

ニジマス鰓由来 RTgill-W1 細胞アッセイ （OECD テストガイドライン 249）の紹介

発 表 者：縄司 奨（化学物質安全部門）

1. はじめに

生態毒性試験とは、化学物質の環境・生態系への影響を評価する試験のことである。多くの化学物質の最終到達点は水圏であることから、この水圏に対する有害性を調べるのが特に重要と考えられている。生態毒性試験では、一般的に水圏の各栄養段階のうち、代表的な生物として魚類、ミジンコ、藻類の 3 種（国内の化学物質規制ではメダカ、オオミジンコ、ムレミカヅキモの 3 種）を用いて試験を実施する。化学物質の中には、特定の生物種に特異的に影響を及ぼす可能性があるため、生態系への影響を調べる際には 3 種の生物全てに対する影響を評価することが望ましいと考えられている。

一方、近年、動物福祉の観点から、動物実験の実施に対する規制が世界各国で厳格化されつつあり、3Rs の原則 [Replacement (代替)、Reduction (使用数の削減)、Refinement (苦痛の軽減)] に沿った対応が強く求められてきている。特に化粧品分野でこの流れが顕著であり、欧州連合、カナダ、インド等の諸外国では、既に化粧品原料及び完成品の動物実験が完全禁止となっている。生態毒性試験分野においては、ヒトと同じ脊椎動物である魚類を用いる試験は動物実験に該当すると認識され、動物福祉の観点から、新たに試験データを取得することが困難になっている。

このような状況の中、2021 年 6 月に経済協力開発機構 (OECD) において、OECD テストガイドライン 249 (TG249) 「Fish Cell Line Acute Toxicity: The RTgill-W1 cell line assay」(魚類細胞アッセイ) が新たな試験法として採択された。このアッセイは、ニジマスの鰓細胞由来である RTgill-W1 細胞(魚類細胞)を用いるため、生物そのものを使用せずに魚類急性毒性試験 (OECD TG203) と関連の高いデータを得ることができる。本発表では、魚類細胞アッセイの概要、特徴及び活用例等について紹介する。

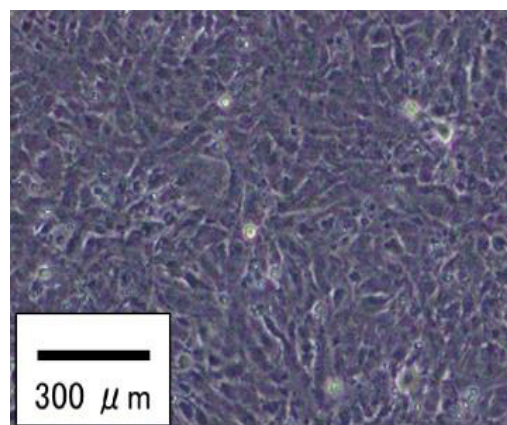


図 1 ニジマス鰓由来 RTgill-W1 細胞

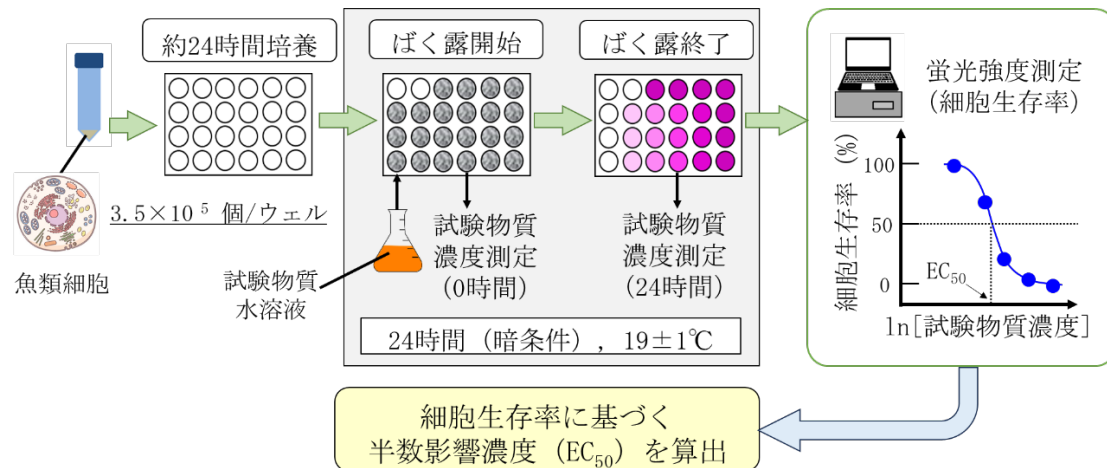


図 2 魚類細胞アッセイの流れ

2. 試験の概要

2.1 魚類細胞アッセイの流れ

魚類細胞アッセイの流れを図 2 に示す。まず、本アッセイで用いる魚類細胞を 1 ウェルあたり 3.5×10^5 個の細胞数となるように細胞濃度を調整して各ウェルに播種する。その後 24 時間培養し、細胞がプレート底面に定着した段階で被験物質水溶液を添加してさらに 24 時間のばく露を開始する。ばく露終了後、3 種類の蛍光色素を添加し、蛍光プレートリーダーを用いて各測定条件で蛍光強度を測定する。なお、蛍光色素はリソソームの膜の完全性を示す Neutral Red™、細胞内ミトコンドリアの代謝活性を示す Resazurin（本機構では alamarBlue™を使用）、細胞膜の完全性を示す CFDA-AM™を使用する（図 3）。次に、測定によって得られた各試験区の蛍光強度を用いて、対照区の平均蛍光強度を 100 としたときの各試験濃度区の蛍光強度の割合を細胞生存率として求める。求めた細胞生存率(%)を縦軸に、測定した被験物質濃度の幾何平均値の自然対数値(ln)を横軸にプロットし、3 つの濃度反応曲線を描く。それぞれの濃度反応曲線について非線形回帰分析を行い、1 回の魚類細胞アッセイについて 3 つの EC_{50} 値が得られる。したがって、魚類細胞アッセイでは、それぞれ異なるエンドポイントに基づく細胞毒性を同時に評価することができる。

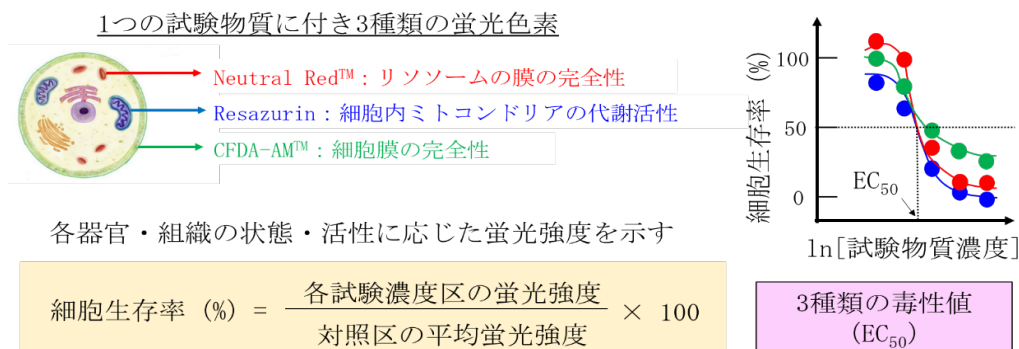


図 3 蛍光強度に基づく細胞生存率の算出及び毒性評価

2.2 魚類細胞アッセイの特徴

魚類細胞アッセイ (TG249) の最大の特徴は細胞株を用いることで動物実験に該当しないことである。また、魚類細胞アッセイは、稚魚を用いる魚類急性毒性試験 (TG203) よりばく露期間が短い (TG203 : 96 時間、TG249 : 24 時間) ため、試験結果を迅速に得ることができる。さらに、医薬品、農薬、工業化学物質等を含む 35 種の環境関連有機化学物質について、本アッセイで得られた毒性値 (EC_{50} : 半数影響濃度) は、TG203 で得られた急性毒性値 (LC_{50} : 半数致死濃度) と高い相関性を示す (図 4、回帰式の決定係数 R^2 : 0.9) ことが報告されている¹⁾。このことから、本アッセイによ

って、TG203 の急性毒性値を高精度に予測することが可能であり、また、本アッセイは様々なカテゴリーの化学物質に対して利用できることが期待されている。

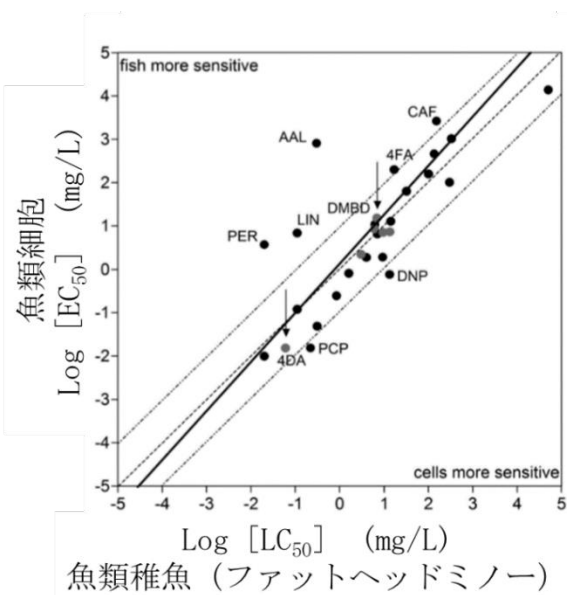


図 4 魚類細胞 EC_{50} (TG249) と魚類稚魚 LC_{50} (TG203) との比較 [図は参考文献 1) より引用] *

3. 魚類細胞アッセイの化粧品原料への適用に関する検討

動物福祉の観点から、化粧品の原料及び製品について魚類急性毒性試験 (TG203) を実施することができない国・地域が増加してきている。そこで本機構では、化粧品原料に対する魚類細胞アッセイの適用性を調べるために、紫外線吸収剤として日焼け止め製品等中使用されているベンゾフェノン類 4 種 [Benzophenone (BP) -1 (図 5)、BP-3、BP-4 及び BP-6] に対して魚類細胞アッセイを実施し、メダカの TG203 の毒性値と比較した。 EC_{50} が得られたベンゾフェノン類 3 種 (BP-1、BP-3、BP-4) の結果を、既報の 9 物質における魚類細胞 EC_{50} 及び魚類稚魚 LC_{50} の文献値²⁾のプロットに当てはめたところ、回帰直線近傍に位置していた (図 6)。この結果から、ベンゾフェノン類を含む紫外線防

* アリルアルコール (AAL) は生体内のアルコール脱水素酵素によりアクロレインに代謝されて強毒性を示す。ペルメトリン (PER) 及びリンデン (LIN) は神経系に特異的に作用して毒性を示す神経毒性物質である。これらのような物質群は、代謝活性の差異、毒性作用部位の差異等により、魚類細胞アッセイ (TG249) による魚類急性毒性試験 (TG203) の毒性値予測の精度が低下する可能性があることが指摘されている¹⁾。

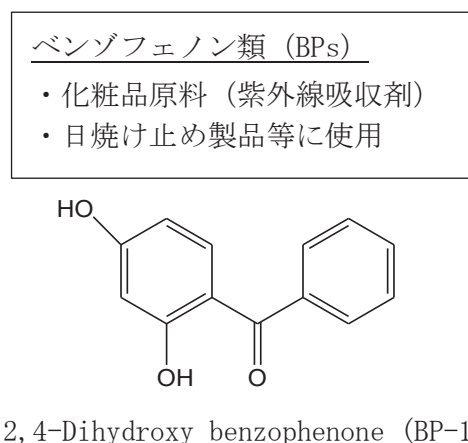


図 5 ベンゾフェノン類の用途及び BP-1 の構造式

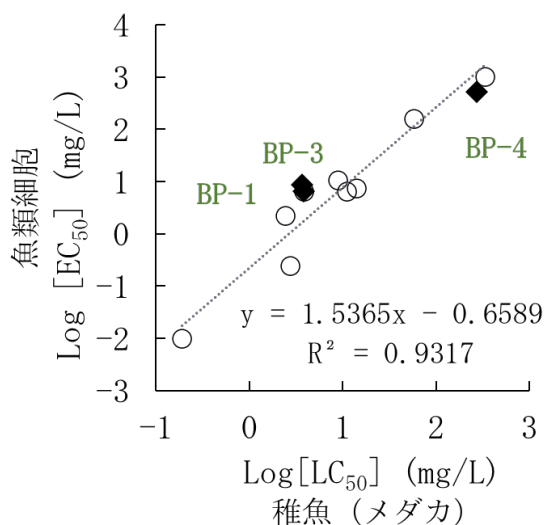


図 6 BPs の魚類細胞 EC₅₀ (TG249) vs. メダカ LC₅₀ (TG203) との比較 [○は参考文献 2) よりデータを引用]

4. 魚類細胞アッセイの活用例

化粧品の原料・製品の規制等が原因で魚類急性毒性試験 (TG203) の実施が実施困難な場合、魚類細胞アッセイのデータを得ることによって、TG203 の代替データとして活用でき、また、定量的構造活性相関 (QSAR) 等の *in silico* 法や既存の *in vitro* データ等を組み合わせて魚類急性毒性に関するデータを拡充することで代表的な 3 栄養段階の総合的な毒性評価が可能になる。

他方で、化審法申請や農薬登録を目的とする場合、現状では魚類細胞アッセイのデータそのものを申請や登録に使用できないため、予備検討として影響濃度範囲を把握したり、複数物質に対する毒性スクリーニングに活用したりすることができると考えられる。これらの活用により、動物福祉及び 3Rs に最大限配慮した試験実施が可能になると考えられる。

5. おわりに

今後、動物福祉の観点から、魚類を含む動物実験の削減/代替がますます推進される可能性が高くなると予想される。それに伴い、魚類細胞アッセイのデータが活用される場面は年々増加することが考えられる。魚類細胞アッセイを用いた魚類急性毒性評価にご興味があれば、お問い合わせいただきたい。

6. 参考文献

- 1) Tanneberger, K. et al. Environ. Sci. Technol. 2013, 47(2), 1110-1119.
- 2) Natsch, A. et al. Environ. Toxicol. Chem. 2018, 37(3), 931-941.