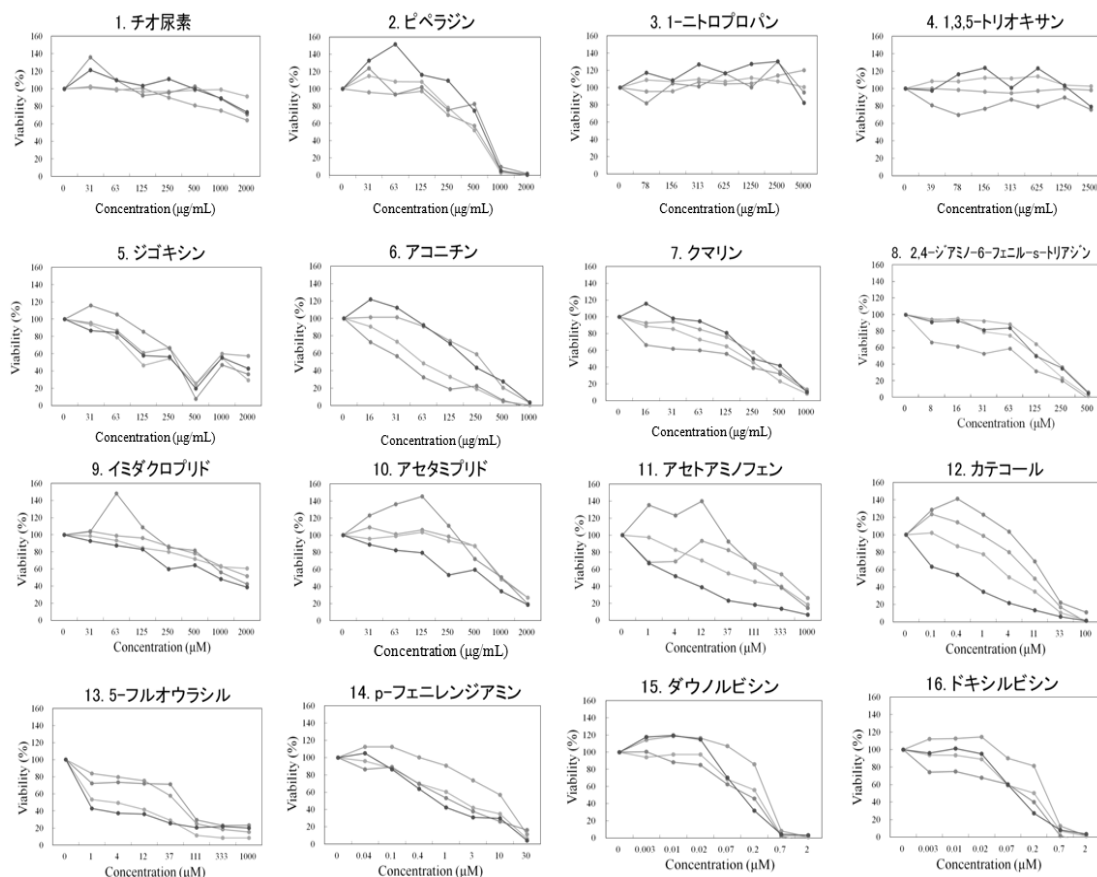
○:NRU アッセイ

●:ATP アッセイ

■:WST-8 アッセイ

▲:HCIA アッセイ

図 1-2 16 化合物を用いた NRU アッセイ、ATP アッセイ、WST-8 アッセイおよび HCIA アッセイの細胞生存率の比較 (CHL-K1 細胞)



○:NRU アッセイ

●:ATP アッセイ

○:WST-8 アッセイ

●:HCIA アッセイ

表 2-1 HCIA アッセイによる細胞毒性関連項目の測定および各種細胞毒性試験による細胞生存率の比較(3T3 細胞)

3T3	化合物	用量 μg/mL	細胞生存率(%)				核の面積コントロール倍 (%)	細胞面積コントロール倍 (%)	小核出現率(コントロール倍)	細胞真円率90%以上の細胞の出現率 (%)	細胞周期 (%)		
			ATP assay	NR assay	WST-8 assay	HCIA assay					G1/G0	S	G2/M
			Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean			
1	チオ尿素 (μg/mL)	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.1	46.0	25.9	20.0
		31	102.0	97.7	127.2	85.6	101.1	111.3	1.3	0.0	47.7	24.3	20.9
		63	95.6	96.5	122.3	84.6	101.6	113.4	1.4	0.1	38.7	27.8	25.5
		125	94.2	93.5	120.7	81.9	100.7	115.7	1.6	0.1	37.7	28.5	26.2
		250	85.4	91.9	136.1	75.3	100.8	121.0	1.7	0.0	39.6	28.2	24.9
		500	82.5	89.0	121.9	73.0	98.0	120.5	1.7	0.2	35.1	32.1	24.8
		1000	73.9	73.6	121.1	66.1	96.3	122.6	1.8	0.2	33.8	31.6	27.0
		2000	56.5	54.1	93.3	59.3	96.9	121.2	1.8	0.5	30.9	31.6	26.2
2	ビペラジン (μg/mL)	31	80.4	101.8	121.1	106.6	95.7	98.3	1.3	0.0	39.8	26.1	23.7
		63	79.3	102.6	112.3	90.8	95.5	105.5	1.3	0.1	39.9	28.3	22.8
		125	65.8	98.9	95.6	85.8	95.9	110.2	1.4	0.0	38.4	28.3	24.5
		250	46.9	87.3	74.2	59.9	98.1	130.2	1.7	0.1	39.4	29.7	23.5
		500	23.2	67.1	25.7	25.0	95.6	171.1	4.1	0.3	38.2	27.7	25.3
		1000	Tox										
		2000	Tox										
		2000	Tox										
3	1-ニトロプロパン (μg/mL)	78	110.7	106.2	113.1	89.7	102.8	109.8	1.4	0.1	41.6	26.4	23.5
		156	111.4	100.7	114.2	87.6	102.0	109.1	1.6	0.0	38.5	27.2	24.7
		313	113.2	96.2	111.7	90.2	102.8	107.8	1.8	0.0	38.8	26.3	24.3
		625	109.7	91.7	119.5	91.3	101.3	106.1	1.5	0.1	37.7	27.7	24.7
		1250	111.7	98.1	123.6	87.7	101.5	109.9	1.3	0.0	33.5	30.9	25.9
		2500	119.8	91.4	129.9	96.8	99.8	104.5	1.2	0.0	32.0	28.5	26.8
		5000	111.3	93.4	129.6	104.5	102.9	100.2	1.2	0.0	29.2	28.6	27.7
		5000	Tox										
4	1,3,5-トリオキサン (μg/mL)	39	106.9	98.2	118.0	83.1	103.9	112.0	1.6	0.0	49.3	25.5	19.5
		78	100.8	93.8	110.2	81.7	101.7	111.6	1.5	0.1	41.4	27.9	23.3
		156	105.1	88.2	115.0	90.2	101.5	106.7	1.4	0.1	39.8	26.2	25.1
		313	99.9	88.2	114.2	92.1	103.5	107.6	1.5	0.0	34.9	29.0	26.4
		625	98.8	97.0	118.6	85.4	100.6	107.4	1.0	0.0	32.1	30.2	26.9
		1250	88.5	98.1	122.0	88.3	102.1	108.6	1.1	0.0	31.2	30.3	26.9
		2500	69.9	100.9	117.1	99.7	103.2	102.3	1.1	0.1	34.6	27.0	26.0
		2500	Tox										
5	ジゴキシシン (μg/mL)	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.1	50.1	23.4	20.1
		31	66.2	89.0	71.1	78.1	102.5	112.8	1.5	0.1	52.5	22.6	20.2
		63	32.5	57.2	39.3	39.7	91.2	121.5	1.9	0.1	58.7	18.7	17.8
		125	16.8	45.9	18.5	26.4	89.6	122.6	2.5	0.5	45.7	20.5	25.0
		250	12.8	32.8	20.2	22.3	87.5	115.9	2.3	1.8	41.0	21.2	29.2
		500	23.8	55.7	33.9	25.6	95.5	135.8	2.7	0.2	46.6	20.2	26.0
		1000	23.4	44.1	29.7	24.7	93.0	128.8	2.2	0.2	45.1	22.5	24.6
		2000	39.6	57.5	49.9	32.3	89.9	124.8	1.5	0.2	59.1	19.3	17.2
6	アユニチン (μg/mL)	16	92.7	95.3	101.0	127.5	94.5	89.7	1.1	0.1	52.8	23.2	19.0
		31	101.4	98.1	97.4	127.5	95.8	90.6	1.2	0.1	50.1	22.9	21.4
		63	98.8	105.4	116.2	112.2	94.0	93.4	1.0	0.1	48.0	23.1	22.1
		125	91.9	105.6	99.7	114.5	90.2	92.7	0.9	0.1	47.8	23.5	22.6
		250	92.8	94.6	118.3	113.2	92.0	96.0	1.1	0.1	41.9	27.5	23.4
		500	72.7	69.2	102.6	81.6	92.3	113.9	1.4	0.3	39.4	27.1	26.0
		1000	10.6	-0.9	6.6	15.3	79.1	103.8	-	4.4	37.4	23.1	29.9
		1000	Tox										
7	クマリン (μg/mL)	16	105.4	94.4	104.8	102.3	99.8	101.8	1.4	0.1	47.5	23.7	22.6
		31	98.3	97.8	98.6	99.0	99.2	102.8	1.2	0.1	49.3	25.1	20.5
		63	96.1	100.0	94.2	96.9	101.7	106.5	1.6	0.0	47.2	24.2	22.6
		125	89.0	96.9	95.0	91.2	104.0	114.3	1.4	0.1	49.5	23.2	21.1
		250	58.5	89.9	70.5	55.7	105.4	148.9	1.5	0.1	45.8	27.0	22.2
		500	37.8	21.2	40.0	33.0	94.2	170.1	1.4	0.4	54.1	22.9	19.1
		1000	32.0	23.9	42.8	31.5	93.3	171.0	1.3	0.6	50.6	20.1	23.1
		1000	Tox										
8	2,4-ジアミノ-6-フェニ ル-5-トリアジン (μg/mL)	8	95.8	88.8	102.9	102.7	99.5	101.4	1.1	0.1	51.3	23.9	19.6
		16	93.7	91.2	103.1	84.0	101.7	111.7	1.2	0.1	46.5	25.2	23.0
		31	81.9	85.8	83.8	74.8	100.6	117.0	1.3	0.0	46.7	24.0	23.5
		63	63.0	71.5	63.8	62.7	101.1	125.6	1.2	0.1	49.0	27.5	19.0
		125	47.2	50.5	52.6	50.5	98.4	134.9	1.2	0.1	50.3	25.2	20.7
		250	21.3	10.8	22.9	28.0	86.1	141.6	1.2	0.2	62.8	18.4	15.5
		500	13.8	5.4	13.5	22.9	83.3	147.1	1.0	0.3	65.3	13.9	18.1
		500	Tox										

各用量ウェル数:n=3

化合物の析出

- ・細胞生存率(ATP or NR or WST-8 or HCIA)が5~50%のときオレンジ色、0~5%のときピンク色で表示する。
- ・核面積のコントロール倍が125~150%のときオレンジ色、150%を超えるとピンク色で表示する。
- ・細胞面積のコントロール倍が150~200%のときオレンジ色、200%を超えるとピンク色で表示する。
- ・小核出現率コントロール倍が2倍以上のときピンク色で表示する。
- ・細胞真円率90%以上の細胞の出現率が10~20%のときオレンジ色、20%を超えるとピンク色で表示する。
- ・コントロールの各細胞周期の割合(%)±5%以上のとき色をつけて表示する。

表 2-2 HCIA アッセイによる細胞毒性関連項目の測定および各種細胞毒性試験による細胞生存率の比較(3T3 細胞)

3T3	化合物	用量	細胞生存率(%)				核の面積コントロール倍(%)	細胞面積コントロール倍(%)	小核出現率(1ノドール倍)	細胞真円率90%以上の細胞の出現率(%)	細胞周期(%)		
		μg/mL	ATP assay	NR assay	WST-8 assay	HCIA assay							
		μM	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	G1/G0	S
9	コントロール	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.1	50.8	22.5	18.7
	イミダクロプリド(μg/mL)	31	108.6	93.3	106.0	87.9	102.6	107.4	1.6	0.0	46.2	23.6	21.7
		63	114.6	96.6	106.6	90.6	102.1	106.3	1.5	0.1	45.5	24.2	21.7
		125	107.3	93.7	109.9	77.6	104.0	118.0	1.4	0.1	48.2	24.0	21.0
		250	102.5	86.9	97.2	89.0	103.5	111.6	1.5	0.0	48.4	23.4	21.2
		500	50.0	51.7	36.0	28.5	115.4	187.7	1.9	0.1	56.2	21.5	17.3
		1000	67.3	63.8	75.5	59.5	103.9	141.6	1.2	0.1	52.9	22.5	19.5
10	アセタミナリド(μg/mL)	2000	50.1	40.1	53.0	48.1	100.7	158.2	1.1	0.1	60.1	18.7	17.9
		31	116.2	96.6	105.1	84.4	101.8	110.4	1.7	0.0	49.1	23.7	20.0
		63	116.6	92.8	110.7	88.0	100.8	110.0	1.4	0.0	48.4	24.7	19.7
		125	112.9	90.3	113.4	75.2	102.7	119.8	1.4	0.1	47.8	24.6	21.3
		250	108.4	98.7	105.5	90.7	101.9	109.8	1.6	0.1	50.2	22.4	20.8
		500	90.2	83.8	95.5	72.6	101.8	129.5	1.3	0.0	50.8	23.3	19.5
	1000	63.8	58.0	67.6	44.9	97.4	160.9	1.4	0.0	54.3	22.4	18.7	
11	アセトアミノフェン(μM)	2000	38.1	23.3	12.9	27.6	93.2	197.6	1.6	0.3	56.6	18.8	19.9
		1.4	113.9	98.8	102.7	89.1	101.8	108.3	1.7	0.1	48.8	23.6	20.9
		4.1	111.1	97.0	93.5	81.1	103.2	114.8	1.6	0.1	49.4	24.6	19.0
		12.3	97.3	92.6	80.3	51.3	108.1	143.2	1.8	0.1	47.1	25.7	20.9
		37.0	57.5	73.3	47.8	32.6	118.0	185.9	2.3	0.2	43.0	28.2	21.8
		111.1	24.1	31.4	17.8	9.5	117.6	243.5	3.7	0.0	54.3	23.0	16.6
	333.3	21.7	10.0	13.8	5.7	114.7	275.6	3.5	1.1	54.2	19.8	17.4	
1000.0	17.1	11.1	19.8	11.9	106.0	266.4	1.8	0.0	63.1	14.7	18.0		
12	カテコール(μM)	0.14	105.6	92.4	87.2	75.6	101.7	120.2	1.5	0.1	61.9	20.4	14.2
		0.41	77.4	72.9	62.9	51.4	101.8	139.5	1.8	0.2	51.3	22.6	20.1
		1.23	50.7	54.5	37.4	22.3	110.4	187.4	2.8	0.2	48.2	24.7	21.5
		3.70	31.0	33.1	19.8	12.7	106.5	206.3	2.2	0.9	47.5	23.9	22.8
		11.11	20.7	6.1	16.3	6.7	89.0	144.8	0.7	4.7	54.0	17.3	21.1
		33.33											
	100.00	Tox											
13	コントロール	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.1	52.0	20.6	17.5
	5-フルオウラシル(μM)	1.4	58.7	55.5	38.5	28.8	124.1	208.0	2.4	0.1	64.3	18.6	13.7
		4.1	53.2	47.2	47.6	31.4	125.9	198.9	2.8	0.1	65.9	17.1	13.1
		12.3	48.9	52.2	50.5	25.1	127.7	220.5	3.1	0.0	69.8	15.8	11.0
		37.0	40.0	41.7	44.4	28.7	126.4	207.7	3.3	0.3	64.4	18.8	12.0
		111.1	27.8	30.3	41.7	24.5	126.6	217.7	3.7	0.2	61.4	18.4	16.1
		333.3	19.5	23.2	26.1	23.6	120.7	215.8	3.8	0.4	63.7	17.2	15.1
1000.0	14.8	17.4	22.2	20.7	118.4	209.5	3.1	0.2	61.0	18.9	15.8		
14	p-フェニレンジアミン(μM)	0.04	126.7	98.5	133.2	90.9	98.5	108.3	1.1	0.0	49.7	23.2	18.0
		0.12	128.5	92.1	144.6	93.4	96.3	100.6	1.1	0.0	51.7	20.0	18.1
		0.37	103.8	93.9	141.2	73.7	101.9	122.3	1.4	0.1	54.2	22.2	17.4
		1.11	87.8	86.7	110.3	64.0	101.9	131.0	1.3	0.0	56.0	20.7	17.0
		3.33	46.4	59.1	49.0	30.6	108.4	171.7	1.9	0.2	52.0	23.1	18.0
		10.00	16.5	11.2	13.5	13.2	109.1	207.5	2.6	1.4	43.6	24.3	24.0
	30.00	Tox											
15	ダウソルピジン(μM)	0.003	124.2	95.6	129.4	89.5	99.7	109.2	1.3	0.0	50.5	23.0	18.1
		0.008	122.0	96.5	128.5	86.7	100.9	113.0	1.5	0.1	49.8	22.1	20.7
		0.025	103.4	94.6	121.5	56.2	105.4	148.9	3.0	0.2	51.8	21.6	20.7
		0.074	74.5	77.3	67.5	23.5	133.2	246.3	6.9	0.4	30.5	22.5	33.4
		0.222	61.6	73.7	58.9	21.2	139.0	262.9	5.7	0.2	23.9	26.7	35.7
		0.667	Tox										
	2.000	Tox											
16	ドキシルピジン(μM)	0.003	109.6	93.9	109.0	77.8	104.6	122.6	1.7	0.0	58.6	18.7	16.0
		0.008	102.5	85.8	108.4	67.3	105.8	131.8	2.9	0.0	49.0	21.2	21.8
		0.025	73.4	72.4	77.0	26.1	126.1	223.8	6.3	0.3	37.6	20.8	30.8
		0.074	62.7	67.3	58.4	20.5	140.2	256.1	6.8	0.2	19.9	27.5	35.5
		0.222	43.1	56.7	35.3	18.7	131.4	258.4	2.9	0.4	30.1	27.9	32.3
		0.667	Tox										
	2.000	Tox											

各用量ウェル数:n=3

化合物の析出

- ・細胞生存率(ATP or NR or WST-8 or HCIA)が5~50%のときオレンジ色、0~5%のときピンク色で表示する。
- ・核面積のコントロール倍が125~150%のときオレンジ色、150%を超えるとときピンク色で表示する。
- ・細胞面積のコントロール倍が150~200%のときオレンジ色、200%を超えるとときピンク色で表示する。
- ・小核出現率コントロール倍が2倍以上のときピンク色で表示する。
- ・細胞真円率90%以上の細胞の出現率が10~20%のときオレンジ色、20%を超えるとときピンク色で表示する。
- ・コントロールの各細胞周期の割合(%)±5%以上のとき色をつけて表示する。

表 2-3 HCIA アッセイによる細胞毒性関連項目の測定および各種細胞毒性試験による細胞生存率の比較 (CHL 細胞)

CHL	化合物	用量	細胞生存率(%)				核の面積コントロール倍(%)	細胞面積コントロール倍(%)	小核出現率(コントロール倍)	細胞真円率90%以上の細胞の出現率(%)	細胞周期(%)		
			ATP assay	NRU assay	WST-8 assay	HCIA assay					G1/G0	S	G2/M
			μg/mL	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	
	コントロール	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	3.7	69.1	17.7	12.6
1	チオ尿素 (μg/mL)	31	101.4	135.8	102.6	121.3	97.6	95.0	0.9	4.9	69.0	17.8	12.8
		63	98.6	109.8	99.7	109.7	97.1	94.0	0.8	4.2	70.1	17.4	12.1
		125	100.7	92.3	96.7	103.3	96.4	94.5	0.6	3.9	68.4	18.2	13.1
		250	89.9	95.7	96.8	111.2	97.9	93.2	0.7	2.3	65.8	19.3	14.5
		500	80.9	102.6	98.4	99.5	96.5	88.6	0.7	3.3	66.0	19.6	13.8
		1000	75.1	88.6	99.1	89.0	97.5	88.5	0.7	1.3	64.9	18.7	15.9
		2000	64.1	70.9	91.2	73.1	102.9	91.7	1.0	1.9	58.9	22.6	18.0
2	ビペラジノ (μg/mL)	31	95.8	123.8	114.8	132.6	99.7	95.2	0.9	3.4	67.2	18.8	13.6
		63	93.6	93.5	108.4	151.5	100.2	92.4	1.0	3.6	67.7	18.7	13.4
		125	97.3	101.8	108.1	116.1	102.3	97.0	1.0	2.9	65.0	19.7	14.8
		250	69.9	75.5	78.2	109.6	102.3	90.6	2.1	2.1	66.7	19.1	13.6
		500	57.2	82.6	51.9	74.7	96.2	76.3	5.0	2.0	72.2	14.8	11.6
		1000	Tox										
		2000	Tox										
3	1-ニトロプロパン (μg/mL)	78	95.4	81.9	108.9	117.3	97.2	96.4	0.8	2.6	69.3	17.8	12.7
		156	95.7	104.8	107.1	108.4	97.2	97.7	0.8	1.7	68.9	17.8	12.9
		313	106.6	101.4	109.7	126.9	95.8	93.6	0.8	2.0	66.1	18.2	15.1
		625	104.2	116.3	106.9	116.6	97.4	93.6	0.8	4.0	64.0	20.0	15.4
		1250	105.0	100.2	111.2	127.3	96.0	89.1	0.8	9.3	63.3	19.9	16.2
		2500	114.1	130.1	107.4	130.2	93.3	86.5	0.5	10.6	62.0	19.7	17.4
		5000	120.1	94.5	100.5	82.4	97.2	96.7	0.7	-	63.0	18.8	17.4
4	1,3,5-トリオキサン (μg/mL)	39	100.1	80.8	108.3	97.6	97.6	99.6	1.0	3.6	71.3	17.4	10.9
		78	98.4	69.8	108.2	116.2	98.0	95.4	1.0	1.9	67.6	17.8	14.1
		156	96.3	76.8	112.3	123.7	96.8	94.8	0.9	3.9	66.6	19.4	13.6
		313	94.7	87.3	111.5	100.7	98.2	93.9	0.9	4.7	63.3	20.4	15.5
		625	97.5	79.4	113.9	123.3	98.8	93.0	0.7	3.8	64.7	18.5	16.0
		1250	99.8	89.7	103.8	103.1	98.2	95.0	0.8	3.6	64.7	19.4	15.4
		2500	98.1	75.8	102.7	79.1	101.7	100.7	0.8	4.5	62.9	19.9	16.5
	コントロール	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.5	69.3	18.1	12.1	
5	ジゴキシン (μg/mL)	31	95.6	115.8	93.9	86.8	98.8	104.5	0.8	0.2	68.3	19.1	12.3
		63	86.7	105.5	79.0	84.3	98.6	103.0	1.0	0.1	68.6	18.2	12.9
		125	61.1	85.3	46.4	58.0	91.8	100.7	0.5	0.3	68.2	18.3	13.4
		250	66.8	66.2	54.5	56.3	100.3	105.6	1.1	0.1	71.5	16.3	11.5
		500	25.5	7.6	24.7	19.7	95.2	108.7	0.9	0.7	73.3	15.5	10.4
		1000	59.9	46.8	55.1	55.5	101.8	111.6	1.1	0.4	69.0	17.5	12.8
		2000	57.4	36.4	29.2	42.8	96.7	109.0	1.2	0.6	68.1	14.8	15.6
6	アコニチン (μg/mL)	16	101.3	72.7	90.5	121.9	87.1	86.2	0.9	0.1	68.7	17.8	12.8
		31	101.4	56.6	73.4	112.3	77.9	76.6	0.8	0.2	68.9	17.3	13.2
		63	90.8	32.4	48.3	92.2	73.7	73.1	0.7	0.5	71.6	15.3	12.7
		125	74.0	18.8	32.8	70.9	72.6	67.3	0.7	1.1	74.8	12.9	11.4
		250	58.8	22.6	19.1	43.2	69.4	68.4	0.7	1.7	80.3	10.0	9.1
		500	20.5	5.8	4.5	27.4	67.4	67.2	0.6	3.4	82.4	9.0	8.0
		1000	Tox										
7	クマリン (μg/mL)	16	92.6	66.2	88.9	115.5	98.3	90.3	1.1	0.1	69.8	16.8	13.1
		31	94.3	61.9	85.4	97.9	98.8	97.9	1.1	0.1	68.0	17.2	14.4
		63	85.0	60.0	72.8	94.7	100.5	104.4	1.1	0.1	67.2	18.7	13.8
		125	75.8	55.7	64.6	80.8	103.0	111.8	1.2	0.1	65.6	18.6	15.0
		250	57.7	38.9	45.7	50.0	104.9	122.8	1.4	0.1	64.0	20.1	14.8
		500	34.5	32.0	23.0	41.7	98.9	116.9	2.3	0.1	55.8	19.4	23.3
		1000	13.2	10.8	8.3	10.1	87.5	96.8	0.7	1.9	69.1	19.0	11.2
8	24-ジアミノ-6-フェニル- ス-トリアジン (μg/mL)	8	94.3	66.8	92.9	91.0	101.2	103.7	1.2	0.4	68.3	18.5	12.8
		16	94.3	61.8	95.6	92.4	99.0	103.4	1.2	0.2	66.0	19.0	14.5
		31	92.3	52.8	79.3	81.7	99.3	110.5	1.4	0.2	66.1	18.5	14.7
		63	88.4	59.0	74.9	83.9	100.6	109.1	1.9	0.1	65.7	17.6	15.8
		125	64.5	32.0	51.0	49.9	106.6	126.1	2.6	0.2	59.4	20.6	17.8
		250	36.7	20.1	23.5	35.3	98.1	114.5	2.8	0.9	60.1	22.7	16.0
		500	Tox										

各用量ウェル数: n=3

化合物の析出

細胞生存率(ATP, NRU, WST-8 or HCIA)が5~50%のときオレンジ色、0~5%のときピンク色で表示する。

核面積のコントロール倍が125~150%のときオレンジ色、150%を超えるとピンク色で表示する。

細胞面積のコントロール倍が150~200%のときオレンジ色、200%を超えるとピンク色で表示する。

小核出現率コントロール倍が2倍以上のときピンク色で表示する。

細胞真円率90%以上の細胞の出現率が10~20%のときオレンジ色、20%を超えるとピンク色で表示する。

コントロールの各細胞周期の割合(%)が5%以上のとき色をつけて表示する。

表 2-4 HCIA アッセイによる細胞毒性関連項目の測定および各種細胞毒性試験による細胞生存率の比較 (CHL 細胞)

CHL	化合物	用量	細胞生存率(%)				核の面積コントロール倍(%)	細胞面積コントロール倍(%)	小核出現率(コントロール倍)	細胞真円率90%以上の細胞の出現率(%)	細胞周期(%)		
		μ g/mL	ATP assay	NRU assay	WST-8 assay	HCIA assay					G1/G0	S	G2/M
		μ M	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean	Mean			
9	イミダクロプリド (μ g/mL)	0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.3	76.5	15.6	7.5
		31	104.0	103.6	98.5	92.8	93.3	93.9	0.6	0.2	65.4	25.1	8.3
		63	98.7	148.0	93.2	87.5	93.8	94.7	0.7	0.2	72.8	20.7	6.0
		125	96.1	108.7	84.6	83.0	96.2	94.0	0.8	0.8	82.0	10.1	2.9
		250	86.5	85.0	80.1	59.7	93.4	93.3	0.9	1.2	84.6	10.6	3.1
		500	78.1	81.6	71.9	64.2	95.6	93.2	0.8	4.5	87.3	8.3	3.8
		1000	63.2	56.0	62.5	48.2	95.7	96.7	0.7	8.2	86.2	9.3	4.0
10	アセタミプリド (μ g/mL)	2000	51.6	42.3	60.7	38.6	93.3	97.8	0.7	5.2	83.8	11.1	5.1
		31	109.3	123.1	95.8	89.1	94.9	95.2	0.8	0.2	74.4	16.8	8.5
		63	101.2	136.3	99.0	82.3	96.8	98.7	0.9	0.1	75.5	14.5	9.0
		125	106.1	145.4	103.5	79.5	99.0	99.4	0.8	0.3	66.2	18.5	13.5
		250	98.6	111.1	93.3	53.4	104.2	99.6	1.0	0.6	56.8	26.0	16.0
		500	87.2	72.1	87.4	59.6	103.4	104.2	0.9	2.0	59.3	24.8	15.3
		1000	50.4	50.7	48.3	34.3	97.7	97.5	0.6	1.8	67.0	18.1	14.1
11	アセトアミノフェン (μ M)	2000	26.9	19.5	26.9	18.7	91.3	85.3	1.1	23.2	92.2	5.5	1.8
		1.4	68.1	135.3	97.4	66.9	103.1	117.0	1.4	0.2	74.9	16.5	8.4
		4.1	69.1	123.2	82.7	51.7	110.0	132.4	2.6	0.2	75.7	16.0	8.0
		12.3	93.3	139.9	70.2	38.7	132.6	158.5	3.2	0.2	73.9	16.4	9.4
		37.0	82.4	92.5	55.1	23.2	148.3	174.1	2.8	0.7	60.0	20.4	17.6
		111.1	65.7	62.0	45.3	18.4	160.3	190.5	1.3	0.2	17.8	30.9	49.8
		333.3	54.0	38.1	39.6	13.6	156.5	193.6	0.7	14.9	55.6	29.6	11.8
12	カデコール (μ M)	1000.0	26.1	14.5	18.4	6.7	89.1	116.7	0.0	12.3	81.9	12.1	4.2
		0.14	123.6	128.6	102.1	63.4	98.8	109.4	1.0	0.1	77.3	15.1	7.3
		0.41	114.4	141.4	86.8	54.1	99.7	117.3	2.4	0.1	72.4	16.6	10.7
		1.23	98.7	123.1	77.6	34.4	122.8	147.2	3.2	0.1	69.3	18.5	11.7
		3.70	80.0	103.5	51.2	21.6	142.0	170.6	2.8	0.5	49.6	22.5	24.9
		11.11	49.6	69.4	34.7	13.2	145.1	173.1	1.4	0.8	19.7	32.1	47.2
		33.33	16.9	22.2	10.5	6.1	96.2	76.4	0.6	9.4	40.8	35.8	18.4
13	5-フルオウラシル (μ M)	100.00	Tox										
		0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	1.0	0.3	76.5	15.6	7.5
		1.4	83.8	72.4	53.3	43.0	132.0	148.4	3.5	0.2	65.4	25.1	8.3
		4.1	79.6	73.7	49.3	37.4	143.5	165.1	2.5	0.2	72.8	20.7	6.0
		12.3	75.6	72.1	41.5	36.2	140.3	170.5	1.7	0.8	82.0	10.1	2.9
		37.0	57.9	71.3	29.1	25.7	143.5	141.4	1.4	1.2	84.6	10.6	3.1
		111.1	25.1	29.4	11.4	20.6	124.7	102.4	0.6	4.5	87.3	8.3	3.8
14	p-フェニレンジアミン (μ M)	333.3	18.5	23.0	8.4	22.0	114.6	90.6	0.4	8.2	86.2	9.3	4.0
		1000.0	15.2	23.2	8.6	20.1	106.6	92.7	0.5	5.2	83.8	11.1	5.1
		0.04	112.4	86.3	95.9	104.9	101.2	101.6	1.2	0.2	74.4	16.8	8.5
		0.12	112.3	89.2	87.5	86.3	110.1	117.6	3.1	0.1	75.5	14.5	9.0
		0.37	100.3	69.4	69.9	63.8	126.0	142.1	5.0	0.3	66.2	18.5	13.5
		1.11	90.5	53.3	60.3	42.2	151.4	175.5	4.8	0.6	56.8	26.0	16.0
		3.33	73.7	37.7	41.9	30.8	163.4	181.4	2.2	2.0	59.3	24.8	15.3
15	ダウノルビシン (μ M)	10.00	56.9	26.0	35.0	29.7	157.4	168.2	1.6	1.8	67.0	18.1	14.1
		30.00	11.1	16.2	6.1	4.0	90.2	79.2	-	23.2	92.2	5.5	1.8
		0.003	114.2	100.3	94.1	117.7	100.5	99.5	1.2	0.2	74.9	16.5	8.4
		0.008	118.7	88.1	97.4	119.5	100.6	96.5	1.2	0.2	75.7	16.0	8.0
		0.025	116.2	85.1	97.3	114.9	103.9	102.0	6.5	0.2	73.9	16.4	9.4
		0.074	106.9	62.4	68.4	70.2	123.0	125.7	15.9	0.7	60.0	20.4	17.6
		0.222	85.7	45.9	55.9	31.7	179.4	226.8	2.3	0.2	17.8	30.9	49.8
16	ドキシルビシン (μ M)	0.667	Tox										
		2.000	Tox										
		0.003	112.1	74.3	93.7	95.8	101.3	104.6	2.0	0.1	77.3	15.1	7.3
		0.008	112.7	74.9	93.5	101.2	103.8	104.9	4.1	0.1	72.4	16.6	10.7
		0.025	114.5	67.8	88.9	95.1	107.3	109.5	10.3	0.1	69.3	18.5	11.7
		0.074	90.2	60.4	59.0	59.9	134.3	149.4	14.4	0.5	49.6	22.5	24.9
		0.222	81.3	40.0	50.3	27.2	178.9	214.7	1.6	0.8	19.7	32.1	47.2
17	ドキシルビシン (μ M)	0.667	12.5	1.5	6.7	8.1	131.8	112.2	3.9	9.4	40.8	35.8	18.4
		2.000	Tox										

各用量ウェル数: n=3

化合物の析出

細胞生存率(ATP, NRU, WST-8 or HCIA)が5~50%のときオレンジ色、0~5%のときピンク色で表示する。

核面積のコントロール倍が125~150%のときオレンジ色、150%を超えるとピンク色で表示する。

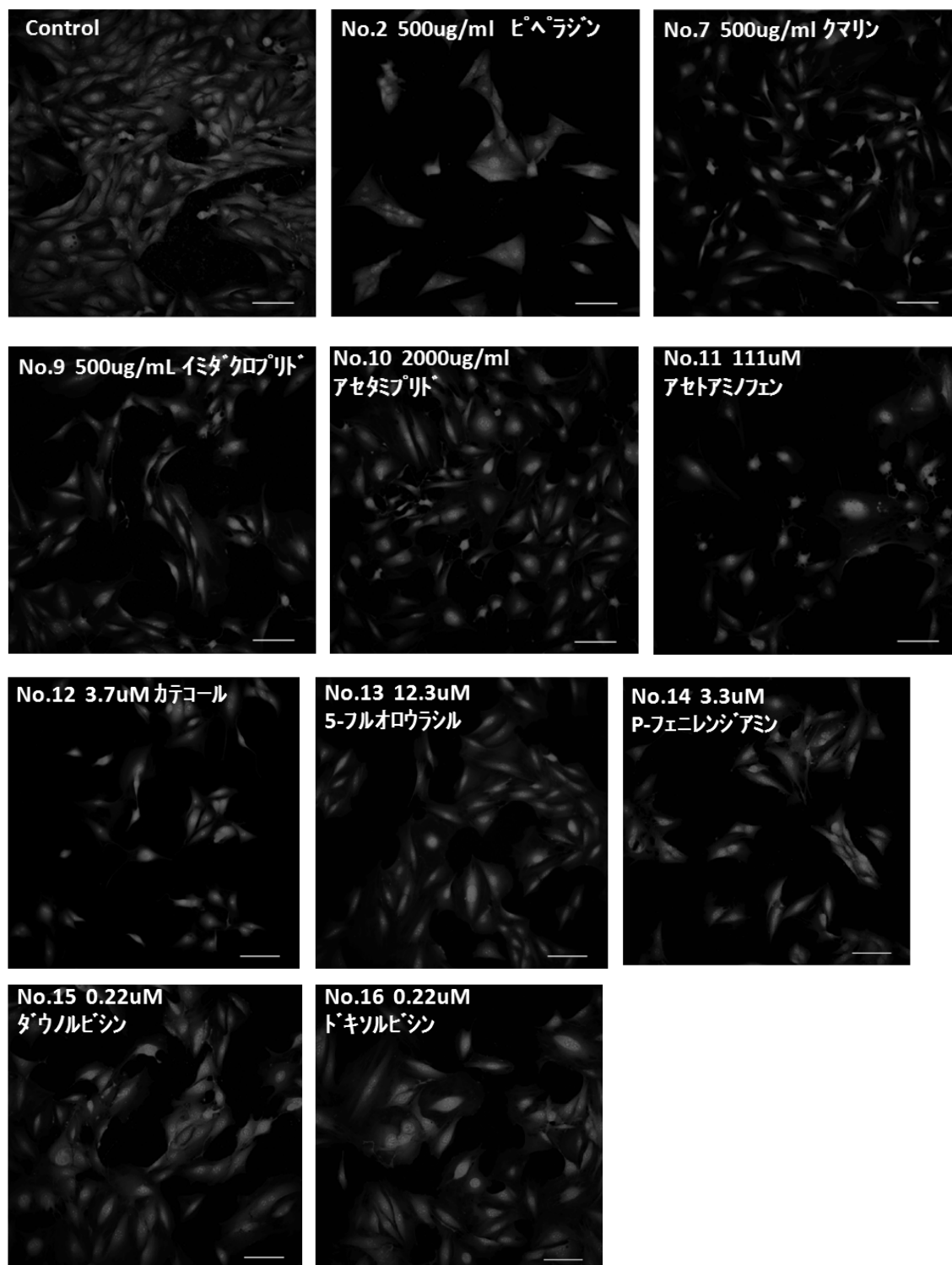
細胞面積のコントロール倍が150~200%のときオレンジ色、200%を超えるとピンク色で表示する。

小核出現率コントロール倍が2倍以上のときピンク色で表示する。

細胞真円率90%以上の細胞の出現率が10~20%のときオレンジ色、20%を超えるとピンク色で表示する。

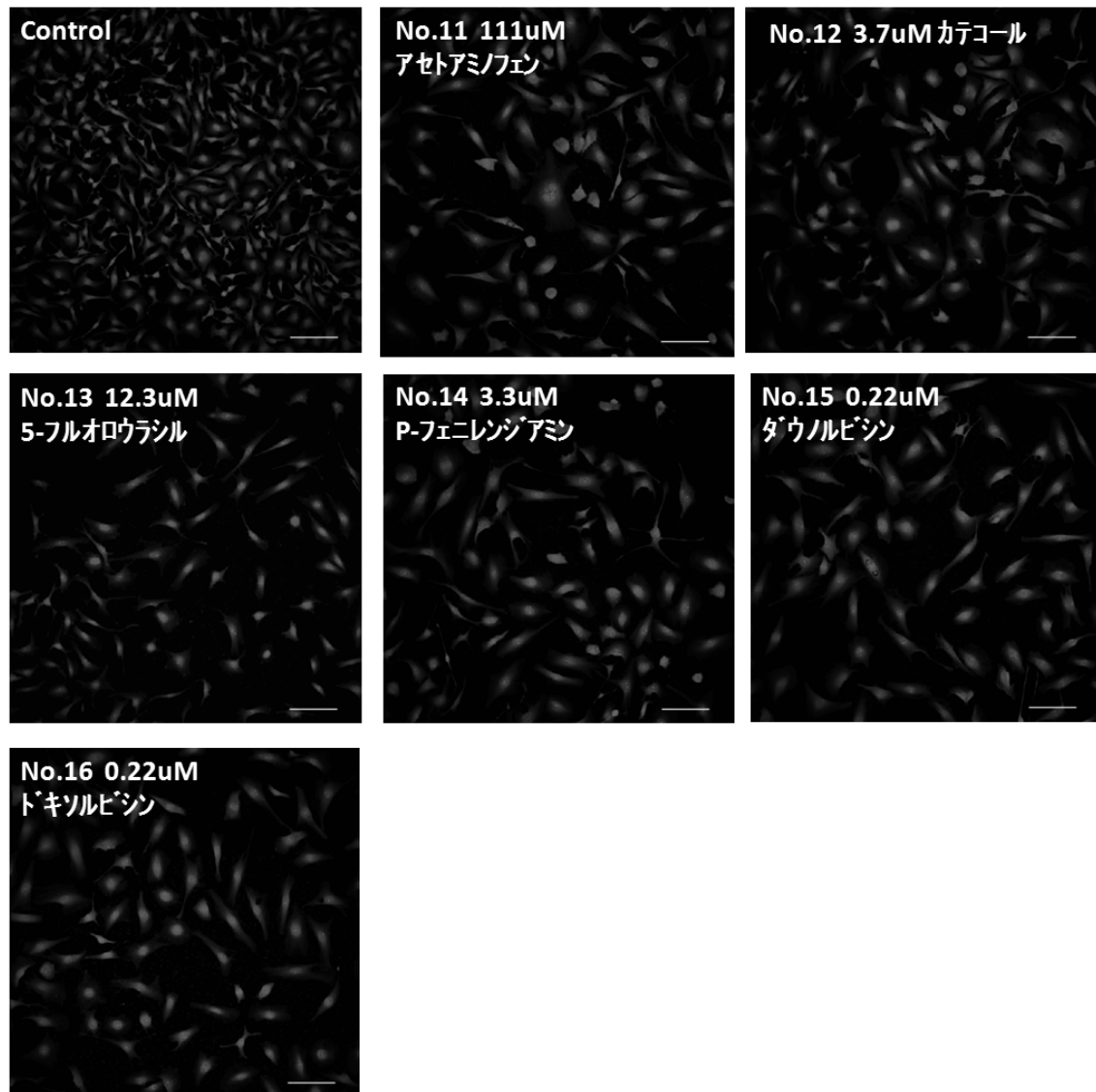
コントロールの各細胞周期の割合(%)が5%以上のとき色をつけて表示する。

図 2-1 HClA アッセイの画像解析で細胞肥大が疑われた化合物で処理した 3T3 細胞の蛍光写真



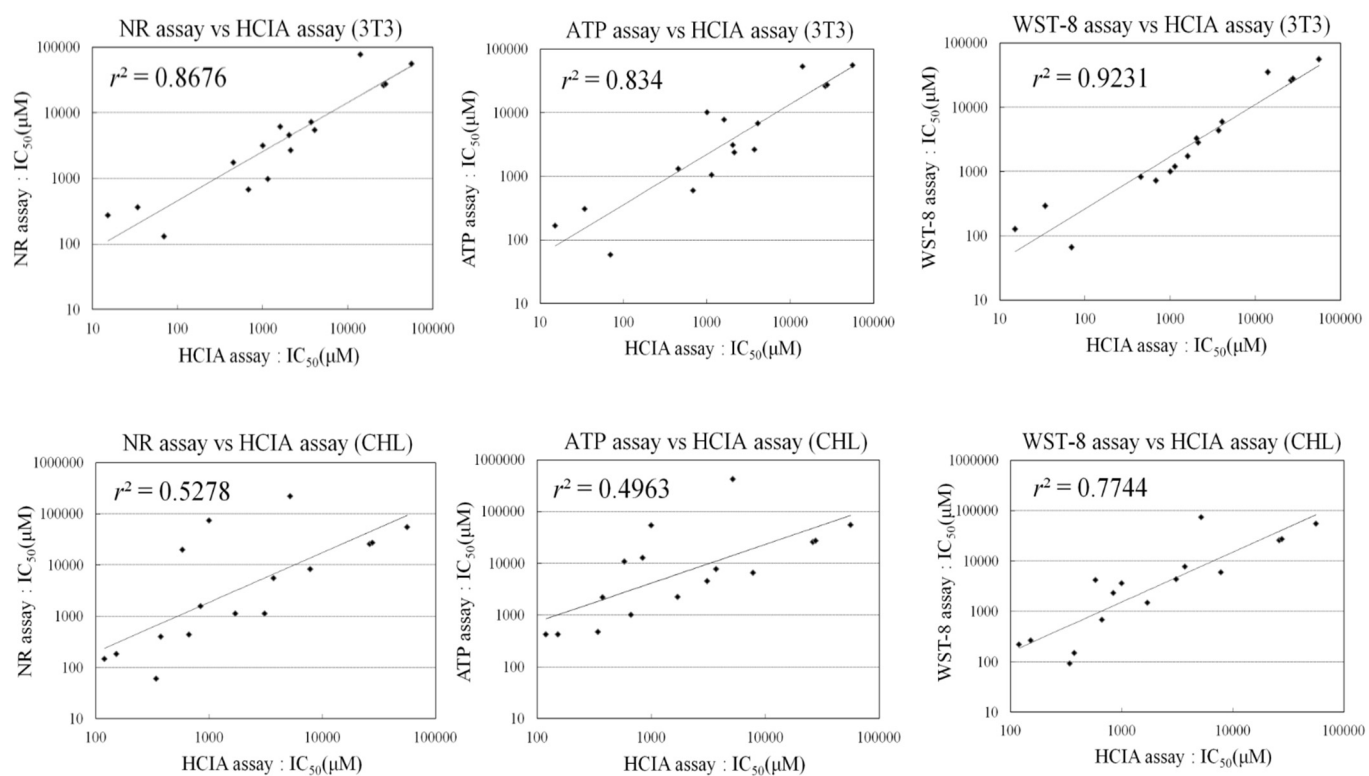
核：ヘキスト 33342 (Ex/Em=350nm/460nm) 細胞質：セルマスク (Ex/Em=588nm/612nm)

図 2-2 HCIA アッセイの画像解析で細胞肥大が疑われた化合物で処理した CHL 細胞の蛍光写真



核：ヘキスト 33342 (Ex/Em=350nm/460nm) 細胞質：セルマスキ (Ex/Em=588nm/612nm)

図 3 各細胞毒性試験 (NRU, ATP, WST-8) と HCIA アッセイの IC_{50} 値の相関性



5. 考察

NRU アッセイは、OECD TG129 に収載されている細胞毒性試験であるが、比較的古い細胞毒性試験法であり、比較的作業量が多く、間接的に細胞数を求める手法であるため細胞周期に影響を与える化合物では過小評価される可能性がある。そこで、最近汎用される ATP アッセイおよび WST-8 アッセイと併せて、96well プレートにおいて細胞数を直接カウントすることができる HCIA アッセイを用い、16 化合物について 4 種の細胞毒性試験を比較検証した。本研究に用いた化合物は、JACVAM 急性毒性試験資料編纂委員会が工業用および試薬を中心に選択した No.1~10 の 10 化合物に、CHL 細胞を肥大させることが知られている No.11~16 の 6 化合物を追加した²⁶⁾。CHL 細胞において、No.11 から No.16 の化合物の NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイの細胞生存率は、HCIA アッセイの細胞生存率より高かった。この理由は、これらの化合物が、細胞周期の中で ATP 量が一番多い G2/M 期²⁷⁾や WST-8 アッセイに必要な NADH 量が一番多い S 期²⁸⁾で、細胞周期を特異的に停止するため、両アッセイの値が高くなるものと考えられる。培養細胞は M 期に向けて、細胞の大きさだけでなく細胞機能を維持するために必要なものすべてが 2 倍になる。そのため、ATP、NADH を指標とした細胞生存率の評価は細胞周期による変動があり、その影響は細胞倍加時間の短い細胞において強く受ける。NRU アッセイについても、ニュートラルレッドが蓄積されるライソソームが細胞分裂の前の G2/M 期に多くなるため、NR の取り込み量が増加すると考えられる。

3T3 細胞では、ピペラジン (No. 2)、クマリン (No. 7)、イミダクロプリド (No. 9) およびアセタミプリド (No. 10) の高用量で細胞肥大が誘導されたが、NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイの細胞生存率は HCIA アッセイの細胞生存率と大きな差はみられなかった。

このケースでは、細胞面積は増加しているが、核面積の増加が明確に認められなかったため細胞面積の増加は被験物質曝露による可能性は低く、したがって細胞周期への影響は無かったと考えられる。画像解析装置は、自動で個々の細胞を認識するため、3T3 細胞のように細胞が敷石状に密集して増殖する細胞を個別に識別する精度は高くない。本研究では、目視で画像を確認して個々の細胞が識別されているか否かを確認しているが、細胞の形態が均一ではないためウエル全体としては個別に細胞を認識できていない可能性もある。一方、No.11~16 では、CHL 細胞と同様に核および細胞の面積が増加しているため、3T3 細胞においても CHL 細胞と同じ理由で、NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイの細胞生存率は、HCIA アッセイの細胞生存率より高かったものと思われる。

3T3 細胞は CHL 細胞に比較して、HCIA アッセイによる細胞生存率と他のアッセイによる細胞生存率の相関性は高かった。その理由として、3T3 細胞は CHL 細胞より、細胞周期の回転が遅いために、CHL 細胞ほど十分に G2/M 期や S 期で細胞周期が停止しておらず、細胞生存率とののかい離が出にくくなったものと考えられる。

本実験で実施した NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 の中では、WST-8 が HCIA の IC₅₀ 値と一番相関性が高かった。これは、No.11~16 の化合物が ATP 量やライソソームの数が増大になる G2/M 期にアレストを起こす化合物が多く、NADH 量が増大になる S 期で細胞周期をアレストする化合物が少なかったため¹⁰⁾、WST-8 アッセイは ATP アッセイや NRU アッセイより影響を受けにくかったと考えられる。また、本研究では、CHL 細胞より 3T3 細胞の方が NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイの細胞生存率と HCIA アッセイの細胞生存率が高い相関性を示しているが、これは 3T3 細胞の方が、CHL 細胞よりも細胞周期の回転が遅いため、No.11~16 の化合物のような細胞周期を特異的にアレストする化合物の影響が CHL 細胞よりもでにくいため、NRU アッセイ、ATP アッセイおよび WST-8 アッセイと HCIA アッセイの生存率の乖離が小さかったと考えられる。笠原らは、以前、No.11~16 の化合物を 3T3 細胞に 24 時間曝露したとき、細胞肥大はほとんど誘導されなかったことを確認したが（データ示さず）、本研究のように 48 時間曝露させたことにより細胞周期の停止が強く生じたため、細胞肥大が誘導されたと考えられる。

本研究では、細胞周期に特異的な作用を有しない化合物では、細胞毒性測定法による違いは認められないが、細胞周期を特異的に停止するような化合物においては生理活性物質を指標とした細胞毒性試験は実際の細胞数を反映しておらず、IC₅₀ 値が高めに算出される可能性があることを示した。このようなケースでは、IC₅₀ 値から算出される LD₅₀ は過小評価される可能性があるため、注意が必要である。一方、HCIA アッセイは直接細胞数をカウントすることができるだけでなく、細胞や核の面積のように細胞毒性のメカニズムを説明できる周辺データも同時に取得することができるため、周辺情報が乏しい新規の化合物の評価において、細胞周期に影響する作用の有無にかかわらず評価可能である。また、大量のデータを自動的に取得することが可能であるため、ハイスループット化にも対応できる。したがって、本試験法は細胞毒性試験を用いた急性毒性試験代替法の予測率向上に寄与するとともに、迅速化と高効率化が期待される。

6. 参考文献

- 1) 田原春菜、山本裕介、吉沢広江、松田俊、藤田正晴、勝岡尉浩、笠原利彦 (2016) 画像解析装置を用いた迅速-画像解析細胞毒性試験の有用性についての検討～既存の細胞毒性試験の比較、第 43 回日本毒性学会学術年会
- 2) 毒劇物指定 : <http://www.nihs.go.jp/law/dokugeki/kijun.pdf>
- 3) 務台 衛：臓器毒性・毒性試験、新版 トキシコロジー、日本トキシコロジー学会教育委員会編集、pp.150-153 (2009)
- 4) OECD, OECD test guideline 401; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity (1987)
- 5) OECD, OECD test guideline 420; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure (2002)
- 6) OECD, OECD test guideline 423; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure (2002)
- 7) OECD, OECD test guideline 425; OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP) (2008)
- 8) 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.
- 9) Ekwall B. 1983. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. Ann New York Acad Sci 407:64-77.
- 10) 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.
- 11) Schrage A, Hempel K, Schulz M, Kolle SN, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. Refinement and reduction of acute oral toxicity testing: a critical review of the use of cytotoxicity data, Altern Lab Anim. 2011 39(3):273-95.
- 12) OECD Guidance document 129 on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systematic toxicity tests (2010)
- 13) 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
- 14) 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].
- 15) 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]
 - 16) JaCVAM: Available at: <http://jacvam.jp/> (2015)
 - 17) Abud, A.P., Zych, J., Reus, T.L., Kuligovski, C., de Moraes, E., Dallagiovanna, B., de Aguiar, A.M. (2015) The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. *Regulatory toxicology and pharmacology*. 73, 992-998.
 - 18) Kuzmits, R., Aiginger, P., Müller, M.M., Steurer, G. and Linkesch, W. (1986): Assessment of the sensitivity of leukaemic cells to cytotoxic drugs by bioluminescence measurement of ATP in cultured cells. *Clinical Science (London)*, 71, 81-88.
 - 19) Elisia, I., Popovich, D.G., Hu, C., Kitts, D.D. (2008). Evaluation of viability assays for anthocyanins in cultured cells. *Phytochemical Analysis*. 19, 479-486.
 - 20) Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K. (2012) Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 90, 160-166.
 - 21) Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. (2004). Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in Vitro*. 18, 703-710.
 - 22) Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H.J., Lyng, F. M. (2007) In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicology. in Vitro*. 21, 438-448.
 - 23) Bopp, S.K. & Lettieri, T. (2008). Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology*, 8, 1-11.
 - 24) Zwolak, I. (2015) Increased cytotoxicity of vanadium to CHO-K1 cells in the presence of inorganic selenium. *Environmental Contamination and Toxicology*, 95, 593-598.
 - 25) Chan, G.K., Kleinheinz, T.L., Peterson, D. and Moffat, J.G. (2013): A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. *PLoS One*, 8, e63583.
 - 26) Tahara, H., Yamamoto, Y., Matsuda, S., Yoshizawa, H., Fujita, M., Hioki, T, Kasahara, T (2017) Chemically induced strong cellular hypertrophy often reduces the accuracy of cytotoxicity measurements obtained using the ATP assay. *Journal of Toxicological Sciences*, 42, xxx-xxx. (publishing)

- 27) Marcussen, M.& Larsen, P.J. (1996) Cell cycle-dependent regulation of cellular ATP concentration, and depolymerization of the interphase microtubular network induced by elevated cellular ATP concentration in whole fibroblasts. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 35, 94-99.
- 28) Yu, F. X, Dai, R.P., Goh, S. R., Zheng, L., Luo, Y.(2009) Logic of a mammalian metabolic cycle: an oscillated NAD⁺/NADH redox signaling regulates coordinated histone expression and S-phase progression. *Cell Cycle*. 8, 773-779.

