

人の健康影響に係る OECD テストガイドラインの 作成状況に関する調査

駒林卓磨^{**}, 中村正宏^{*}

^{*} 独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

^{**} 内閣府 食品安全委員会事務局

我が国における農薬登録申請の際に提出される人に対する影響に関する試験成績は、経済協力開発機構 (OECD) の Section 4 Health Effects に分類されるテストガイドラインに沿って実施することが平成 31 年 3 月 29 日付消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知 (以下「局長通知」という。)により求められている。OECD のテストガイドラインについては、毎年 4 月に開かれるテストガイドラインプログラム各国調整官作業部会 (WNT) において、テストガイドラインやガイダンス文書の作成および改訂作業が行われており、当該部会の作業内容を定期的に把握することは、国際的な状況を踏まえて、局長通知の改正等に迅速かつ適切に対応するために重要である。本調査では、令和 4 年度に行われた WNT での Section 4 におけるテストガイドラインおよびガイダンス文書の作成状況や改訂状況の把握を行った。

令和 4 年度の WNT では、3 つのテストガイドラインの作成、6 つのテストガイドラインの改訂が行われ、承認された。本報告では、新たに作成された 3 つのテストガイドラインである、OECD TG 492B および OECD TG 467 : *in vitro* 眼刺激性試験ならびに OECD TG 470 : 遺伝子突然変異試験 (Pig-a assay) の概要について主に紹介する。

Keywords ; OECD テストガイドライン, *in vitro*, 眼刺激性試験, Pig-a assay

緒言

我が国における農薬の登録申請の際に提出が求められる人に対する影響に関する試験成績は、経済協力開発機構 (OECD : Organization for Economic Co-operation and Development) の Section 4 Health Effects に分類されるテストガイドラインに沿って実施することが平成 31 年 3 月 29 日付消安第 6278 号農林水産省消費・安全局長通知 (以下「局長通知」という。)により求められている。

OECD では、テストガイドラインプログラム各国調整官作業部会 (WNT : Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines programme) において、テストガイドラインやガイダンス文書の作成および改訂作業が行われている。例年、新規に作成または改訂されたテストガイドラインは、4 月の WNT 会合で承認され、6 月から 9 月頃にかけて OECD の公開ウェブサイトですべて入手可能になる。

令和 4 年度において、Section 4 Health Effects 分野では、皮膚刺激性、眼刺激性、皮膚感作性に関する *in vitro* テストガイドラインや、発達神経毒性試験、経皮吸収試験のガイダンス文書等の議論および検討が行われた。

OECD におけるテストガイドラインやガイダンス文書の作成状況や改訂状況を定期的に把握することは、局長通知の改正等に迅速かつ適切に対応するために重要である。

そこで、令和 4 年度の OECD におけるテストガイド

ラインの作成状況を調査し整理することにより、現行のデータ要求や評価法への反映に資することを目的として調査を行った。

1. 調査研究方法

1.1. 調査対象

令和 4 年度新たに作成、改訂されたテストガイドラインについて、OECD のホームページより確認し、Section 4 に該当するテストガイドラインの内容の把握を行った。

2. 結果の概要

2.1. 新たに作成、改訂されたテストガイドライン

令和 4 年 6 月 30 日に、WNT 会合で承認され、新たに作成、改訂されたテストガイドラインが OECD のホームページ上に公開された。そのうち、Section 4 に該当するテストガイドラインの中で我が国の農薬の登録に関連する試験に関するテストガイドラインは表 1 および 2 のとおりである。

眼刺激性に関するテストガイドライン 2 つ (TG492B および TG467)、遺伝子突然変異に関するテストガイドライン 1 つ (TG470) が新たに作成され、急性経口毒性に関するテストガイドライン 1 つ (TG425)、皮膚感作性に関するテストガイドライン 4 つ (TG406, TG442C, TG442D および TG442E)、遺伝子突然変異に関するテ

トガイドライン1つ (TG488), が新たに改訂された。 TG467 およびTG470 について概要を報告する。
 新たに作成されたテストガイドラインである TG492B,

表1. 令和4年度に新たに作成されたテストガイドライン (Section4)

分野	番号	試験名
眼刺激性	492B	Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification
	467	Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation
遺伝子突然変異	470	Mammalian Erythrocyte <i>Pig-a</i> Gene Mutation Assay

表2. 令和4年度に新たに改訂された主なテストガイドライン (Section4)

分野	番号	試験名	変更内容
急性経口毒性	425	Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure	個別飼育に関する説明の追加
皮膚感受性	406	Skin Sensitisation	信頼性に関する例示の記載削除
	442C	<i>In chemico</i> Skin Sensitisation (Assays addressing the Adverse Outcome Pathway key event on covalent binding to proteins)	ADRA 法の内容更新 (蛍光検出の追加, UVCB 物質への適用拡大)
	442D	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation (ARE-Nrf2 Luciferase Test Method)	陽性対照物質の事前確認の記載削除
	442E	<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation (In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation)	GARD™Skin 法の追加 (SenzaCell による試験方法の追加)
遺伝子突然変異	488	Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays	体細胞組織と生殖細胞の変異解析の調整

2.2. 新たに作成されたテストガイドラインの概要

2.2.1. TG492B (*in vitro*眼刺激性試験)²⁾

2.2.1.1. 概要

既存の *in vitro* 眼刺激性試験である TG492 の改良版である。TG492 では GHS 区分における区分外 (刺激性なし) しか分類できないが, 本ガイドラインでは GHS 区分1 (眼に対する重篤な損傷性/不可逆的) と区分2 (眼刺激性/可逆的) についても分類できる試験法となっている。

2.2.1.2. 原理

RhCE (再構築ヒト角膜様上皮) 組織構造物の生存細胞の組織生存率を, 生体染色色素 MTT を還元し生成した MTT ホルマザンの吸光度から測定し (MTT アッセイ), 被験物質の眼刺激性を評価する。TTL 法 (液体用) と TTS 法 (固体用) の2つの試験方法がある。

2.2.1.3. 適用範囲

ガス, エアロゾルには適用できない。

2.2.1.4. 試験方法

○ TTL 法

RhCE 組織構造物の表面に被験物質を均一に塗布 ($160 \pm 2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$) する。処理時間を3点設定し, 5分の場合はそのまま, 16分および120分の場合には蒸留水で20% (w/v) に希釈した上で塗布する。暴露終了後, 室温下で $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 非含有 DPBS 溶液を用いて十分にすすぎ, 組織表面上の被験物質を除去し, 新鮮な培地に10分間浸漬する。浸漬後, MTT アッセイを実施する。

○ TTS 法

RhCE 組織構造物の表面に被験物質を均一に塗布 ($160 \pm 2 \text{mg}/\text{cm}^2$) する。処理時間を2点設定する (30分および120分)。暴露終了後, 室温下で $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 非含有 DPBS 溶液を用いて十分にすすぎ, 組織表面上の被験物質を除去し, 新鮮な培地に30分間浸漬する。浸漬後, MTT アッセイを実施する。

2.2.1.5. 判定基準

○ TTL 法

区分1：全ての時間処理において平均生存率が50%以下

区分2：区分1，区分外に該当しない場合

区分外：全ての時間処理において平均生存率が50%を超える

○ TTS 法

区分1：30分後の平均生存率が40%以下で120分後の平均生存率が60%以下

区分2：区分1，区分外に該当しない場合

区分外：30分後の平均生存率が40%を超えて，120分後の平均生存率が60%を超える

2.2.2. TG467 (*in vitro*眼刺激性試験)³⁾

2.2.2.1. 概要

従来の *in vitro* 眼刺激性試験のテストガイドラインで判定可能な GHS 区分は，区分1もしくは区分外であり，1つのテストガイドラインの試験結果だけでは区分判定が困難な場合がある．本テストガイドラインは，従来の2つのテストガイドラインの試験結果を組み合わせる (Defined Approach, DA) ことにより1つのテストガイドラインでは区分判定が困難な内容であった場合も区分判定を可能とする方法を示したものである (表 3)．

DAL1 と DAL2 の2つの判定方法がある．

表3.TG467の判定可能な区分と，それに用いる各*in vitro*眼刺激性試験における個別での判定可能な区分

TG	GHS 判定区分			
	区分1	区分2	区分外	
従来	437	○	×	○
	491	○	×	○
	492	×	×	○
新規	467	○	○	○

○：判定可能な区分，×：判定不能な区分

2.2.2.2. 適用範囲

DAL1：混合物，UVCB 物質には適用できない．

DAL2：界面活性剤を含む剤には適用できない．

2.2.2.3. 判定方法および判定基準

DAL1 は TG437 と TG492 を，DAL2 は TG437 と TG491 を組み合わせて行う．また，それぞれに2つの手順 (option 1, 2) がある．図1および2にDAL1, DAL2 における実験手法のフローチャートをそれぞれ示す．

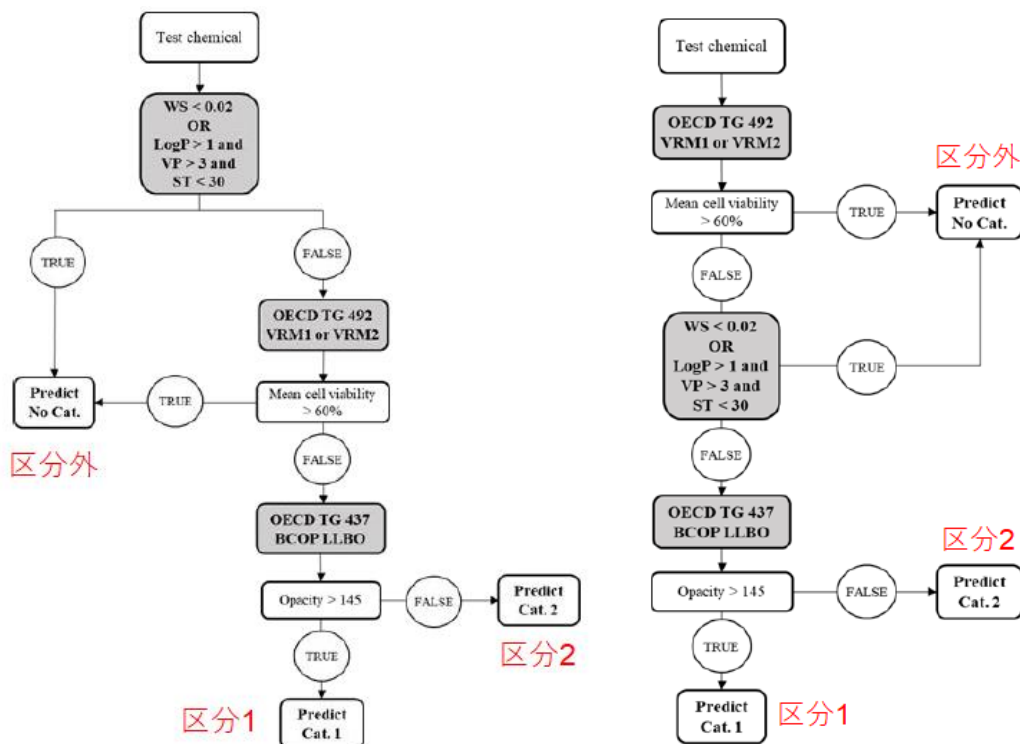


図1. DAL1における実験手法のフローチャート (左: option 1, 右: option 2)

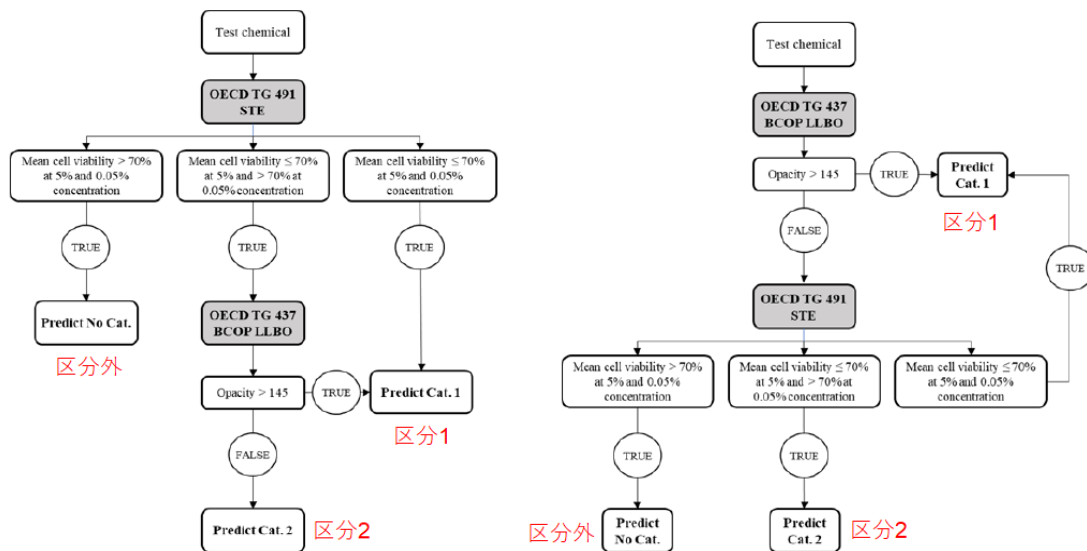


図2. DAL2における実験手法のフローチャート (左: option 1, 右: option 2)

2.2.3. TG470 (Pig-a assay, 遺伝子突然変異試験)⁴⁾

2.2.3.1. 概要

細胞膜表面タンパク質の結合に関与する GPI アンカーの生合成に関係する *Pig-a* 遺伝子 (Phosphatidylinositol glycan class A) の変異を指標とした遺伝子突然変異試験である。本アッセイは成熟げっ歯類の主に骨髄に存在する赤血球前駆細胞に誘発される遺伝子突然変異を検出するものであり、解析に用いる試料は血液のみであるため、他の毒性試験 (反復投与毒性試験や発がん性試験等) と併合して実施可能である。

2.2.3.2. 原理

GPI アンカー生合成に関わる遺伝子の中で *Pig-a* 遺伝子は唯一 X 染色体上に存在する。雄の有する X 染色体は 1 本、雌の機能している (不活性化していない) X 染色体は 1 本であるため、*Pig-a* 遺伝子上にその機能を失うような変異が生じると GPI アンカータンパク質が欠損した細胞が生じる。他の GPI アンカー生合成に関わる遺伝子 (常染色体上に存在している遺伝子) については、2 対の染色体両方に変異が生じた場合にのみその機能が失われるため、機能が喪失する頻度は *Pig-a* と比べ低い⁵⁾。

2.2.3.3. 適用範囲

骨髄に到達しない物質やその代謝物には適用できない。

3.2.3.4. 試験方法

3 用量の被験物質投与群および溶媒対照群を設け、ラ

ットまたはマウスに 28 日間反復経口投与する。投与終了 1~3 日後に末梢血を採取する。末梢血中の細胞は GPI アンカータンパク質に対する蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーにより全赤血球数、野生型赤血球数、全網状赤血球数および野生型網状赤血球数を測定する。得られた結果から、MUT RET 頻度 (変異型網状赤血球数/全網状赤血球数)、MUT RBC 頻度 (変異型赤血球数/全赤血球数)、%RET (網状赤血球数/全赤血球数) を算出する。

2.2.3.5. 判定基準

以下を全て満たす場合、陽性と判定する。

- 1 用量以上の被験物質投与群で、MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度が溶媒対照群と比較し有意な増加を示す
- MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度に用量関連性を示す
- 1 用量以上の被験物質投与群で、MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度が背景データの上限值を超過する

以下を全て満たす場合、陰性と判定する。

- 全ての被験物質投与群の MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度が溶媒対照群と比較し有意な増加を示さない
- MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度に用量関連性を示さない
- 全ての被験物質投与群の MUT RET 頻度および MUT RBC 頻度が背景データの上限值を超えない
- 全ての被験物質投与群の %RET が、溶媒対照群

と比較し、有意な減少を示す

3. まとめ

OECD テストガイドラインの Section 4 Health Effects について、令和4年度における新規作成、改訂状況およびその内容を調査した。以下に調査結果の概要を示す。

- ・新たに作成されたテストガイドラインは眼刺激性に関するものが2つ (TG492B, TG467)、遺伝子突然変異に関するものが1つ (TG470) であった。
- ・新たに改訂されたテストガイドラインは急性経口毒性に関するものが1つ (TG425)、皮膚感作性に関するものが4つ (TG406, TG442C, TG442D, TG442E)、遺伝子突然変異に関するものが1つ (TG488) であった。
- ・TG492B はRhCE 組織構造物に被験物質を塗布し、その後 MTT を還元し、ホルマザンを測定することにより組織生存率を求める方法である。同様の手法により測定を行う TG492 では判定できなかった GHS 区分1 と区分2 についても区別できる試験方法である。
- ・TG467 は従来よりテストガイドラインとして存在していた *in vitro* 眼刺激性試験を複数組み合わせることで1つのテストガイドラインのみでは判定できなかった GHS 区分についても判定可能な試験方法である。
- ・TG470 は GPI アンカー生合成に関与する遺伝子である *Pig-a* をレポーターとする方法であり、他の毒性試験と併合して実施可能な試験方法である。

今回新規作成または改訂されたテストガイドラインについて、局長通知におけるデータ要求や評価法への反映がなされた場合に迅速に対応できるよう、検討していく予定である。

参考文献

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 : Health Effects | OECD Guidelines for the Testing of Chemicals | OECD iLibrary (oecd-ilibrary.org)
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788/datedesc#collection-sort
- 2) Test Guideline No. 492B Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification
<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/0d603916-en.pdf?expires=1667804454&id=id&accname=guest&checksum=A3017CA6968DC2FDE055A4C5186C6233>

- 3) Test Guideline No. 467 Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation

<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/28fe2841-en.pdf?expires=1669624160&id=id&accname=guest&checksum=34385CEE07F2B32D904F6DA65B6C9B2C>

- 4) Test Guideline No. 470 Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation Assay

<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/4faea90e-en.pdf?expires=1667804557&id=id&accname=guest&checksum=414618CC2D9DA2A4DEB8124E051F899E>

- 5) 鈴木, 王, Pig-a アッセイ-末梢血を用いるインビボ遺伝子突然変異評価系一, 労働安全衛生研究(2014)

(全 URL のリンクについての確認は、2023 年 8 月 2 日に実施)