

毒性概念の変遷と毒性試験の動向

大沢基保

Conceptual Shift of Toxicity and Current Vision of Toxicity Testing

Motoyasu OHSAWA

Toxicity of chemical substances to humans is considered as inherent property of an agent to cause an adverse biological effect on human health. It has been evaluated at non-clinical stage by toxicity testings mainly using animals. Recent development in life science at cellular and molecular levels, however, promotes to innovate new toxicity testings under adverse outcome pathway (AOP) for regulation. It also makes us distinguish toxicity from adversity. Moreover concept of target toxicity should be differentiated between chemical substances and drugs. Particularly novel biotechnology products change concept of toxicity targets and availability of animal experiments. Toxicity testings should be reorganized in response to such changes in meaning of toxicity. This review will cover recent conceptual shift of toxicity and the prospects for future development of toxicity testings.

はじめに(毒性とその評価)

生活環境中の諸物質のヒトの健康への有害性は、リスク(危険度)として評価される。リスク評価(Risk assessment)は、対象物質の1)ヒトの健康への有害性の確認と2)その有害性の量-反応評価、3)ヒトへの実際の暴露評価、および4)その物質による有害影響発生のリスク推定、の4つのプロセスからなる^{1,2)}。はじめの2つの段階は有害性評価に関することであり、物質の毒性評価(Toxicity assessment)が基本となる。

安全性評価という言葉があるが、化学物質に関して考えると有害性評価と安全性評価は表と裏の関係であろう。生活環境物質や食品成分のように暴露が避けがたい物質や原材料となる新規な物質のリスク評価は、有害性評価がまず必要となる。一方、暴露の経路や量を限定しうる医薬品、医療材料・機器、食品添加物などの製品のリスク評価は、有害性がコントロール可能な範囲内であることを確認する作業といえる安全性評価が目的である。生活環境中の諸物質の有害性評価/安全性評価は毒性試験による毒性評価に基づくため、毒性試験は欠かせない。

毒性試験が対象とする毒性とは、多様な意味で使われてきたが、一般には生物に傷害、機能障害、致死などの有害影響(Adverse effect)を生じる物質の性質やその能力、と説明されてきた^{3,4)}。WHOのIPCS(国際化学物質安全性計画)事業によるリスク評価関連用語でも、毒性は「有害な生物影響を引き起こす物質に固有の性質(Inherent property of an agent to cause an adverse biological effect)」とされている¹⁾。いずれも毒性を物質に固有の性質として定義している。以前は毒物学と訳されていたToxicologyは、今日では毒性の特徴や強さなどを研究する毒性学として、個体レベルでの一般毒性や細胞レベルでの毒性に関する毒性試験を中心に発展してきた。近年、リスク評価による有害性評価と有害因子の規制の重要性が増すにつれ、毒性試験による毒性評価はレギュラトリーサイエンス(評価/規制科学)の重要な要素となっている。それに伴い毒性の捉え方は、基礎的な有害性検索段階(物質の毒性反応誘発能を検索)と実用的なリスク評価段階(動物実験や臨床/疫学試験などで個体やヒト集団での有害影響度を検証)とで異なってきた。

近年の生物科学やバイオテクノロジーを含む物質科学の展開は、対象物質の種類や用途の多様化

や毒性試験の進歩をもたらし、毒性の具体的内容も個体・器官から細胞、分子レベルの事象にまで深められてきた。それらの変化に応じた新しいヴィジョンとして21世紀の毒性試験は、1)化学物質の特性解明(Chemical characterization)、2)毒性経路分析(Toxicity pathway assays)と標的試験(Targeted testing)からなる毒性評価試験、3)量-反応関係解析とモデルによるヒトへの外挿、の各要素から構成されることが提唱された⁵⁾。さらに、新技術を基に生産される新規物質や医薬品の毒性の評価や規制のための安全性科学も、科学分野の新しいカテゴリーとして捉えられはじめた⁶⁾。

ここでは、諸物質のヒトへの健康影響に関する毒性概念の変化をたどり、非臨床段階の毒性試験との関係を中心に毒性評価の展望を試みる。

1. 毒性物質と毒性

1.1 すべての物質は毒性を生じうる？

(量-反応関係)

毒性に関連する用語が近年増えている。まずそれらを毒性の基礎概念に照らして少し整理してみたい。

生命活動に有害な影響を与える物質は毒性物質(Toxic substance)と総称され、その特性を毒性(Toxicity)という。極少量の摂取でも重篤な毒性を示すものを一般に毒物(Poison)と呼び、健康被害の経験から特に注意が喚起されてきた。毒性物質のうち、生物由来のものを毒素(Toxin)、それ以外の自然あるいは人工由来のものを有毒物質(Toxicant)とに分けることがある。Toxicologyの祖と称されるParacelsus(パラケルスス、16世紀)は、「すべての物質は有毒であり、ある物質が毒物でないのは単にその用量によるものである」と唱えた。以来、すべての物質は生体に摂取された量に応じて毒性を示しうると考えられ、量-反応関係(Dose-response relationship)は毒性評価の基礎概念となっている。ここで注意すべきは、量-反応関係とは、物質(量)-生体(反応)関係に関する概念である。

(1)毒性反応(Toxic response)：毒性評価の量-反応関係における反応とは、物質の毒性に対して生じる生体反応のことである。生体の恒常性を回復しうる範囲内の生体変化は単なるストレス反応

あるいは適応反応であり、回復できない程度や質の生体変化が生じた場合、毒性反応となる。毒性発現の過程が分子レベルで研究されるようになり、毒性とは一定の暴露条件で毒性反応を生じさせる物質固有の性質であり、生体側の毒性反応とは本来区別されている。しかし、量-反応関係ではそれらは密接に関連するため、その区別は必ずしも明確ではない。また、量-反応関係は、従来は生体にとっては異物の暴露による影響を主対象としてきたが、今日では生体物質やその類似物質が医療や保健目的でヒトに投与あるいは摂取されるようになり、それらの影響も対象とする必要が生じている。この場合の量と反応については、生体での存在量やその生理的反応を考慮する必要がある。

(2)毒性感受性(Toxic susceptibility)：同一物質でも毒性反応の量-反応関係は、生物種、同種内の個体や性などの差、個体内でも細胞種や器官によって異なる。このような毒性出現における差は、生体側の毒性感受性の差とされる。すなわち、毒性の発現は、物質に固有の物性と生体への暴露条件(暴露経路・形態・量など)と、その物質に対する生体の生理・生化学的、遺伝的な反応条件(体内動態、代謝、共役因子・受容体の有無など)による毒性感受性)によって規定される。このため、毒性評価には、対象となる暴露条件に応じた各種生物試験系による毒性試験が必要とされる。

1.2 選択毒性

ある物質の毒性が、特定の生物種に対してのみ毒性影響を生じることがある。この生物種による毒性影響出現の差を選択毒性(Selective toxicity)と言う⁷⁾。選択毒性は、生物種や生体の細胞・組織種に固有の有毒物質の代謝(代謝活性化や解毒代謝)能力の差や、その物質の作用部位での受容体の有無や親和性の差などの宿主の感受性要因に起因している。

この考え方を利用して有機リン系殺虫剤が開発された。この殺虫剤は、ヒトや動物では有機リン構造が容易に代謝分解されるが、駆除対象の昆虫では代謝されにくい。そのため、量-反応関係の差に従って昆虫では選択的に毒性反応(アセチルコリンエステラーゼ阻害)が現れやすい。ヒトや家畜とそれ以外の生物の代謝能の差による選択毒

性は、農作物の有害生物やヒトの病原体の排除のための農薬や、抗菌薬・寄生虫駆除薬などの開発原理に利用された。さらに、ヒトではがん細胞のような異常細胞と正常細胞との間の選択毒性として、化学療法剤の開発に応用された。今日まで、化学合成薬やバイオ医薬による薬物治療では、程度の差こそあれ、種々の疾病において病原細胞の選択的排除が必要な場合は、この選択毒性の考え方が適用されてきた。

ヒトと身近な動物種の間では、食物成分による中毒にも選択毒性がみられる。タマネギ、ニンニクなどのネギ属に含まれる有機イオウ成分は、ヒトでは通常は無害だが、イヌ、ネコ、ウサギなどでは溶血性貧血などの中毒症状を起こすことがある。この逆の事例もあるので、ヒトへの毒性影響を動物実験で調べる場合は、ヒトと用いる動物種との間の選択毒性の有無に気をつける必要がある。

1.3 標的

特定の物質の選択的な作用部位を標的(Target)という。その部位が特定の器官や組織であれば標的器官(Target organ)となり、特定の細胞や生体分子であれば標的細胞/分子(Target cell/molecule)となる。近年この標的の概念は、医薬の開発においては特に重視され、医薬の及ぼす標的効果(Target effect)、すなわち薬効(Efficacy)がより選択的であることが目標とされた。さらに、分子生物学の発展に伴い、標的は分子レベルでも捉えられ、特定の受容体分子や分子構造部位を標的とする分子標的薬や核酸医薬などが出現してきた。このような標的効果を発現する物質の特性は、生物種、同一個体内の組織、細胞のレベルでは選択性>Selectivity)と、細胞成分・分子レベルでは特異性(Specificity)とに区別されている⁸⁾。

また、薬物効果の対象となる標的を薬効標的(Efficacy target)とし、毒性物質の毒性標的と区別する考えもある⁹⁾。ある薬物の薬効は、特定の一つの標的に限定されるよりは、複数種の標的が関与する複合的薬理効果(Polypharmacological effects)として効能が生じることが多い。一方、毒性物質の場合は全身的な影響を示すことが多いが、メチル水銀の中樞神経障害のように特定の器官に顕著な影響が表れるとき、それを毒性標的(Toxicity target)の一つと見なしている。現在の

ところ、選択的な毒性影響は主に器官レベルの器質や機能の障害として検出されることから、標的器官が毒性標的として扱われることが多い。

1.4 医薬品と毒性

医薬品は、特異的な効果を期待する本来の標的(On-target)とは異なる組織/細胞/分子(Off-target)にも効果を及ぼすことがある。核酸医薬や分子標的薬などの開発過程でその発生頻度が高いことから、分子レベルの標的では特異的効果の確保が大きな課題となっている。このため近年、薬物では本来の目的とする標的部位への効果をオン・ターゲット効果(On-target effect)、それ以外の部位への効果をオフ・ターゲット効果(Off-target effect)と称し、分けるようになった。オフ・ターゲット効果は副作用(Side effect)であるが、通常は治療目的に適さない有害影響(因果関係を問わない場合は有害事象, Adverse event)と解されている。

医薬も過量に用いると本来の薬理作用の標的に対しても毒性を示す。このため、医薬の有害な副作用はオン・ターゲット毒性(On-target toxicity)とオフ・ターゲット毒性(Off-target toxicity)に分けて論じられる¹⁰⁻¹²⁾。オン・ターゲット毒性は多量の薬物暴露により標的の構造や機能に過大な薬理効果による有害影響や非特異的な有害影響が発生する場合で、一般に用量依存的に毒性が発現する。オフ・ターゲット毒性は、本来の標的と生物学的な関連があるか、あるいは全く関連がない他の標的の変調により有害影響が生じる場合である。この例として、免疫抑制薬であるシクロスポリンAやタクロリムスによる高血糖があげられる。これら薬物の薬効を仲介する特異的受容体タンパク質は、薬効標的であるTリンパ球以外に脾臓のランゲルハンス細胞にも存在するため、インスリンの産生を阻害してオフ・ターゲット毒性として高血糖を生じる。これらを含め薬物の毒性については、その機序から5つのカテゴリー(オン・ターゲット毒性、過敏症および関連免疫反応、オフ・ターゲット毒性、毒性代謝物への生物活性化、特異体質毒性)分類が提起されている¹⁰⁾。

副作用とされたオフ・ターゲット効果から、適応外の薬効や新たな創薬の標的の発見につながることもある。既存薬のオフ・ターゲット効果を新たな

薬効として適応拡大に結びつけること(既存薬再開発, Drug repositioning)は創薬の方法の一つになっている。その一例として、かつて鎮静・催眠薬として妊婦に用いられたサリドマイドがあげられる。サリドマイドは妊婦においては催奇形性の副作用のため禁止されたが、その後ハンセン病結節性紅斑や多発性骨髄腫に対する薬効が知られ、妊娠期およびその可能時期を除いてそれらの治療に用いられている。このように、医薬の標的による毒性分類は、その適応目的によって変わりうる。

1.5 化学物質と毒性

標的によるオン/オフ・ターゲット毒性の分類は、化学療法剤や生物製剤の開発のために適用されているが、生体異物であるより広範な化学物質による生体毒性の分類にも用い得るとする説もある¹³⁾。しかし、生体異物である生活化学物質や環境汚染物質については暴露量や標的が未知であるか明確でないことが多い。

食品、生活化学用品や生活環境中の化学物質の毒性評価は、標的が未知の場合はその特定が前提となる。さらに、標的器官には標的となる細胞や標的分子が存在することも前提である。一般に、暴露された化学物質の体内濃度が最も高い部位がその物質の標的器官となると予想されるが、それと異なる部位が標的器官となることも多々知られている。つまり、生活環境中の一般の化学物質の毒性は、化学物質やその代謝物の物理化学的性質(物性)と、その作用の標的となる細胞器官や生体膜、代謝経路などへの効果(生物活性)に関係するからである。

このため、一般の化学物質の毒性評価は、基礎的な物性評価と、毒性試験による新規毒性の検出も含めた標的と毒性影響の探索と、標的の毒性影響に関する量-反応関係の確認が基本となる。総合的なリスク評価は、この毒性試験に暴露条件を加味して判断される。

1.6 バイオ物質と毒性

バイオテクノロジーの発達によって、治療用の抗体、核酸、遺伝子、細胞などの新規医薬が急速に開発されている。また、遺伝子組換え技術によって生産された食材とその成分、それらの加工品の利用も増えている。これらバイオ物質は、ヒトや動植物の生体物質と同一か同質の類似物質であり、一般の化学物質に比べ反応の特異性が高い。

抗体や生理活性分子などのタンパク質医薬は、低分子医薬のようなオフ・ターゲット毒性を示す可能性は低いが、その生理機能の過剰により免疫的、生理的ホメオスタシス(恒常性)を乱して有害影響をもたらすことになる。これは、物質に固有の物性としての毒性とは異なり、物性として生体物質との不適合性や、オン・ターゲット効果である生物活性のバランス攪乱によるホメオスタシスの破綻、というような新たな毒性とその影響の概念をもたらした。

2. 毒性概念の変化と毒性試験

2.1 毒性の評価(ToxicityとAdversity)

Toxicologyは化学物質の毒性を予測評価するための科学として発展してきたが、対象となる物質の種類や用途の多様化や、個体から細胞、分子レベルの事象にまで深められてきた毒性指標やハイスループットの*in vitro*試験やコンピューターモデルの導入などに応じて、毒性の捉え方が分化しつつある(表1)。また、リスクの有無の評価を試みる基礎科学の視点と、リスクの制御のためにリスクの程度を評価する実用科学の視点でも、毒性の捉え方が分化しつつある。例えば、「有害な生物影響」とは、一見明らかな急性障害から細胞や分子レベルの生体恒常性の攪乱影響までも含むようになった。これに伴い諸物質の毒性評価も、細胞や分子レベルの反応(毒性反応)から有害反応(Adverse response)、それに基づく組織や個体さらには集団レベルに出現する有害影響あるいは有害事象に区別されるようになった¹⁴⁾。

近年、化学物質暴露をはじめ種々のストレス因子による炎症の出現は、細胞レベルのストレス反応や防御反応を経たホメオスタシスの乱れや破綻による結果として捉えるべきことが指摘されている¹⁵⁾。化学物質に対する毒性反応から有害影響の出現の過程も、ストレス反応に始まる一連のプロセスを含むものと考えられる。一方、ヒトにおける影響を有害か否か識別するリスク評価の観点から、有害影響の種類や程度をAdversity(有害性)として論じるようになってきた¹⁶⁾。また、リスク評価の観点からは、対象物質の暴露から毒性反応の誘発、それに伴う有害影響の出現までの一連の経過であるAdverse Outcome Pathway(AOP:

有害転帰経路)を毒性評価の論理的根拠として重視するようになった(図1)¹⁷⁾。毒性の研究が定性的なものから定量的なものへ、また、有害影響の観察記述から分子機構の解明へと発展する経過の中で、ToxicityとAdversityは連続する個別の概

念とされつつある。

2.2 毒性発現経路

有害物質の暴露により個体に有害な影響が生じるリスクを予測するために、各種の毒性指標とそれを用いた毒性試験が提案されている。OECD

表1 化学的性質による毒性の分類

分類	毒性の特徴	毒性反応例	有害影響(直接影響)	物質例
物理化学的性質				
①高浸透圧	非特異的	細胞膜破損, タンパク質変性	細胞死, 炎症	塩化ナトリウム
②強酸/アルカリ性	非特異的	細胞膜破損, タンパク質変性	細胞死, 炎症	硫酸, 塩酸/水酸化ナトリウム
③強酸化/還元	非特異的	細胞膜破損, タンパク質変性	細胞死, 炎症	オキシダント/硫化水素
④難溶性	蓄積部位特異的	物理化学的刺激	肺線維症, 中皮腫	アスベスト, 二酸化ケイ素
化学反応性				
①親電子性物質による共有結合	リガンド特異的(低特異性)	核酸塩基やタンパク質修飾・付加	細胞死, 核酸・酵素機能阻害, 増殖増殖阻害	アルキル化剤, 多環芳香族炭化水素類
②オキシダント/ラジカルによる過酸化	リガンド特異的(低特異性)	核酸/タンパク質/脂質の機能阻害, タンパク質・脂質の過酸化	細胞死, 核酸・酵素機能阻害, 増殖増殖阻害	オゾン, 塩素ガス, バラコート
③SH基親和性物質による配位結合	リガンド特異的(低特異性)	タンパク質の機能阻害/修飾	酵素・タンパク質機能の阻害, アレルギー性接触皮膚炎	水銀, 鉛などの重金属塩, アレルゲン
生化学的反応性				
①受容体への結合				
i) 受容体活性化の阻害/亢進	特異的	受容体のシグナル伝達阻害/亢進	炎症, 免疫/内分泌/神経異常, 酵素活性阻害, 神経毒性	有機リン系殺虫剤
ii) 毒性物質の仲介	細胞受容体への結合を介して標的分子に結合・作用. 高特異性	遺伝子活性化/発現阻害	内分泌攪乱, 免疫毒性	環境エストロゲン, ダイオキシン類, シクロスポリンA
②抗原抗体反応	特異的	タンパクの生物活性阻害, 免疫反応誘発	アレルギー, 自己免疫	食物アレルゲン, 抗体等タンパク医薬

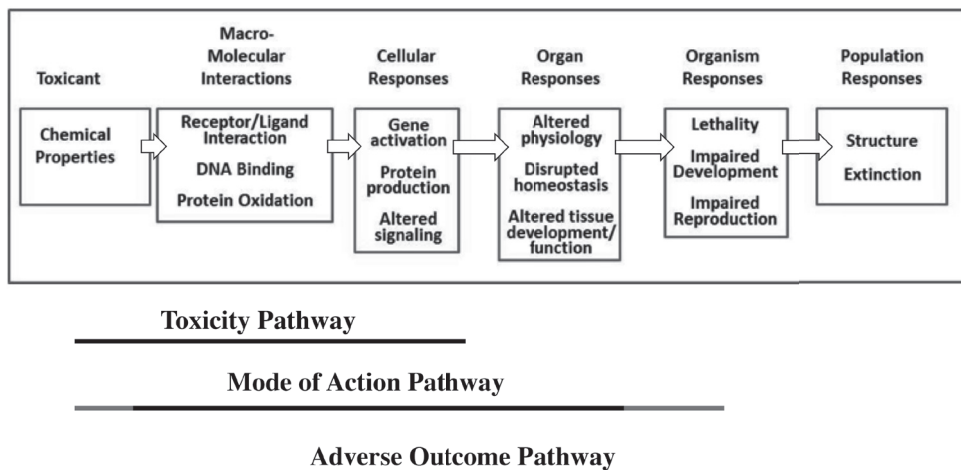


図1 Adverse Outcome Pathway (AOP) 概念の模式図

(文献14の図を一部改変)

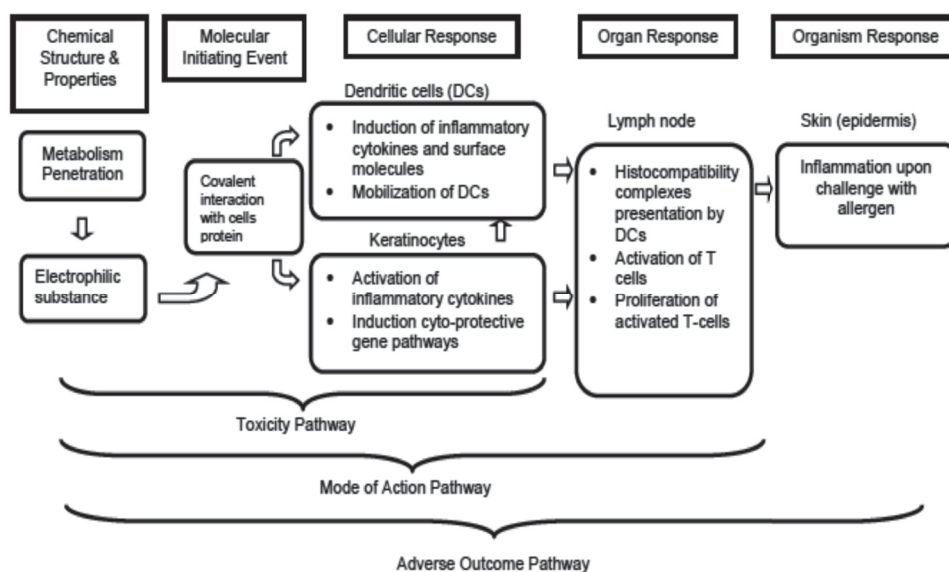


図2 皮膚感作に至る経路のフローチャート
(文献18から引用)

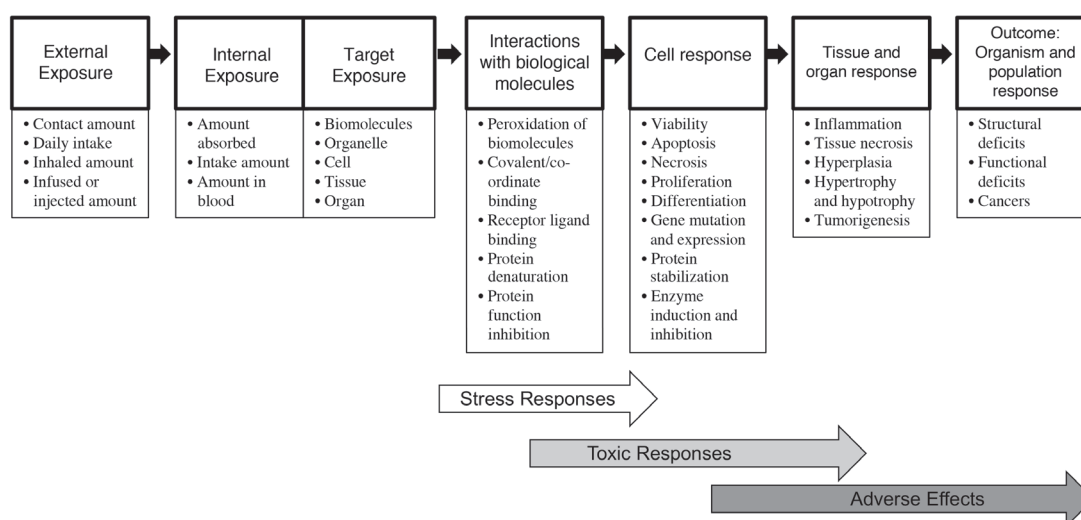


図3 ストレス反応から有害影響への毒性移行に関する暴露－影響連関 (Exposure-to-outcome continuum)
(文献2の図を一部改変)

では化学物質の規制のためにそれらの毒性試験を用いるためには、毒性指標をAOPのプロセスに位置付けて、その意義を明確にすることを求めている。その具体例として皮膚感作性試験の各バイオマーカーの毒性発現経路における位置付けが、AOPとして示されている(図2)¹⁸⁾。また、種々の関連科学の発展に伴い、化学物質の暴露に始まり、個体や人口集団における有害事象の出現に至るプロセスは、暴露－影響連関 (Exposure-to-outcome continuum, 図3)²⁾として整理されている。その連関では、物質の暴露条件が毒性の発現を左右す

る重要な要因であることから、暴露に関する新分野として暴露科学 (Exposure science) が分離形成されている。

2.3 物性としての毒性

AOPの初期段階である毒性反応の過程では、毒性を有する物質は標的となる生体分子や細胞に作用する。ある物質が接触部位において生体分子や細胞に影響し、その分子や細胞の機能維持に不利な不可逆的な変化を生じるとき、その物質は毒性を有するとされる。そのような毒性反応を生じる物質の性質にはどのようなものがあるだろう

か。これには、物質の異常濃度による細胞環境の浸透圧や酸塩基性、酸化還元性などの物理化学的性質の変化による非特異的な毒性があげられる。この場合、細胞膜の破損やタンパク質の変性などの細胞構造の変化により、細胞死や組織変性などの有害影響が生じる。このような物理化学的性質による毒性は、通常は物質の高濃度暴露で生じる非特異的なものである。高濃度暴露は、通常体外の物質環境に直接曝される消化器、肺や、体内への吸収や排泄の過程に関わる肝、腎などの上皮組織で起こるが、これらの組織では機能維持のために損傷細胞の速やかな補充回復が起こる。その回復能力を超える細胞死がもたらされると、毒性影響として有害性が生じる。

細胞損傷による細胞死が顕著でなくても正常な生理機能の攪乱が生じうる。細胞膜のイオンチャネルやイオンポンプが種々の物質に影響されると、神経毒性が生じうる。DDTのナトリウムチャネルの阻害による神経毒性や、各種の有機溶媒の非特異的な膜効果(脱分極)による中枢神経抑制は、この例にあたるだろう。

一方、化学的な性質により、特定の分子に親和性が高く反応する場合がある。タンパク質や核酸などの生体高分子では電子密度の高い部位を持つことが多い。親電子性が強い物質は、細胞の核酸塩基やタンパク質側鎖のSH⁻, NH₂⁻, OH⁻基のような親核部位に共有結合により付加体を形成し、核酸やタンパク質の機能を阻害する。親電子性が低い化学物質でも、肝臓などで代謝されて親電子性物質になると、代謝活性化と言われるように生体高分子に付加して毒性を示す。また、ラジカル形成物質は細胞膜の脂質を過酸化する。その結果、酵素タンパクの機能阻害や細胞増殖、免疫反応を障害する。このような物理・化学的な物質の特性は、接触する細胞や生体成分に非特異的に作用し、細胞傷害などの非特異的な毒性として発現する。これらは、直接暴露による短期毒性として多くは検出される。しかし、細胞のDNAに生じた障害が修復されうる場合、修復ミスによる突然変異が定着すると、細胞死以外の細胞のがん化や遺伝子障害などの有害影響に発展しうる。また、アスベストのように体液への溶解度が低い固体物質は、局所に蓄積して物理化学的的刺激を繰り返し、蓄積部位

に選択的であるが非特異的な毒性を生じる。

2.4 生物活性としての毒性

暴露された物質が、標的に存在する受容体分子のリガンドとして結合し不可逆的化学反应を生じる場合は、特異性の高い毒性が発生する^{2,10)}。受容体(Receptor)は、体内外からの物理的あるいは化学的な刺激を受けとる分子やその複合体のことで、刺激の細胞や組織へのシグナル伝達に関わる。受容体は、細胞外に存在するものもあるが、多くは標的細胞の表面や細胞質あるいは核内に存在する。このような受容体との結合による特異的毒性は、典型的なりガンド物質と比べて構造活性相関により検索される場合もあるが、一般には種々の生物活性測定系を用いた毒性試験によって、本来の生物活性の拮抗/非拮抗的な阻害、生物活性の異常(異常亢進あるいは質的变化など)やそれによる有害影響から検出される。

生物活性としての毒性は、受容体の活性化が細胞の生理機能に直結する場合と、受容体が暴露物質の細胞内の標的部・分子への運搬役である場合とで異なる。後者の場合は、有害物質が一次的な標的である細胞受容体に結合してその生物活性シグナルに異常を生じ、これを介して二次的な標的部に連鎖的に有害影響を生じるものである。これらの生体反応機構に従って発現する毒性をシグナル毒性(受容体原性毒性, Signal toxicity)とする概念が提唱されている¹⁹⁾。薬物による肝細胞障害に炎症性サイトカインの攪乱のように複数のシグナル毒性が関わる時、ネットワーク毒性(Network toxicity)と称している場合もある²⁰⁾。シグナル攪乱による免疫系、内分泌系、神経系などへの有害影響は、生活環境のリスク評価の今日的課題になりつつある。バイオテクノロジーやナノテクノロジーによる新規医薬品では、それらによるシグナル攪乱を介した免疫系への有害影響が、毒性評価の課題になっている²¹⁾。

2.5 生体恒常性維持機能の攪乱としての毒性-システム毒性

生体異物暴露によるストレスに対し、ヒトの健康は体内の生理的、生化学的、免疫的な防御機能によってその恒常性(ホメオスタシス)が保たれる。化学物質によって異常な生物活性が誘導される場合でも、その変化が生体機能の回復・修復といった生体防御

能力の範囲内であれば、生体機能の恒常性は保たれて有害影響は生じない。化学物質の毒性による変化が特定の臓器器官のホメオスタシス維持の能力を超え、その機能に有害影響が生じる場合、これを標的器官毒性(Target organ toxicity)と称する。また、その影響が発生や生殖、免疫などに関わる器官システムに及ぶ場合は、器官システム毒性(Organ system toxicity)と称することもある²²⁾。

免疫機能の攪乱により、時間を経て感染や発がん、さらにアレルギーや自己免疫のような有害影響を生じることがある。これは免疫系への毒性反応(免疫毒性)の累積による防御反応の抑制/亢進や過誤によるものである。これらは代謝系、内分泌系、神経系、免疫系などの恒常性維持機能の攪乱により有害影響を生じる一例で、ホメオスタシス維持のネットワーク毒性あるいはシステム毒性とも言えよう。

ホメオスタシスには、全身レベル、組織レベル、細胞レベルの維持機構がある¹⁵⁾。全身レベルでは体温や体液・血液のイオンバランスやpH、栄養成分濃度などの体内環境について、組織レベルでは組織構造や構成細胞の組成や代謝機能について、細胞レベルでは細胞成分組成やpH、膜電位などの細胞内環境について、それぞれ恒常性が維持されている。恒常性の維持には環境変化の監視・検知が必要であるが、全身ホメオスタシスは内分泌系-自律神経系が、細胞ホメオスタシスは熱ショックに対するHSF-1のようなシグナル伝達タンパク質がセンサーの役割を担っている。組織ホメオスタシスでは、組織常在のマクロファージやマスト細胞などの免疫細胞や体性感覚神経などのセンサーを除き多くは不明である。細胞や組織の傷害や、病原体やアレルゲン、毒素の侵入の場合は、死細胞の遊離成分や侵入因子の構成成分などのDanger signal(危険信号)が、刺激として樹状細胞などの免疫細胞に感知されると、ストレス反応あるいは免疫系による生体防御反応が働く。この結果、炎症反応を介して異物排除と組織修復がなされ、恒常性が維持される。この刺激が持続的であると慢性炎症に発展し、有害影響を生じることになる。

一方、生体に有害影響を生じる毒性物質の暴露の場合、生体の反応は回復可能な反応(Reversible response)、有害反応(Adverse response)、適応

反応(Adaptive response)の3つに分けられる²³⁾。すなわち、毒性物質の暴露により生体に生じたストレス反応は、物質の質と量に応じて回復可能な反応→毒性反応→有害反応または適応反応に発展するとされる。さらに、生体側に生理的あるいは遺伝的な感受性要因が存在するときには、有害反応が増大し有害影響の重篤化をもたらすことになる。暴露から有害影響出現までの生体反応は、急性中毒の場合には、暴露→炎症反応→有害反応→障害・疾病・死のプロセスを、慢性中毒の場合には、化学ストレスの反復・継続によりプロ炎症反応、炎症反応の繰り返しを経て、暴露→ストレス反応→プロ炎症反応→炎症反応→有害反応→障害・疾病・死のプロセスをたどると考えられる。

3. 毒性試験の進歩

生活化学物質の増加に伴い、その毒性と有害影響の事前予測が重視されるようになった。レギュラトリーサイエンス分野では各種の毒性試験項目が毒性/安全性評価基準として体系化された(表2)。表中の毒性試験の項目名は、対象物質の暴露/投与形態により急性毒性や亜急性～慢性毒性あるいは単回投与毒性、反復投与毒性などの表現が用いられている。

3.1 バイオマーカー

ある物質の毒性評価は、通常実験動物モデルでの毒性試験で一般の毒性影響(生死、臨床症状、体重変化、各臓器の病理観察、血液学的指標の変化など)の観察とその発現の用量-反応関係の測定から推測されてきた。その後、毒性の標的の概念が形成されるに従い、標的となりうる各器官別にその機能に対する毒性試験項目が加えられた。職業環境や一般生活環境では、有害物質の暴露状況が未知かつ多様で、また暴露から毒性反応、有害影響出現までに長期間を要することが多いため、ヒトでの暴露と反応状況の早期検出と早期の防止対策が重視される。そのため問題となる化学物質について、ヒトへの暴露(Exposure)、影響(Effect)、影響の感受性(Susceptibility)に関する各種のバイオマーカー(Biomarker、この場合は生体指標のこと)が開発され、その変化から原因物質とその有害影響の関係が推定されるようになった(図4)²⁴⁾。生活化学物質の毒性予測・評価のための非臨床毒

性試験でも、迅速かつ低コストと予測性の高い指標を求めて、ヒトのバイオマーカーの利用や新たなバイオマーカーの開発が行われた。

3.2 動物実験の3Rs原則

実験動物を用いた毒性試験は、毒性未知物質の毒性検索におけるゴールドルールとされてきた。実験動物種によっては対象物質についてヒトの場合に相当する標的や受容体がないか感受性が著し

く異なる場合、あるいは対象物質に由来する毒性代謝物の産生状況が異なる場合などでは、動物実験の必須性の根拠は乏しくなる^{25,26)}。種々の急性炎症における遺伝子発現状態が、その疾病状態のヒトとマウスモデルで一致しないことが多いことも指摘されている²⁷⁾。少なくとも、分子レベルの毒性反応では種差がかなりあることに留意すべきである。このため毒性試験結果の証拠価値には、

表2 化学物質別の各種毒性試験(非臨床試験)

(表中の○印は各物質別の適用試験項目を示す。)

規制担当機関(国内/国際) 物質分類	厚労省・通産・環境省/OECD 化学物質(化学品) ¹⁾	厚労省/JECFA 食品添加物	厚労省/ICH 医薬品	厚労省/ICH バイオ医薬品	厚労省/ISO 医療機器
試験項目					
毒性試験(医療機器の場合は生物学的安全性試験)					
①急性毒性	△急性毒性	○急性毒性*	○単回投与毒性	○単回投与毒性	○細胞毒性
②亜急性/亜慢性毒性	○反復投与毒性 (28日, 90日)	○亜急性毒性 (短期毒性)	○反復投与毒性 (1~6ヵ月)	○反復投与毒性 (1~7ヵ月)	○亜急性全身毒性
③がん原性・慢性毒性	○がん原性・慢性毒性	○発がん性/1年間反復投与毒性 (長期毒性)	○がん原性	○がん原性	
④生殖毒性	○生殖/出生前発生毒性	○生殖/出生前発生毒性	○生殖発生毒性	○生殖発生毒性	
⑤遺伝毒性	○遺伝毒性	○遺伝毒性	○遺伝毒性	○遺伝毒性	○遺伝毒性
⑥皮膚感作性/免疫毒性	△感作性		○免疫毒性	○免疫毒性	○感作性 [#]
⑦安全性薬理	○一般薬理	○一般薬理	○薬理試験	○安全薬理	
⑧その他の試験	△刺激性(皮膚, 眼) △腐食性	○アレルギー性 (抗原性)	○光安全性評価	○免疫原性 ○局所刺激性	○刺激性 ○埋植 ○発熱性物質 ○血液適合性
生体内運命試験(暴露評価)					
①物質動態	○毒物動態	○体内動態	○薬物動態/ トキシコキネティクス ○反復投与組織分布	○薬物動態/ トキシコキネティクス ○反復投与組織分布	
関連する国際試験法ガイドライン	OECD TG400 Series	CODEX STAN 192-1995	ICH S1~9	ICH S6	ISO-10993

¹⁾化審法・REACH対象となる新規化学物質。△REACH対応の追加試験項目。

*日本の基準には記載なし、()内はJECFAの項目名称。

[#]生体との接触があれば接触部位によらず実施されるべき項目。

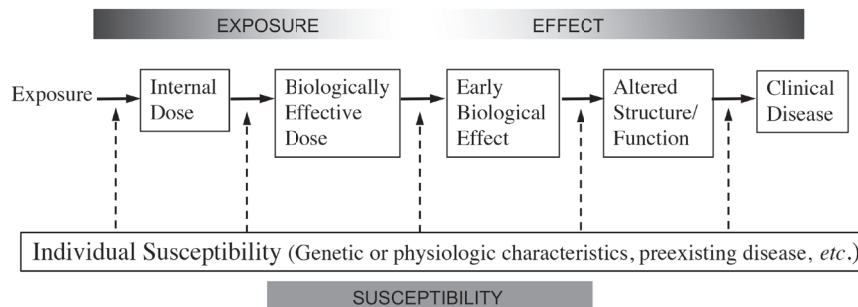


図4 各種バイオマーカー種(枠内記載)の毒性影響発現過程における関係略図

実線の矢印は次過程のマーカーへの進行を示している。破線の矢印は個体の感受性が毒性影響の進行度合に影響することを示している。(文献24の図を一部改変)

量－反応関係と種間での毒性作用様式の一致の程度が、重要とされている²⁸⁾。

一方、1959年に英国の研究者(RusselとBurch)が動物福祉のために動物実験の代替(Replacement)と使用動物数の削減(Reduction)、動物に与える苦痛の改善(Refinement)という動物実験の3Rs原則(3Rs concept)を提唱した。この考えが近年普及し、動物実験による毒性試験でも動物使用基準に取り込まれている。しかし、使用動物数を安易に削減すると動物実験の再現性が悪くなり、結局実験を繰り返すため動物数の削減にならない可能性も指摘されていた²⁹⁾。現実一般の動物実験では統計学的に適切な数が用いられない傾向が増えたことから、結果の信頼性に問題が生じている³⁰⁾。さらに、動物数の削減とともに苦痛の改善の試みも進んでいる。一例をあげると長期間にわたる皮膚感作性試験に代わる短期間の試験法として、局所リンパ節試験(LLNA)³¹⁾が開発・実施されている。

3.3 代替試験法

3Rs原則に沿って動物数の削減と苦痛の改善に加えて、動物個体を用いない毒性試験の代替法(Alternative test methods: *in vitro* 試験系や*in silico* 試験系)の開発も進み、レギュラトリートキシコロジー分野でも数多くの試験系が提案されるようになった。*In silico* 試験系では、既知化学物質の毒性データベースを参照し、新規化学物質の物性や構造活性相関(SAR or QSAR)を考慮してコンピューター上で毒性を予測する。バイオインフォマティクスの一分野である。この場合は、実際の生体系で有害影響が生じるか動物実験などで最終的に確認する必要がある。そのため、*in silico* アプローチによる毒性評価を規制行政に適用するには課題が多いが、DNA反応性不純物のように化学反応性が直接に関わる遺伝毒性試験では、復帰突然変異試験に代わる*in silico* 試験の適用が有望視されている³²⁾。一方、新規開発の抗体医薬や再生医療製品などはヒト種特異性が顕著なため、従来の小動物を用いた試験では非臨床段階の毒性/安全性評価は難しい。そこで、各種のヒト細胞や組織を用いた*in vitro* 試験系や、ヒト細胞を生着させた免疫不全マウス(例：NOGマウス)やヒト遺伝子を導入したトランスジェニック動物のようなヒト化動物を用いた毒性評価試験

のニーズが高まっている。*In vitro* 試験系では複数種のヒト細胞株を系統的に用いたBioMAPのような優れた試験系が開発されている⁶⁾。ここで留意しなければならないのは、現在までのところ標的となる細胞種が限られ、細胞種間の情報交換も限定されるため、一般的な個々の細胞毒性を比較検索することはできても、細胞種毎に特異的なシグナル変化を介するシグナル毒性や細胞・組織間のネットワーク毒性の評価は難しい。また、ヒト化動物では、免疫系の種特異性の問題をクリアできても、標的の有害影響をヒトに外挿できるか不明である。さらに、動物個体を用いない代替法は予測性に優れた面があるが、単一の*in vitro* 代替法試験ではAOPを十分にカバーできず、複数の毒性試験法を組み合わせた試験バッテリーによる評価が必要なことが指摘されている³³⁾。しかし、ヒト標的細胞の分化機能をバイオマーカーとする各種の*in vitro* 試験系が確立されれば、それら試験法のバッテリーを体系化することにより、代替法による医薬品や化粧品などの成分物質の毒性評価は可能となろう。

3.4 システム毒性学

近年注目されているシステム生物学(Systems biology)では、生物は各種の生体システムから構成され、生命現象はそのシステム間のネットワークによって調節されていることを重視し、生命現象の網羅的解析やその複雑な仕組みをコンピューターの手法で解明する試みがなされている。その応用であるシステム毒性学(Systems toxicology)は、毒性影響を各種の生体システム内あるいはシステム間での毒性反応を統合的に解析しようとするものである³⁴⁾。これは、当初細胞内の遺伝システムにおける遺伝毒性³⁵⁾や細胞内外のシグナル毒性³⁶⁾の解析に用いられた。その後ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどの“オミクス(Omics)”指標を用いた毒性影響の解析に拡大されている。生体の個々の細胞・組織に生じた毒性反応(すなわち個々の細胞毒性やシグナル毒性反応、オミクス指標の毒性反応)が、生体内の情報ネットワークを介して不可逆的な有害影響に発展し、器官や個体に障害が発生する一連の過程を解明する有力なアプローチになりつつある³⁷⁻³⁹⁾。この分野では、個々の*in*

in vitro 試験系を組合せ、組織、器官系、個体での毒性影響を予測評価することが必要となろう。既存物質の毒性情報の集積により、ビッグデータが蓄積されて人工知能(AI)も活用できるようになれば、*in silico* 試験系による毒性の一次スクリーニングの確度も増し、確定あるいは確認試験としての毒性試験の実施範囲も絞られてこよう。実際に、欧州のREACH登録の毒性データベースを用い、テスト化合物のREACH規制対象の健康有害性(9種)を予測するモデルソフトウェアが提示された⁴⁰⁾。急性の有害影響の予測精度が高いことが報告されているが、毒性試験項目全般に適用するにはまだ課題が多い。

システム毒性学は、毒性物質と生体構成物質との相互作用に始まり、生体のホメオスタシスの乱れから有害影響出現に至る過程に関わるもので、この過程の知識は先に述べたAOPのことである³⁸⁾。このような進展に伴って、OECDでは毒性物質の有害性評価のために、毒性物質の暴露によって生体に検出される分子的事象が毒性影響から有害影響に発展しうる過程を、AOPモデルとして示すことを推進している。

3.5 混合物の毒性評価

今日では、単体の化学物質の一般毒性の情報はかなり豊富になり、種々の毒性データベースが開発されている(例：OECD QSAR Toolbox, 化学物質総合情報提供システム(CHRIP), US-EPA Aggregated Computational Toxicology Resource (ACToR), 既存化学物質毒性データベース(JECDB)など)。新規化合物の開発のたびに、化学品や医薬品などの原料物質の毒性試験データが蓄積されてきた。しかし、化学的に全く新規の単体物質が単離あるいは合成される機会は減り、新規に開発される物質の毒性試験データも減ってきた。一方、多数の化学物質が混合された生活化学製品や医薬品、化粧品、医療材料・機器などについて、それらの安全性評価の一環として混合物の毒性試験を行う機会は増えている。混合物では、個々の物質の毒性が減弱(拮抗的、非拮抗的)や増強(相加的、相乗的)され、場合によっては許容効果によって著しく変化する可能性がある。混合暴露が常態である環境汚染の影響評価⁴¹⁾はもとより、そのような混合物の毒性試験の効率化には、

混合毒性のデータベースの充実が必要である。

混合毒性の評価は、製品から抽出される混合物や、類縁体を多く含むことがある貝毒などの自然毒素の毒性力価の決定において重要である。致死性の毒素は類縁体が混在することが多く、それらの毒性総和値である毒性力価は、現在有効な代替法がないため実験動物の致死効果から求められている。ダイオキシン類の毒性評価⁴²⁾に習って、自然毒素の成分分析値から計算によって毒性等量(Toxicity equivalency quantity: TEQ)として毒性総和値を求めることが望まれるが、麻痺性貝毒については毒性等価係数(Toxicity equivalency factor: TEF)のデータ集積が試みられている⁴³⁾。

現在のところ混合物の毒性総和値は、各単一物質の毒性等価値が相加するものとして求められているが、相乗的あるいは拮抗的などの可能性も解析する必要がある。特に、低濃度長期の複合暴露の影響評価には、複合暴露による複合毒性反応、複合有害影響についてAI機能のような新しい方法を用いた評価が必要となる時期がくるかもしれない。

おわりに

生活環境における種々の物質について、実験動物を主体とする毒性試験データの蓄積により、強い毒性を有する物質や標的特異性の高い物質の毒性については、一定の毒性・有害性評価体系が確立され、毒性物質の法的規制も大いに進展したように思われる。一方で、ヒトの物質環境は不断に変化している。種々の物質の混合・複合製品、既存の物質と異なる形質の新規物質とその新たな利用・暴露形態が生じている。形質においては種々のバイオ医薬やナノテク製品、利用・暴露形態においては医療材料・機器、新規食品・化粧品・生活用品など、評価対象の多様化は留まることがない。

急性の有害性を有する物質については毒性評価により使用規制が進んでいる。長期に暴露される弱毒物質や新規物質では、毒性反応による毒性影響(組織の肥厚や免疫亢進など)が必ずしも有害影響に結びつかず、それらの毒性や試験法についてまだ未知のことが多い。しかし、図3に示したように、毒性反応を指標にして毒性影響から有害影響に転じる際の毒性と有害性の識別法の開発が今後の毒性評価の鍵となろう。毒性試験により対象

物質の有害影響誘発の予測性を高めるためには、スクリーニングとして効率の良い *in silico* 試験法と、生体系の毒性影響であるホメオスタシスの破綻を示すバイオマーカーを指標とする *in vitro/in vivo* 試験法の確立が望まれるところである。

文献

- 1) WHO/IPCS: IPCS Risk Assessment Terminology (Harmonization Project Document No.1), WHO, Geneva, 2004; p.15
- 2) National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (NASEM): Using 21st Century Science to Improve Risk-related Evaluations. The National Academic Press, Washington,DC. 2017; 1-182 (doi:10.17226/24635)
- 3) WHO: Principles and Methods For Evaluating the Toxicity of Chemicals, Part 1 (Environmental Health Criteria 6), WHO, Geneva. 1978; p.19
- 4) Loomis TA: Essentials of Toxicology, Henry Kimpton Pub., London. 1978; p.2-3
- 5) National Research Council (NRC): Toxicity Testing in the 21st Century, A Vision and A Strategy. The National Academic Press, Washington,DC. 2007; 1-196
- 6) Institute of Medicine (IOM): Emerging safety science: Workshop summary. The National Academic Press, Washington, DC. 2008; 1-134
- 7) Albert A: Selective Toxicity, 5th edn. Chapman and Hall Ltd., London. 1973; p.3-6
- 8) Aldridge WN: Mechanisms and Concepts in Toxicology. Taylor & Francis Ltd., London.1996; p.29, p.153
- 9) Santos R, Ursu O, Gaulton A, Bento AP, Donadi RS, Bologa CG, Karlsson A, Al-Lazikani B, Hersey A, Oprea TI, Overington JP: A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017; 16: 19-34
- 10) Liebler DC, Guengerich FP: Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. *Nature Rev. Drug Discov.* 2005; 4: 410-420
- 11) Guengerich FP, MacDonald JS: Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chem. Res. Toxicol.* 2007; 20: 344-369
- 12) Muller PY, Milton MN: The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nature Rev. Drug Discov.* 2012; 11: 751-761
- 13) Rudmann DG: On-target and off-target-based toxicologic effects. *Toxicol. Pathol.* 2013 ; 41: 310-314
- 14) OECD: Proposal for a template, and guidance on developing and assessing the completeness of adverse outcome pathways. Appendix I. Collection on working definitions. 2012; p.5
- 15) Chovatiya R, Medzhitov R: Stress, inflammation, and defense of homeostasis. *Molecular Cell.* 2014; 54: 281-288
- 16) Palazzi X, Burkhardt JE, et al.: Characterizing “adversity” of pathology findings in nonclinical toxicity studies: Results from the 4th ESTP International expert workshop. *Toxicol. Pathol.* 2016; 44: 810-824
- 17) OECD: Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways. (OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 184). ENV/JM/MONO 2013; 6: p.9-10
- 18) OECD: The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. Part 1: Scientific Evidence. ENV/JM/MONO, 2012; 10(PART1): p.27
- 19) Kanno J: 毒性学イノベーション：生体反応機構に則った共通基本概念としての「シグナル毒性」(Biomechnism-based innovation of toxicology by the fundamental concept of “Signal Toxicity”). *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* 2015; 133: 21-28
- 20) Cosfrove BD, Alexopoulos LG, Hang T, Hendriks BS, Sorger PK, Griffith LG, Lauffenburger DA: Cytokine-associated drug toxicity in human hepatocytes is associated with signaling network dysregulation. *Mol. Biosyst.* 2010; 6: 1195-1206
- 21) Ohsawa M: 新規医薬品の開発と免疫毒性評価の課題 (Emerging issues in immunotoxicology evaluation of newly developed pharmaceutical products). *Ann. Rep.Hatano Res.Inst.* 2016; 39: 16-24
- 22) National Toxicology Program (NTP): Annual Report for Fiscal Year 2016. 2016; https://ntp.niehs.nih.gov/annualreport/2016/research/testing_tox_studies_subsec/org_sys_tox/index.html
- 23) Maronpot RE : Adverse, non-adverse and adaptive responses in toxicologic pathology. 32nd JSTEP Annual Meeting, Takamatsu, Japan, 2016; <https://www.slideshare.net/ToxPath/adverse-nonadverse-and-adaptive-responses-in-toxicologic-pathology-jstp>
- 24) National Research Council (NRC): Biological

- markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 1987; 74: 3-7
- 25) Saio T, Kurihara C: 動物実験のヒトへの外挿可能性について (On extrapolation of animal experimentations to humans). *Rinsho Hyoka (Clin. Eval.)*, 2010; 38: 385-392
- 26) Leist M, Hartung T: Inflammatory findings on species extrapolations: human are definitely no 70-kg mice. *Arch. Toxicol.* 2013; 87: 563-567
- 27) Seok J, Warren HS, et al.; Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *PNAS.* 2013; 110: 3507-3512
- 28) Meek ME, Boobis A, Cote I, Dellarco V, Fotakis G, Munn S, Seed J, Vickers C; New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *J. Appl. Toxicol.* 2014; 34: 1-18
- 29) Frecknell P: Replacement, reduction and refinement. *ALTEX.* 2002; 19: 73-78
- 30) Cressey D: UK funders demand strong statistics for animal studies. *Nature.* 2015; 520: 271-272
- 31) Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ: Chemical allergy: Translating biology into hazard characterization. *Toxicol. Sci.* 2011; 120: S238-S268
- 32) Woolley D, Woolley A: 5. Toxicology in silico. (In: *Practical Toxicology: Evaluation, Prediction, and Risk*, 3rd edn) CRC Press/Taylor & Francis Group, LLC, Boca Rayton. 2017; p.119-132
- 33) Urbisch D, Mehling A, et al.: Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2015; 71: 198-204
- 34) Waters M, Boorman G, et al.: Systems toxicology and the chemical effects in biological systems (CEBS) knowledge base. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111: 811-824
- 35) Waters M, Fostel JM: Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nature Rev. Genet.* 2004; 5: 936-948
- 36) Plavec I, Sirenko O, Privat S, Wang Y, Dajee M, Merlose J, Nakao B, Hytopoulos E, Berg EL, Butcher E: Method for analyzing signaling networks in complex cellular systems. *PNAS.* 2004; 101: 1223-1228
- 37) Hartung T, van Vliet E, Jaworska J, Bonilla L, Skinner N, Thomas R: Systems toxicology. *ALTEX.* 2012; 29: 119-128
- 38) Sturla SJ, Boobis AR, FitzGerald RE, Hoeng J, Kavlock RJ, Schirmer K, Whelan M, Wilks MF, Peitsch MC: Systems toxicology: From basic research to risk assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 2014; 27: 314-329
- 39) Plant NJ: An introduction to systems toxicology. *Toxicol. Res.* 2015; 4: 9-22
- 40) Luechtefeld T, Marsh D, Rowlands C, Hartung T: Machine learning of toxicological big data enables read-across structure activity relationships (RASAR) outperforming animal test reproducibility. *Toxicol. Sci.* 2018; <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy152>
- 41) Monosson E: Chemical mixtures: Considering the evolution of toxicology and chemical assessment. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 383-390
- 42) Van den Berg M, Birnbaum LS, et al.: The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol. Sci.* 2006; 93: 223-241
- 43) Burrell S, Crum S, Foley B, Turner AD: Proficiency testing of laboratories for paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish by QUASIMEME: A review. *TRAC.* 2016; 75: 10-23