

実験技術講座

安全性試験編 (第3回)

農薬登録に必要な安全性試験 — *in vitro* 試験 —

水橋 福太郎*

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

(平成 23 年 5 月 10 日受理)

Keywords: pesticides, registration, toxicology study, *in vitro*, alternative study.

はじめに

農薬登録に、使用時安全、残留農薬の安全性および環境生態影響の観点から種々の安全性試験データが必要とされ、その多くが実験動物を用いた試験で得られる¹⁾。しかし、近年の「動物愛護」・「動物福祉」の考え方を受け、*in vivo* 試験の短所を補うべく種々の代替法が考案されており、実験動物に替わり、細胞や組織あるいは細菌といった動物個体以外を対象とした試験系 (*in vitro* 試験) が開発され、農薬の安全性評価にも用いられている^{2,3)}。しかし、実際に農薬の安全性評価に用いられているのは、主に遺伝毒性を検出する系であり、その簡便性から多くのデータが蓄積され、有効なスクリーニング試験法として多大な貢献をするとともに、現在注目されている構造活性相関解析の大きな礎を築いてきた。

本講座では、農薬登録に用いられる主な *in vitro* 遺伝毒性試験の概要と基本的な試験の進め方について紹介し、安評センターが現在注目している代替法についても紹介したい。

1. 無菌操作の概要

代替法は細胞、組織あるいは細菌を対象とするものが多く、その培養には栄養の豊富な培地 (培養液) が用いられるため、つねに雑菌汚染の危険性がつきまとい、実験には無菌操作を必要とする。無菌操作は教育や訓練によって身に付くものであるが、施設全体の空気を清浄化することで、雑菌汚染の危険性は格段に低下する。安評センターでは細胞培養実験の実施区域に手術室や医薬品の製造所と同レベ

ルのクリーンルームを設置している。吸気側に装着した HEPA フィルターがクリーンルーム機能を維持しており、1 立方フィート当たりの粒径 0.5 μm 以上の塵埃レベルで表わされる空気清浄度は 1000 個程度に保たれており、クラス 1000 を満足している。したがって、この区域へは無塵衣に着替えた後、エアシャワーを浴びて入室し、物品の搬入は、70% エタノールの噴霧、紫外線照射、オートクレーブあるいは乾熱滅菌器による滅菌の後パスボックスを通して搬入する。さらに、室内にはクリーンベンチ 3 台を配し、さらに厳重な無菌操作を可能にしている。

一方、細菌を扱う Ames 試験実施区域は火炎滅菌で雑菌の混入を防いでいる。また、化学物質の人体への影響を防止するため特殊なフィルターを装着したダクトレスフード「カプトエアー」を配している。

細胞培養試験および細菌試験についても使用する試験管、プレート、ピペットなどの器具類は、基本的にいずれも滅菌済みのディスposable製品を使用している。

2. 細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験)

当該試験は、検体の遺伝子突然変異誘発性の有無を検索するため実施される。当該試験法は、カリフォルニア大学 B. N. Ames 博士によって開発されたもので、ヒスチジン要求性株のネズミチフス菌およびトリプトファン要求性株の大腸菌など、アミノ酸代謝に関わる遺伝子に突然変異を起こさせた細菌を用いる。化学物質の処理などにより遺伝子に突然変異が生じ、これらの遺伝子が正常に戻ると、アミノ酸が不足した培地上でもコロニーを形成することが可能になるという原理に基づく⁴⁾。当該試験は、DNA の構成塩基の置換 (塩基対置換変異)、付加や欠失 (フレームシフト変異) などの点突然変異を主に調べる。

* 〒 437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

E-mail: mizuhasi@anpyo.or.jp

© Pesticide Science Society of Japan

2.1. 供試菌株

以下の5組の菌株からそれぞれ1株を選択し、5菌株を用いる。安評センターでは下線を付した5菌株を用いている。

- ①ネズミチフス菌 (*Salmonella Typhimurium*) TA100
塩基対置換型
- ②ネズミチフス菌 TA98
フレームシフト型
- ③ネズミチフス菌 TA1535
塩基対置換型
- ④ネズミチフス菌 TA1537, TA97 または TA97a
フレームシフト型
- ⑤大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA, WP2uvrA, pKM101
または TA102
塩基対置換型

これらの菌には高感度に遺伝毒性物質が検出できるような工夫があり、それらが継代あるいは保存期間中に失われることがあるため、定期的に状態の良い菌を選抜し直し、その形質 [アミノ酸要求性, 膜変異 *rfa* 特性, 薬剤耐性因子, 紫外線感受性, 増殖性, 薬剤反応性 (陰性および陽性対照)] をチェックしている。

2.2. 用量設定

通常 5 mg/プレート を最高用量に適切な間隔 (通常公比 2 あるいは 3) で 5 段階以上の解析できる用量が得られるよう用量段階を設定する。なお、菌の生育阻害を示す場合はその用量を、また、難溶性物質で検体の析出が認められる場合にはその用量を最高用量としても良い。

2.3. 代謝活性化系

In vitro 試験系に動物の肝臓における代謝過程を再現すべく、ラット S9 (薬物代謝酵素誘導剤で処理したラットの肝臓を 9000×g で遠心分離した上清) に補酵素等を添加した代謝活性化系 (S9 mix) を加えた試験も実施する。安評センターでは市販の S9 mix を購入して使用している。その組成を表 1 に示す。

2.4. 媒体の選択

検体の媒体には、検体や S9 mix と反応せず、試験菌株に毒性がないものを用いる。通常、水溶性の検体には蒸留水を、難水溶性の検体にはジメチルスルホキシド (DMSO) あるいはアセトンを用いる。事前に溶解性を確認する。また、水と反応し易い検体では DMSO などをモレキュラーシーブズで十分脱水する。

2.5. 対照

媒体を用いる陰性対照および適切な既知変異原物質による陽性対照を試験毎に設ける。安評センターでは、労働省安全衛生部化学物質調査課が編集した「安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP」⁴⁾ に準じて表 2 に示す陽性対照物質および用量を採用している。

表 1 S9 mix の組成

1. S9 調製条件		
使用動物	ラット: Sprague-Dawley 系	
性/週齢	雄/7 週齢	
体重	約 200 g	
臓器	肝臓	
誘導物質	Phenobarbital (PB) および 5,6-Benzoflavone (BF)	
投与量および	PB: 30 mg/kg	1 回 (1 日目)
投与回数	60 mg/kg	3 回 (2~4 日目)
	BF: 80 mg/kg	1 回 (3 日目)
投与方法	腹腔内投与	

2. S9 mix の組成

S9 mix 1 mL 中の量を以下に示す。

試薬	Ames 試験用	染色体異常試験用
S9	0.1 ml	0.3 ml
MgCl ₂	8 μmol	5 μmol
KCl	33 μmol	33 μmol
G-6-P	5 μmol	5 μmol
NADPH	4 μmol	
NADH	4 μmol	
NADP		4 μmol
Na-リン酸緩衝液 (pH 7.4)	100 μmol	
HEPES 緩衝液 (pH 7.2)		4 μmol

2.6. 試験方法

方法には、主にプレート法およびプレインキュベーション法の二つがあるが、感度の優れている後者を採用している。プレインキュベーション試験法の概要を図 1 に示す。通常、プレートは 1 用量当たり 2 枚以上を使用する。試験結果の一例を図 2 に示す。復帰変異コロニー数の計測には、コロニーカウンターを用いているが、強い菌の生育阻害や検体の析出により自動計測が不可能な場合は肉眼で観察する。試験は用量設定試験および本試験の少なくとも 2 回は繰り返し実施する。結果の判定は、検体処理群の復帰変異コロニー数が陰性対照群の 2 倍を超える増加を示し、かつ再現性あるいは用量依存性が明確となった場合に陽性とする⁴⁾。明確に陽性あるいは陰性と判定できない場合には確認試験を行う。なお、自然復帰突然変異コロニー数の低い (陰性対照のコロニー数が少ない) TA1535 や TA1537 株では、時折検体処理群で用量依存性のない復帰変異コロニー数の増加が認められることがあるが、このような場合には背景データを利用して評価することも有効である。

表 2 Ames 試験の陽性対照物質

《代謝活性化系非存在下：-S9 mix》			
菌株	陽性対照物質	用量 (μg/プレート)	陽性対照物質溶液濃度 (μg/mL)
TA100	AF-2	0.01	0.1
TA98	AF-2	0.1	1.0
TA1535	NaN ₃	0.5	5.0
TA1537	9-AA	80	800
WP2 _{uvrA}	AF-2	0.01	0.1
《代謝活性化系存在下：+S9 mix》			
菌株	陽性対照物質	用量 (μg/プレート)	陽性対照物質溶液濃度 (μg/mL)
TA100	2-AA	1.0	10
TA98	2-AA	0.5	5.0
TA1535	2-AA	2.0	20
TA1537	2-AA	2.0	20
WP2 _{uvrA}	2-AA	10	100

AF-2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide, NaN₃: sodium azide, 9-AA: 9-aminoacridine hydrochloride; 2-AA: 2-aminoanthracene.

3. 哺乳類細胞を用いる染色体異常試験

染色体異常は、染色体に現れる形態や数の変化の総称で、形態変化を構造異常、数の変化を数的異常と呼ぶ。ある種の化学物質は DNA 傷害性を有し、DNA 二重鎖に切断が生じ、修復不可能であった場合や誤った修復が行われた場合に構造異常が生ずる。また、colchicine のような有糸分裂阻害剤では数的異常が誘発することが良く知られている⁵⁾。当該試験は、培養細胞や生体内の細胞を用いて染色体の形態変化や数的変化を調べる系である。

3.1. 供試細胞

チャイニーズ・ハムスターの線維芽細胞株 (CHL, CHO, V79 など) やヒトのリンパ球がよく用いられる。特に前者は染色体数が少なく、染色体のサイズが大きいため、観察が容易である。一般に日本では CHL 細胞が用いられている。これらの細胞は、一度に大量に培養し、小分けした後凍結保存して用いる。凍結ロットごとに細胞の形質 [染色体数のモード、倍加時間、マイコプラズマ汚染、薬物反応性 (陰性および陽性対照)] をチェックしている。

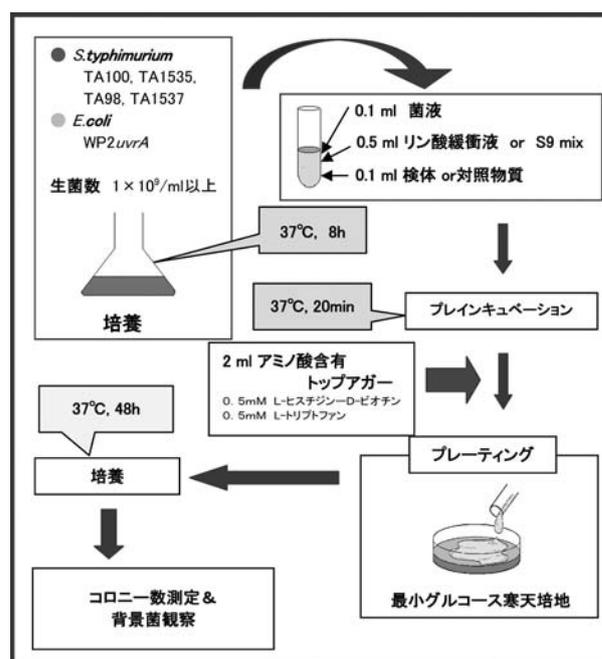


図 1 細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) 法概要

3.2. 濃度設定

通常 5 mg/mL あるいは 10 mM のいずれか低い方を最高濃度に用量設定試験 (細胞増殖抑制試験) を行い、その結果に基づき適切な間隔 (通常公比 2) で少なくとも 3 段階の分析可能な濃度が得られるように濃度を設定する。用量設定試験において細胞増殖抑制が認められた場合は、細胞増殖を 50% 以上抑制する濃度を最高濃度とする。用量設定試験において細胞増殖抑制が認められなかった場合は、5 mg/mL あるいは 10 mM のいずれか低い方を最高濃度とする。また、細胞増殖抑制が認められず、難水溶性のため検体の析出が認められる場合にはその濃度を最高濃度としても良い。なお、染色体異常試験では、細胞増殖抑制が認められる濃度のみで陽性結果が見られるケースが少なくなく、あまりにも疑陽性が多いため現在 ICH では最高濃度の引き下げを検討している⁶⁾。

3.3. 媒体の選択

検体の媒体の選択基準は Ames 試験と同じであるが、細

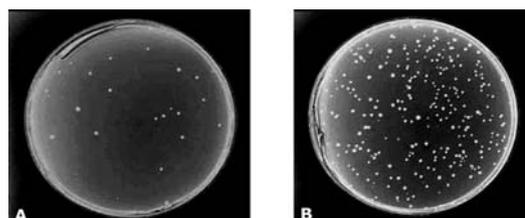


図 2 TA98 株の培養プレート一例

A: 陰性対照, B: 陽性対照.

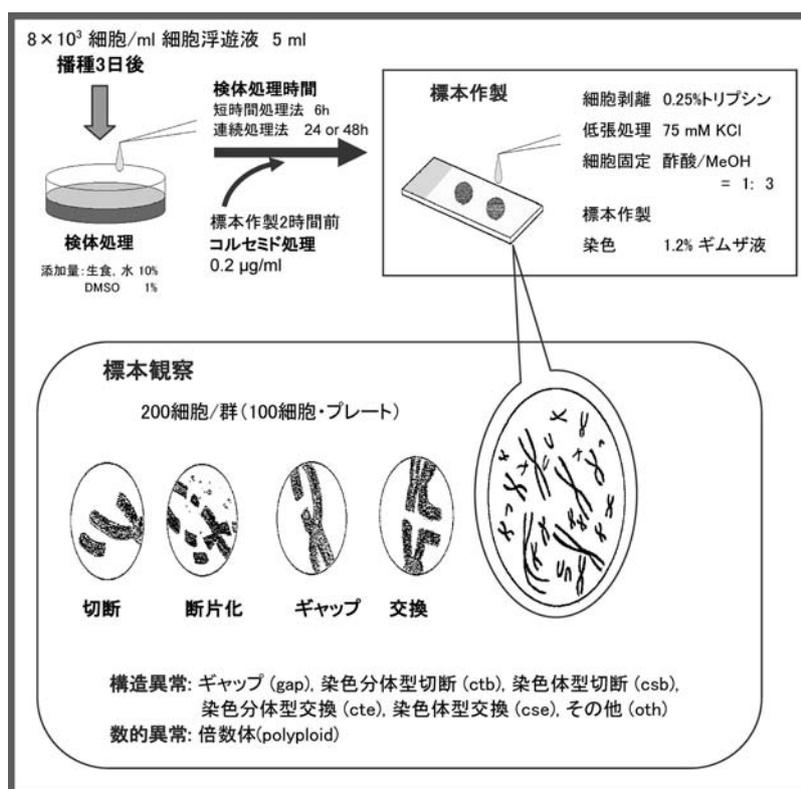


図3 CHL細胞を用いる染色体異常試験法概要

胞の傷害を防ぐため、水溶性の検体には一般に生理食塩水を用いる。

3.4. 代謝活性化系

Ames試験と同様に市販のS9 mixを購入して使用しているが、その組成はAmes試験と若干異なるため、表1に併記した。

3.5. 対照

媒体を用いる陰性対照および適切な既知変異原物質による陽性対照を試験毎に設ける。安評センターでは、代謝活性化系非存在下(-S9 mix)ではmitomycin Cを短時間処理法0.1 µg/mL、連続処理法24時間処理0.05 µg/mLの濃度で、検体の影響による細胞周期の遅延が認められる場合の48時間処理では0.025 µg/mLの濃度で、代謝活性化系存在下(+S9 mix)ではcyclophosphamideを12.5 µg/mLの濃度で使用している。

3.6. 試験方法

CHL細胞を用いる試験法の概要を図3に示す。通常、プレートは1濃度当たり2枚を使用する。同時並行で細胞増殖率を調べる。染色体標本は、1プレート当たり少なくとも2枚(1濃度当たり4枚以上)作製し、コード化したう

え、600倍以上の倍率下で染色体の顕微鏡観察を行う。1濃度当たり200個(1プレート当たり100個)の分裂中期細胞を観察し、構造異常の出現数を求めると同時に倍数体の出現数を求める。染色体異常の一例を図4に示す。結果の判定は、各異常の出現頻度が5%未満を陰性(-)、5%以上~10%未満を疑陽性(±)、10%以上を陽性(+)とする石館ら⁷⁾の方法やFisher検定による陰性対照群と検体処理群の比較およびCochran-Armitage傾向検定による濃度依存性を統計学的に判定する方法を用いる^{8,9)}。いずれの場合も異常細胞の出現率の増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に陽性と判定する。ただし、ギャップのみを有する細胞については、異常細胞から除外して判定する。

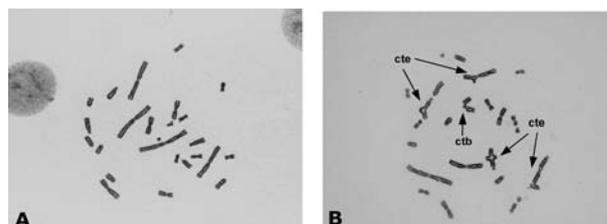


図4 染色体異常出現例
A: 陰性対照, B: 陽性対照.

4. 今後注目される代替法

安評センターでは、遺伝毒性試験を中心にさまざまな代替法の検討導入を行っている。その中で今後注目されるであろう試験法として、Bhas 42 細胞を用いる細胞形質転換試験および再生ヒト表皮モデル (EpiSkin™) を用いる *in vitro* 皮膚刺激性試験の二つの試験法を紹介する。

4.1. 細胞形質転換試験

細胞形質転換試験は、「試験管内の発がん性試験」として注目されて久しいが、1) 操作が複雑、2) 判定に経験を要する、3) *in vitro* 試験としては期間が長く、費用もかかるという欠点から、永く研究されてきたにもかかわらず一般に広まっていない試験系である。試験法は研究者によりさまざまで、シリアンハムスター胎児細胞 (SHE) を用いるコロニー検定法、BALB/c 3T3 あるいは C3H10T1/2 細胞を用いるフォーカス検定法¹⁰⁾ などがある。その中で、佐々木ら¹¹⁾ はプロモーション作用検出を目的として、BALB/c 3T3 細胞に *v-Ha-ras* 遺伝子を導入した Bhas 42 細胞を作製し、大森ら¹²⁾ が高感度なプロモーター検出系を確立した。また、浅田ら¹³⁾ はこの系でイニシエーターも検出できることを発見した。さらに、田中ら¹⁴⁾ および大森ら¹⁵⁾ は本試験系の有効性、安定性、再現性および技術移転性を評価すべく種々のバリデーション試験を行い、著者はそのメンバーとして検討を重ね、96 ウエルマイクロプレートを用いる Bhas 42 細胞の形質転換試験が発がん性物質の短期検索法となり得ることを確認した。その概要を紹介する。

4.1.1. 供試細胞

Bhas 42 細胞は、一度に大量に培養し、小分けした後凍結保存する。用時に解凍し、一度継代して試験に用いる。

4.1.2. 濃度設定

通常 5 mg/mL あるいは 10 mM のいずれか低い方を最高濃度に用量設定試験 (細胞増殖抑制試験) を実施する。その結果から、イニシエーション試験およびプロモーション試験ともに、全く細胞毒性の認められない濃度、弱い毒性 (IC₅₀ 以下) および強い毒性 (IC₅₀~IC₉₀) の認められる濃度を含む 5~9 濃度を設定する (公比にこだわる必要はない)。イニシエーション試験では毒性の強く現れる濃度に重きを置き、プロモーション試験では弱い毒性の現れる濃度に重きを置いて濃度設定を行う¹⁶⁾。また、細胞の増殖促進作用が認められる検体では、プロモーション試験において、全く細胞毒性の認められない濃度~増殖促進が現れる濃度に重きを置く。なお、毒性の低い検体では、最高濃度から $\sqrt{10}$ 以下の公比で 5~9 濃度あるいは 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mg/mL を設定する。

4.1.3. 媒体の選択

検体の媒体の選択基準は染色体異常試験に準ずる。

4.1.4. 対照

媒体を用いる陰性対照および適切な既知変異原物質による陽性対照を試験ごとに設ける。イニシエーション試験では、3-methylcholanthrene (MCA)、プロモーション試験では 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を DMSO に溶解し、それぞれ 1 μ g/mL、0.05 μ g/mL の濃度で使用する。

4.1.5. 試験方法

試験法の概要を図 5 に示す。試験は、イニシエーション試験およびプロモーション試験の二つの試験を並行して行い、それぞれに形質転換試験と細胞増殖試験が行われる。1 濃度当たり、形質転換試験には 96 ウエルプレート 1 枚を、細胞増殖試験には 8 ウエル (96 ウエルプレート中) を使用する。細胞増殖試験用のプレートは、培養終了後に各ウエルに 10% となるようホルムアルデヒドを加えて、30 分間細胞を固定する。水洗後、0.1% クリスタル・バイオレット液で 15 分以上染色し、流水洗、風乾後、色素抽出液 (0.02 mol/L 塩酸含有 50% エタノール) を適量加えてクリスタル・バイオレットを抽出し、570 nm における吸光度をマイクロプレート・リーダーで測定する。各吸光度から、媒体対照群に対する各群の相対パーセント [相対細胞増殖率, (%)] を求める。一方、形質転換試験用のプレートは培養液を除去し、各ウエルにメタノール 0.1 mL を加え 10 分間細胞を固定した後、5% ギムザ液で 30 分間染色する。流水洗後、風乾し、各プレート当たりの形質転換巣 (フォーカス) を有するウエル総数を計数する。形質転換巣の観察は、実体顕微鏡下でプレートを観察する。ただし、ウエルの側面に形成された形質転換巣は計数しない。なお、形質転換巣 (図 6) は、次の形態学的な特徴に基づいて判定する。1) 約 100 個以上の細胞からなる。2) 構成細胞が紡錘状を呈する。3) 塩基性に強く染色される。4) 巣周辺部では、より明確な紡錘状を呈し、配列の乱れを示す。5) 高密度に多層に重層している。6) 接触阻止により増殖を停止している周囲の細胞層へ浸潤して増殖している。結果の判定は、陰性対照群に対する検体処理群における形質転換頻度について Bonferroni の方法で調整した χ^2 検定法¹⁷⁾ を用いて有意差 (片側, $p \leq 0.05$) を判定し、下記の判定基準に従って判定する。

- 形質転換頻度が陰性対照群に比べて有意に増加する群が連続して 2 濃度以上認められた場合に陽性と判定する。
- 統計学的に有意な群が 1 濃度のみあるいは不連続に 2 濃度で認められた場合には、不確か (equivocal: +/-) な結果と判断し、狭い濃度範囲で再試験を行う。再試験において 1 濃度群以上で有意な形質転換頻度の増加がみられた場合、陽性と判断する。
- その他の場合は陰性と判断する。

典型的なイニシエーターおよびプロモーターの試験デー

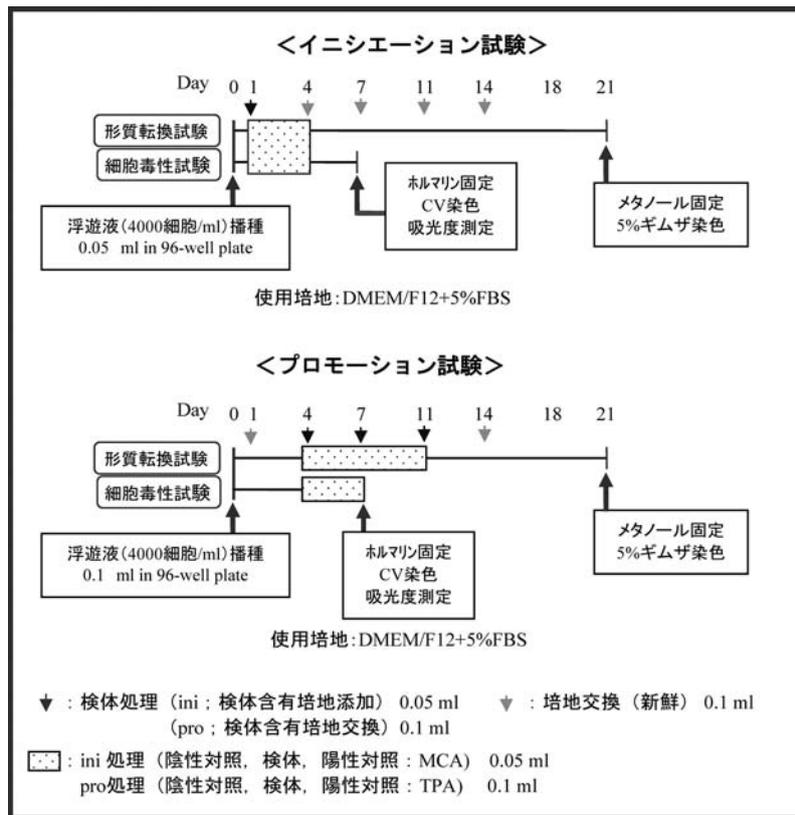


図5 Bhas 42 細胞を用いる細胞形質転換試験法概要

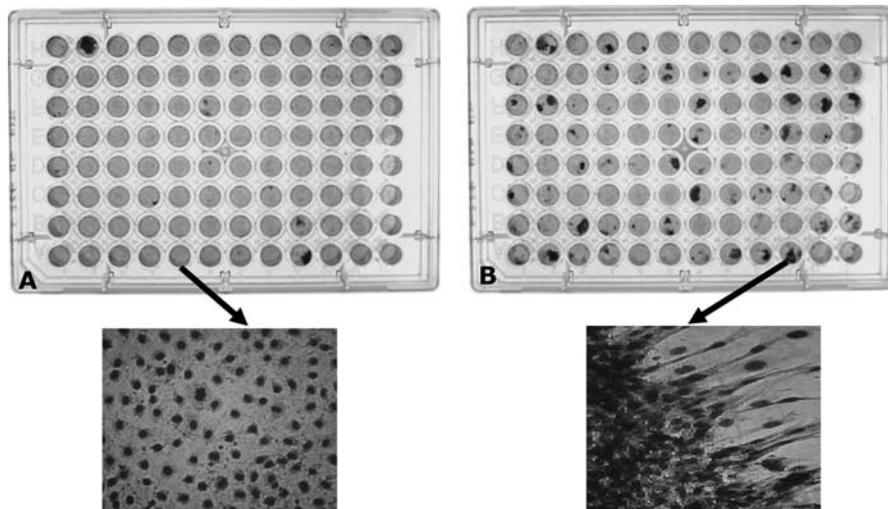


図6 細胞形質転換像

A: 陰性対照, B: 陽性対照.

いずれも上が培養プレート, 下が細胞像の強拡大を示す. 形質転換が起こっていない細胞は敷石状を示すが, 形質転換を起こした細胞は紡錘形で, 好塩基性 (青色) が強く, 配列の乱れおよび重層性も顕著である.

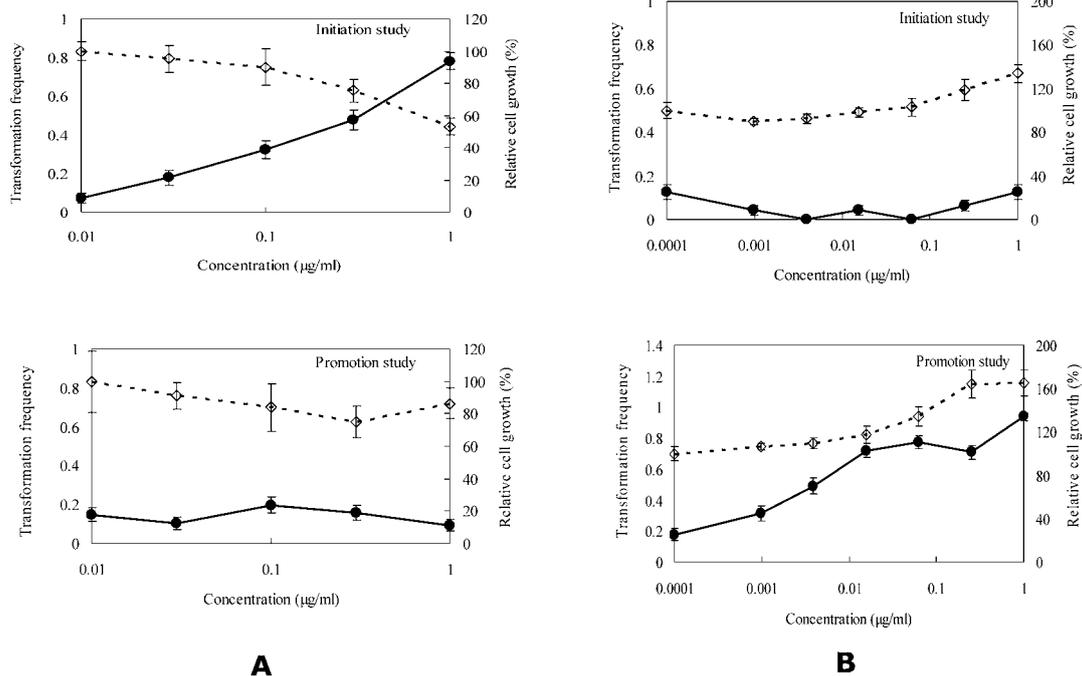


図7 細胞形質転換試験結果一例

A, 3-methylcholanthrene (MCA); B, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)

◇: 相対細胞増殖率, ●: 形質転換頻度.

タの一例を図7に示す。

4.2. 再生ヒト表皮モデル (EpiSkin™) を用いる *in vitro* 皮膚刺激性試験

皮膚刺激性試験は、一般的にウサギを用いて行われるが、供試動物のウサギが愛玩動物として広く認知されていること、外表に検体を処理し強い刺激性が認められた場合、その反応がケージ越しにも観察され、紅斑、浮腫、痂皮形成など試験を知らなくてもその反応がわかることもあり、動物愛護の観点からその実施に反対を唱えるヒトが多い試験の一つである。さらに、当該試験の目的がヒトの刺激性の予測にあるにもかかわらず、ウサギを用いた場合の予測率が6割程度で、疑陽性が多い¹⁸⁾のも問題視される一つの要因であろう。そこで、各種 *in vitro* 代替法が開発され、欧州代替法評価センター (ECVAM)、米国内代替法評価省庁間調整委員会 (ICCVAM) あるいは日本代替法評価センター (JaCVAM) でバリデーション評価が行われ、OECDガイドラインに採択される試験法が現われた¹⁹⁾。ここでは、その中の一つである再生ヒト表皮モデル (EpiSkin™) を用いる *in vitro* 皮膚刺激性試験を紹介する。

4.2.1. 供試組織

EpiSkin™ は、フランスの SkinEthic 社 (日本では株式会社ニコダームリサーチが取り扱う) が販売する成人女性の皮膚をプラスチックインターセル中のコラーゲン膜上に再

生した三次元ヒト表皮モデルで、優れた皮膚再現性と耐久性から動物実験代替法ツールとして高い機能性を有するといわれている²⁰⁾。組織は、維持培地および評価用培地を含めたキットとして販売されている。

4.2.2. 検体処理量

液体および低粘度の検体では 15 μL あるいは固体および粉体状の検体では 15 mg を処理する。前者はマイクロピペットで、後者は組織上に注射用水 10 μL を添加した後、検体をスパチュラで均一に広げる。なお、固体および粉体状の検体は、あらかじめ乳鉢で可能な限り粉砕して用いる。

4.2.3. 対照

陰性対照として注射用水および陽性対照として 5% Sodium dodecyl sulfate (SDS) を使用している。

4.2.4. 試験方法

試験法の概要を図8に示す。12 ウェルプレートを準備し、第1列 (最左列) に各 2 mL の維持培地を分注した後、EpiSkin を輸送用の寒天培地から維持培地に移し替える。37°C で 24 時間以上プレインキュベーションする。第2列に各 2 mL の維持培地を分注した後、インターセルを取り出し検体を処理する。処理後第1列に戻し、室温下で 15 ± 0.5 分間静置する。4 mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で組織を洗浄後、余剰の PBS をふき取り第2列にインターセルを移す。37°C, 5% CO₂ 下で 42 ± 1 時間培養する。培養終了後、第3列に 1 mg/mL MTT 溶液を 2 ml ずつ分注した後、

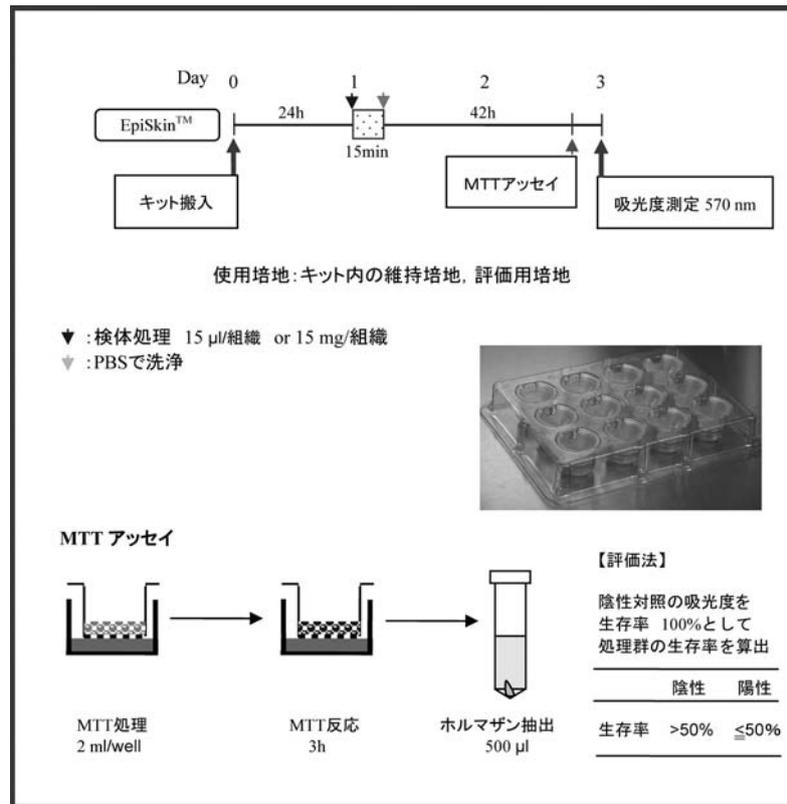


図8 ヒト表皮モデル (EpiSkin™) を用いる *in vitro* 皮膚刺激性試験法概要

インターセルを取り出し過剰な培地を綿棒で吸い取る。その後、インターセルを第3列に移し、37°C、5%CO₂下で3±0.25時間培養する。1.5 mLのマイクロチューブにacidic isopropanol (濃塩酸 180 µL+isopropanol 50 mL)を500 µLずつ分注し、MTT処理した組織を専用パンチではずした後、メンブレンから表皮を剥離し、両者をマイクロチューブに入れる。遮光下で約120分間振盪した後、5分間超音波処理してホルマザン抽出をし、遠心により不溶物を除去する。96ウェルプレートに抽出液100~200 µLを1サンプル当た

り2ウェルずつ分注する。ブランク(6ウェル)をacidic isopropanolとして、マクロプレートリーダーで570 nmの吸光度(OD)を測定する。陰性対照の平均ODを100%とし、各サンプルの生存率(%)を算出する。結果の判定は、生存率50%以下を「刺激性あり」、50%より高い場合を「刺激性なし」と判定する。

当センターの導入バリデーションに用いた物質の結果を図9に示す。

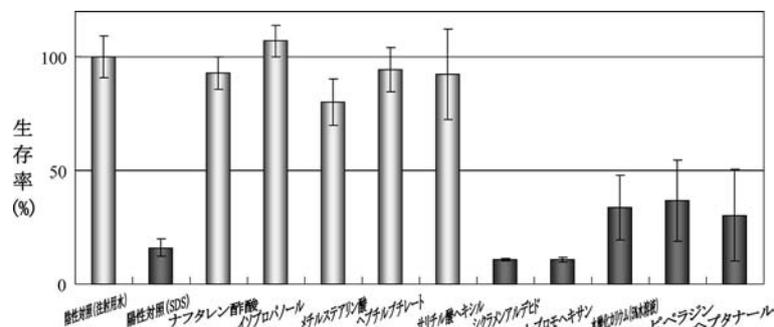


図9 EpiSkin™ 試験結果一例

OECDガイドラインに示された陰性および陽性対照物質の試験結果を示す。中央線以下のものが陽性物質である。

表3 JaCVAM が関与する代替法バリデーションの現状

試験法	試験法概要	欧米の動向	目標	現状
腐食性試験	培養皮膚モデルを試験	代替法を用いた腐食性評価が終了 (OECD ガイドライン 430 又は 431, 435)	化学物質の腐食性評価に代替法を利用するための公定化	評価会議で最終評価
光毒性試験	酵母膜破壊と赤血球の溶血試験	Balb3T3 細胞を用いた細胞毒性試験が OECD ガイドラインで採択済み	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会で評価中
皮膚感作性試験	LLNA-DA マウスリンパ節中 ATP 量の変化	ICCVAM で評価中	OECD ガイドライン 現行法の改訂	評価委員会で評価中
	LLNA-BrdU マウスリンパ節中の BrdU の取り込み	ICCVAM で評価中	OECD ガイドライン 現行法の改訂	評価委員会で評価中
	LLNA Reduced LLNA	ECVAM で評価終了	化学物質の感作性評価への利用促進	評価委員会で検証
	h-CLAT 培養細胞を用いた 感作性スクリーニング	JCIA, COLIPA を中心に 共同研究実施中	OECD ガイドライン	ECVAM との共同バリデーション中
皮膚刺激性試験	培養皮膚モデル試験	ECVAM で評価が終了 (OECD ガイドライン 439)	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会で EpiSkin の検証
眼刺激性試験	細胞毒性試験, 摘出眼球試験, 摘出角膜試験, 受精鶏卵試験	ICCVAM, ECVAM で評価が終了	日本の医薬部外品ガイドラインへの収載	評価委員会で摘出眼球, 摘出角膜試験の検証
コメットアッセイ	<i>In vitro</i> 試験法, <i>In vivo</i> 試験法	日本を中心にバリデーション実施中	OECD ガイドライン	バリデーション実施中
内分泌攪乱物質スクリーニング	HeLa レポーター遺伝子アッセイ	OECD で評価終了	OECD ガイドライン	バリデーション実施中
	Lumi-cell アッセイ	国際バリデーション実施中	OECD ガイドライン	Phase I 終了
培養細胞を用いた発がん物質のスクリーニング	Bhas アッセイ	国際バリデーション実施中	OECD ガイドライン	Phase II 終了

おわりに

これまで3回の実験技術講座を通じて、農薬登録に必要な安全性試験とその遂行について述べた。その中で中心的役割を果たしているのは動物実験であり、近年の動物愛護の問題からその実施にブレーキがかかり、*in vitro* 試験を含む

代替法にシフトしていると思われがちだが、実際にはまだ、登録申請に用いられる *in vitro* 試験があまりに少ないことに驚かれることと思う。今回の講座の第1回でも触れたように、農林水産省から出された「農林水産省の所管する関連研究機関等における動物実験の実施に関する基本指針 (平成18年農林水産省通知)」には、実験方法の選択の項で

「動物実験代替法の利用」として、「科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り実験動物を供する方法に代わり得るものを利用すること等により実験動物を適切に利用すること」と書かれているにもかかわらず、代替法を用いた試験は少ない。今回の報告で紹介した Bhas 42 細胞を用いる細胞形質転換試験と再生ヒト表皮モデル (EpiSkin™) を用いる *in vitro* 皮膚刺激性試験は、OECD ガイドラインに採択されているかあるいは国際バリデーション試験が進行中で、その有効性が確認されている段階である。まだ、農薬分野でガイドライン化されていないため、登録試験として用いることはできないが、スクリーニングやメカニズム試験などに用いることは可能と考えられる。最近、厚生労働省医薬品食品局審査管理課から医薬部外品の登録申請資料の作成および化粧品のポジティブリスト改正要望等において JaCVAM が取りまとめている新規開発および改訂された動物実験代替法の妥当性評価結果を参考に活用を図るようにとの、代替法の利用促進ともとれる事務連絡が出されている²¹⁾。JaCVAM では、OECD ガイドラインに採択された代替法を中心に新規代替法のバリデーションおよび第三者評価を行っている。現在検討されている代替法を表 3 に示す^{22,23)}。 *In vitro* 代替法の OECD ガイドラインへの採択も増えてきた昨今では、本邦においても *in vitro* 代替法が農薬のガイドラインへ採択される日も近いと予想され、今後さらに研究に拍車がかかるものと考えられる。安評センターではいち早くそのニーズに対応できるよう種々の代替法の技術確立に取り組んでいる。

最後に、今回 3 回にわたり実験技術講座に執筆する機会を与えていただいた日本農薬学会編集委員各位に深謝致します。

引用文献

- 1) 水橋福太郎：農薬誌 **36**, 325–339 (2011)。
- 2) 「農薬の登録申請に係る試験成績について」(12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知，平成 12 年 11 月 24 日，一部改正平成 20 年 3 月 31 日 19 消安第 14966 号)。
- 3) 「農薬の登録申請に係る試験成績について」の運用について (13 生産第 3986 号農林水産省生産局生産資材課長通知，平成 13 年 10 月 10 日，一部改正平成 22 年 4 月 1 日 21 消安第 14387 号)。
- 4) 安衛法における変異原性試験—テストガイドラインと GLP 一，中央労働災害防止協会，1991。
- 5) 祖父尼俊雄編：染色体異常試験—メカニズムから試験法，国際的標準化法まで—，サイエンティスト社，p. 146, 2005。
- 6) 林 真：医薬品研究 **40**, 667–679 (2009)。

- 7) 石館 基編：チャイニーズ・ハムスター培養細胞を用いる染色体異常試験データ集，リアライズ社，pp. I–X, 1983。
- 8) OECD guideline for Testing of Chemicals, Test Guideline 473 “*In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test,” Paris, 1997。
- 9) 林 真：化学物質による染色体異常アトラス，日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編，朝倉書店，pp. 47–51, 1988。
- 10) K. Ohmori: *J. Health Soc. Sci.* **55**, 20–30 (2009)。
- 11) K. Sasaki, H. Mizusawa and M. Ishidate: *Jpn. J. Cancer Res.* **79**, 921–930 (1988)。
- 12) K. Ohmori, K. Sasaki, S. Asada, N. Tanaka and M. Umeda: *Mutat. Res.* **557**, 191–202 (2004)。
- 13) S. Asada, K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi and M. Umeda: *Mutat. Res.* **588**, 7–21 (2005)。
- 14) N. Tanaka, K. Sasaki, K. Hayashi, A. Sasaki, S. Asada, *et al.*: *AATEX* **14**, 831–843 (2009)。
- 15) K. Ohmori, M. Umeda, N. Tanaka, H. Takagi, I. Yoshimura, *et al.*: *ATRA* **33**, 619–639 (2005)。
- 16) S. Arai, N. Tanaka, K. Sasaki, and A. Sakai: *AATEX* **15**, 6–13 (2010)。
- 17) G. W. Snedecor and W. G. Cochran: *Statistical Methods* (8th Edition), Iowa State University Press, Ames, pp. 125–128, 1989。
- 18) 小島肇夫：皮膚刺激性試験について，最新動物実験代替法—日米欧関連法規への対応/各種試験の手順—，技術情報協会，pp. 61–71, 2007。
- 19) OECD guideline for Testing of Chemicals, Test Guideline 439 “*In Vitro* Skin Irritation: Reconstructed Human *Epidermis* Test Method,” Paris, 2010。
- 20) EpiSkin™, EpiDerm™, and Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER). *In Vitro* Test Methods for Assessing the Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. Background Review Document by the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods and National Institute of Environmental Health Sciences, USA, 2001。
- 21) 「医薬部外品の承認申請資料作成等における動物実験代替法の利用と JaCVAM の活性促進について」(厚生労働省医薬品食品局審査管理課事務連絡，平成 23 年 2 月 4 日)。
- 22) 小島肇夫：薬学誌 **128**, 747–752 (2008)。
- 23) JaCVAM ホームページ：http://jacvam.jp/

略 歴

水橋福太郎 (みずはし ふくたろう)

生年月日：昭和 28 年 9 月 23 日

最終学歴：三重大学大学院水産学研究所水族生理病理学専攻
修士課程修了

博士 (薬学)

研究テーマ：化学物質の遺伝毒性

趣味：釣り，テニス