

【概要】 新規遺伝毒性 NAMs の ToxTracker とはどんな試験か？

◆ここがポイント◆

- ✓ 新しい遺伝毒性 OECD テストガイドライン TG446A とは？
- ✓ ToxTracker の原理
- ✓ その特徴と利用法は？

【背景】

2026 年 7 月 9 日付け【NITE ケミマガ】NITE 化学物質管理関連情報第 781 号に、2026 年 7 月 2 日に OECD TG (テストガイドライン) 446A¹⁾が発行されたとの記事が掲載された。TG446A の表題は「ToxTracker gene reporter assay for the identification of genotoxic hazard and genotoxic/non-genotoxic mechanism of action」というもので、日本語では「遺伝毒性ハザードおよび遺伝毒性／非遺伝毒性作用機序の同定のための ToxTracker 遺伝子レポーターアッセイ」とでもなるうか。ここでは、ToxTracker とはどんな試験でどのような利用が期待されるのかを概説する。なお、本概説は、OECD TG446A の INTRODUCTION および PRINCIPLE OF THE TEST にある記載を主体にまとめたものである。

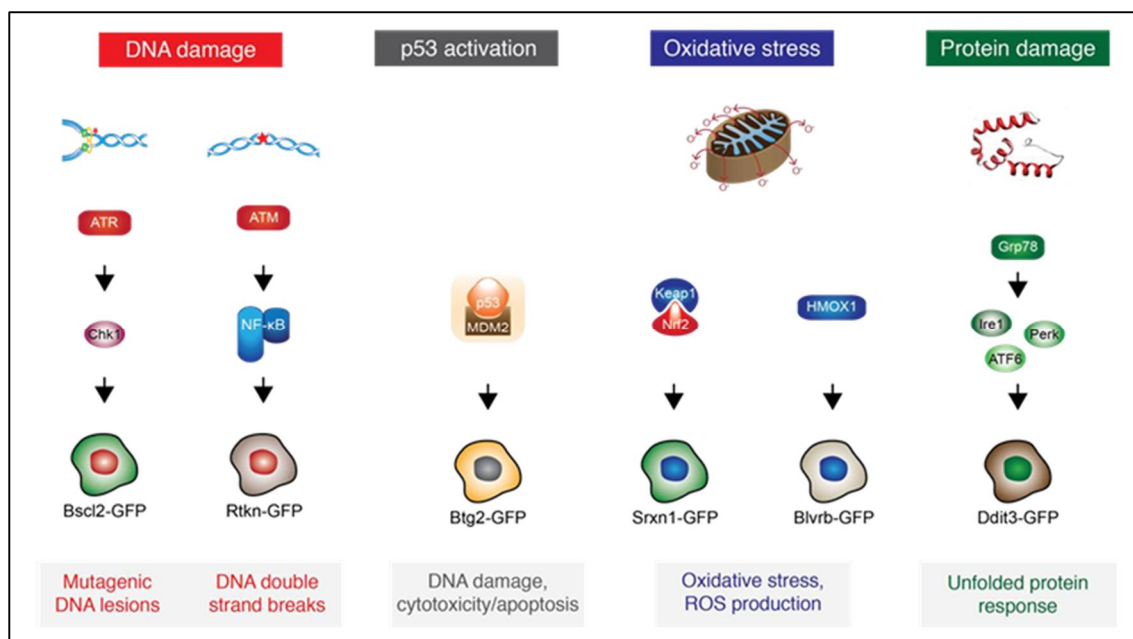
【詳細】

1. ToxTracker とは

ToxTracker は、オランダの Toxys 社²⁾が開発したマウス胚性幹細胞を用いる遺伝子レポーターアッセイで、in vitro 遺伝毒性試験の NAMs (New Approach Methodologies) の 1 つとされる。それぞれに独自の GFP (緑色蛍光タンパク質) 融合レポーター遺伝子を導入した 6 種類の細胞株を利用する。各レポーター遺伝子は特定の毒性メカニズムを代表するバイオマーカーとなっており、レポーター遺伝子の発現誘導レベルに応じ、対応する各蛍光スペクトルの蛍光強度が強くなる。そのため、単に遺伝毒性の「ある／なし」を判定するだけでなく、誘導されたレポーター遺伝子の種類及び発現レベルにより、DNA 損傷、酸化ストレス、タンパク質損傷及び癌抑制遺伝子である p53 の活性化を介した一般的な細胞ストレスが区別できる。

2. 導入遺伝子と発現経路

導入遺伝子は、DNA 損傷系として突然変異に至る DNA 複製阻害性 DNA 損傷を検出する Bsc12-GFP および DNA 二本鎖切断を検出する Rtkn-GFP、酸化ストレス系として Nrf2 経路由来の酸化ストレス応答を検出する Srxn1-GFP および ROS (活性酸素種) 関連応答を検出する Blvrb-GFP、タンパク質障害系として小胞体ストレス応答を検出する Ddit3-GFP、p53 応答系として p53 活性化や細胞ストレス応答を検出する Btg2-GFP の 6 つである(下図)。



(OECD TG446A¹⁾の Figure 1 を引用)

- Bsc1-GFP レポーターは、ATR/Chk1 キナーゼ経路に依存しており、DNA 複製を阻害する DNA 付加物の形成によって活性化され、DNA 損傷応答の強力な活性化因子となる。複製阻害性 DNA 損傷は、しばしば突然変異の形成につながり得る。
- Rtkn-GFP レポーターの誘導は、DNA 二本鎖切断の誘導と関連しており、ATM/Chk2 キナーゼ経路の活性化に依存している。ATM キナーゼは、ヒストンバリエント H2AX のリン酸化にも関与している。H2AX のリン酸化型 (γ H2AX) は、染色体損傷性 DNA 損傷のレポーターとして一般的に使用されている。
- Btg2-GFP レポーターの Btg2 は、p53 依存性 DNA 損傷応答の構成要素であり、G1/S 細胞周期チェックポイントの調節に関与しているが、酸化ストレスを含む他のさまざまな細胞ストレス因子によっても誘導される。細胞内で高レベルの酸化ストレスを引き起こす化合物は、直接的または間接的に遺伝毒性を誘導する可能性がある。酸化 DNA 損傷の不十分または欠陥のある修復は、突然変異または染色体異常につながる。

間接的な遺伝毒性につながる酸化ストレスの誘導は、細胞内の 2 つの主要な抗酸化経路によって活性化される Srxn1-GFP および Blvrb-GFP レポーターによって検出される。

- Srxn1-GFP レポーターは、細胞の酸化ストレスによって強く活性化され、Nrf2 転写因子によって直接制御される。Nrf2 は酸化ストレス応答において重要な役割を果たし、さまざまな抗酸化遺伝子ネットワークの活性化に関与している。
- Blvrb はヘム代謝において重要な役割を果たすことが示されており、細胞の抗酸化応答と関連付けられている。Blvrb プロモーター配列には Nrf2 結合モチーフが含まれていないため、Srxn1 とは異なる酸化ストレス応答を反映している。化学物質への曝露後の小胞体ストレス応答の活性化は、アポトーシスの強力な引き金となり、DNA 切断や染色体断片化を引き起こす可能性がある。

- Ddit3 バイオマーカー遺伝子は、細胞周期停止、アポトーシス、および DNA 断片化と関連付けられている多機能転写因子である。小胞体ストレス応答の活性化は、Ddit3-GFP レポーターによって検出される。

■ 小胞体ストレス応答：細胞内の小胞体で折り畳み異常タンパク質が蓄積した際に、細胞がこれを感じ、修復・分解して恒常性を回復させる防御システム

3. 実験の流れ

親細胞株で用量設定試験を行った後に、96 ウェルプレートにて上記6種の細胞株に 5 段階に希釈した被験物質を暴露させ、±S9 代謝活性化系で 24 時間処理培養する。処理終了後にレポーター遺伝子の発現レベル(GFP)をフローサイトメトリーにて測定し、用量反応を含むデータ解析から毒性のメカニズムを推測する。なお、ToxTracker は、通常、3 回の独立した反復実験で実施される。

4. 特徴

従来の in vitro 遺伝毒性試験では突然変異試験(Ames 試験)、染色体損傷試験(小核試験、染色体異常試験)、DNA 損傷試験(コメットアッセイ)などを別々に行う必要があったが、ToxTracker は、DNA 損傷、酸化ストレス、タンパク質損傷、p53 応答などを 1 つのアッセイで同時に解析できる。微量(10~100 mg)の被験物質で評価可能であり、最短で 3 日間でデータが取得可能である。また、感度 87%、特異度 90%と優れ、偽陽性が少ないとされる。従来の試験が「結果として DNA に傷がついたか」を判定するのに対し、ToxTracker は「なぜ、どのように毒性が生じたか」という作用機序(MOA)を特定できるのが最大の特徴といえる。

5. 利用法

OECD TG では、「遺伝毒性レポーターBcl2-GFP と Rtkn-GFP は、化合物が遺伝毒性であるかどうかを判断するために使用できる。他のレポーターBtg2-GFP、Srxn1-GFP、Blvrb-GFP、および Ddit3-GFP の結果は、証拠の重み付け(WOE)アプローチにおいて関与する可能性のある直接的または間接的な遺伝毒性メカニズムに関する追加情報としてのみ使用できる。」としている。また、「ToxTracker は、2 つの遺伝毒性バイオマーカー遺伝子である Bcl2 と Rtkn の活性化に基づいて遺伝毒性を予測する。これらのバイオマーカーの発現の変化は、遺伝毒性の指標として考慮されるべきである。化学物質の遺伝毒性を正確に予測するためには、直接的および間接的遺伝毒性の両方を考慮する必要があり、そのためには 6 種類すべてのレポーター情報を統合して評価することが重要であると TG には記載されている。

ToxTracker は、遺伝子変異や染色体異常などの遺伝毒性エンドポイントを直接測定するものではないため、その遺伝毒性予測(陰性結果を含む)は、例えば Ames 試験(OECD 471)、HPRT 遺伝子変異試験(OECD 476)、TK 遺伝子変異試験(TG 490)、または in vitro 小核試験(OECD 487)を実施することで確認できる。」としている。そのため、ToxTracker は、従来の遺伝毒性試験の代わりではなく、遺伝毒性に関する早期スクリーニング、メカニズム解析、曖昧な結果や偽陽性が疑われる場合のフォローアップ、証拠の重み付けや有害事象発現経路(AOP)に基づくリスク評価への展開、動物代替法の一環、としての利用が期待される。

【編集者所感】

AOP/MOA ベースの NAMs が開発されているが、その実施には開発企業によるキット、細胞、試薬などの提供が不可分となっている。つまり、これまでの TG と異なり、材料はどこでも入手でき、プロトコルあるいは手技・手法を確立すれば誰でも実施可能なものから、キット等の入手が試験実施の前提となってきた。したがって、当該 NAMs 開発企業が継続して関連商品/材料を提供可能かどうか懸念される。事実、再構築ヒト表皮細胞を用いた in vitro 皮膚腐食性試験(TG431)³⁾における主要な試験法の 1 つの EpiSkin™は、現在、「No longer commercially available」とされている。アッセイキットの適切な使用に加え、継続的な提供が不可欠である。また、いわゆる遺伝毒性の AOP/MOA に基づいた NAMs は ToxTracker 以外も開発されている。TG446A の番号から推察されるように、将来的には 446B、446C として関連する NAMs のガイドライン化を図る計画なのであろう。

【参考文献】

- (1) OECD TG446A, ToxTracker gene reporter assay for the identification of genotoxic hazard and genotoxic/non-genotoxic mechanism of action, 2 July 2026, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2026/07/test-no-446a-toxtracker-gene-reporter-assay-for-the-identification-of-genotoxic-hazard-and-genotoxic-non-genotoxic-mechanism-of-action_c74f58cd/f2d51b5b-en.pdf
- (2) Toxys 社、<https://toxys.com/toxtracker/> あるいは <https://www.toxys-japan.com/>
- (3) OECD TG431, In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, 25 June 2025, https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2019/06/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method_g1g6ed0a/9789264264618-en.pdf

本記事では、NITE ケミマガ等で配信された情報の中から、国際的に注目されているトピックを取り上げ、概要を紹介しています。

本概要は、公開されている情報を基に編集者がまとめたものであり、最終的なご判断は読者の皆さまにお任せいたします。詳細については必ず情報源をご確認ください。