

Executive Summary Toxicity Testing in the Twenty-first Century: A Vision and a Strategy

Committee on Toxicity and Assessment of
Environmental Agents, National Research Council
2007

21世紀の毒性試験：展望と戦略

米国学術研究委員会（NRC）

概要

変革には歴史を塗り替え、新しい時代への扉を開く極めて重要な出来事がつきまとうことが多い。科学における重要な出来事として、ペニシリンの発見、DNA二重らせんの解明、コンピューターの発展などが挙げられる。このすべてには不運な始まりという特徴があり、その後は数年間の思いがけない進展があるが、最終的には命を救う薬、ヒトゲノムの地図、今日の職場のほぼすべての机上にあるパソコンという結果に落ち着いた。

毒性試験もこうした科学の重要な出来事へと近づきつつあり、生物学およびバイオテクノロジーにおける大変革に乗じる準備ができています。トキシコゲノミクス、バイオインフォマティクス、システムバイオロジー、エピジェネティクスおよびコンピュータートキシコロジーが発展することで、動物個体の試験に基づいたシステムから、可能であればヒトの細胞、細胞株、細胞成分を用いて生体内作用の変化を評価する*in vitro*手法を主としたシステムへと毒性試験が一変する可能性がある。近年における科学の進歩の影響力を期待して、米国環境保護庁（EPA）が米国学術研究委員会（NRC）に対し、毒性試験に関する長期的展望およびその実現のための戦略計画の構築を要請した。

EPAの要請に応じて作成された“毒性試験および環境物質の評価に関するNRC委員会”による本報告は、毒性試験の科学を発展させ、将来を見据えたスタンスに立てるよう、科学コミュニティの主要な活動の展望を描いたものであり、将来的に享受可能な恩恵は明白である。環境物質がヒトの健康に影響を与える原因を理解するのに、新しい考え方や新たな手法を利用することで、こうした物質の試験および意志決定のためのデータ利用に対し

て、有益な変革を与えることになる。ここで想定される変革により、環境物質の暴露により生じるヒトへの潜在的リスクに関するより強固なデータが生み出され、さらに効率的な化学物質の試験が実施可能になることが期待される。科学的基礎が強ければ強いほど、リスクに基づいた規制策定の向上が期待され、社会的信用が高まり、こうした策定が受け入れられるようになる。

このような目標を念頭に置いて、現在利用可能なものおよびその他構築中のものなど、毒性試験に対する新しいアプローチを開始そして継続するために、当委員会は科学コミュニティおよび科学資源を結集するための展望を本報告書で示している。本報告書は、毒性試験を設計・実施し、ヒトの健康に対するリスクを評価するために試験結果を利用するあらゆる活動分野（政府、公益、産業、大学および専門的な助言を与える研究所）の科学者に対して書かれたものである。また、政府規制の性格および目的を方向づけ、将来における毒性試験の飛躍を決定づける予算に携わる意志決定者やその他の指導者に情報を与え、関与してもらうことも本報告書の目的である。科学者と非科学者の双方が、この展望で定められる目的達成を推進するよう協力し合わなければ、この非常に影響力のある膨大な推奨事項を達成することはできない。

展望

現在の毒性試験に対する主要アプローチは、病状を示す臨床兆候や病変など、動物個体での観察結果を評価する複雑に絡み合ったさまざまな研究に基づいている。一つには、この手法には膨大な時間がかかり、資源を消費してしまうため、膨大な数のライフステージ、健康影響および未試験化学物質の評価など、今日直面している数多くの難題を解決していくことが困難となっている。当委員会では現行のシステムを向上させる選択肢をいくつか議論したが、当委員会の中間報告で定められた設計基準を達成するには、以下に挙げるような変革を起こすことのできるパラダイムシフトが必要となる：（1）幅広い化学物質、混合物、影響およびライフステージの網羅、（2）試験に要する費用・時間の削減、（3）最小限の動物使用数および対象動物の苦痛の抑制、（4）環境物質の健康影響評価のためのより強固な科学的根拠の構築。¹

当委員会では、毒性試験に対する新アプローチを定める際に、近年における科学の進歩を考慮に入れた。細胞応答ネットワークの解明においては、大幅な進捗が得られている。これは、遺伝子、タンパク質、小分子の複雑な生化学相互作用で構成される相互接続した経路のことであり、正常な細胞機能の維持、細胞間伝達の制御を行い、そして細胞が各々の環境に合わせて変化することを可能にしている。たとえば、よく知られた細胞応答ネットワークの一つにエストロゲンによる信号送信があり、初期暴露の結果として、特定組織

¹ 当委員会が考慮した選択肢のさらなる議論については、第2章「新毒性試験パラダイムの選択肢」を参照。

における細胞増殖および組織増殖が促進される。生物科学のおかげで我々の細胞応答ネットワークに関する知識は増え続けており、環境物質が毒性を引き起こす上で、どのように経路を乱すのかを科学者が解明可能となってきた。健康に対して十分な有害作用を及ぼすと予想される細胞応答経路は「毒性経路」と呼ばれる。当委員会は、主要な毒性経路における生物学的に重要な乱れを、コンピューターバイオロジーによる新手法およびヒト生物学に基づいた包括的なin vitro試験により評価する新しい毒性試験システム構想を打ち立てている。

展望の構成

図S-1は、当委員会の展望の構成要素である化学的性質の特定、毒性試験および用量反応モデルと外挿モデルを示している。この展望の構成は後のセクションで説明されており、これらはそれぞれ別個のものであるが、一連の特有なテクノロジーおよび科学の可能性がかかわる相互に関連した構成要素でもある。一部の化学物質評価は、化学的性質の特定から毒性試験および用量反応モデルと外挿モデルへとといった段階を追って行われるが、実際のところ、こうした連続的な評価を必ずしも実施する必要はない。新しい展望における重大な特徴は、各段階におけるリスク背景（毒性試験情報に必要なものを作り出す意志決定を行う背景）および意志決定用の十分なデータが得られた際に、いかなる段階であってもその手法を終了できる旨を考慮に入れたことである。この展望では、集団ベースの暴露データおよび試験結果の解釈が可能なヒト個人暴露データの作成および利用を重視し、またバイオモニタリング、サーベイランスおよび疫学研究による重要な化学物質についてのこうしたデータの収集を奨励する。リスク背景に沿った集団ベースの暴露データおよびヒト暴露データは、得られる毒性情報の統制および利用の双方の役割を果たすことになる。最後に、この展望では毒性試験方法への科学的理解が深まるにつれて、段階的に試験方法を取り入れたり、除去したりする正式な手順を構築することが見込まれている。この手順を構築するために、タイミングを逃さず、費用対効果の大きい形で、あらゆる化学物質の試験を効率的に実施するといった要求に取り組む。

化学的性質の特定

環境における化合物の安定性、ヒト暴露の可能性、暴露のおそれがある経路、生体内蓄積の可能性、予想される代謝経路、予想される化合物の毒性および化学構造や物理的・化学的性質に基づいた代謝産物など、化学的性質の特定からは重要な疑問点に対する見識を得ることができる。このため、物理的・化学的性質、使用状況、予想される環境濃度、代謝産物および分解生成物、化合物および細胞構成成分を伴った代謝産物における初期の分子相互作用、予想される毒性に関するデータが収集されることになる。また、多岐にわた

るコンピューターを用いた手法が、こうした性質を予想するのに利用される場合がある。化学的性質が特定された後、どういった試験が必要なのか、また試験が本当に必要なのかという決断が下されるが、大半のケースにおいて、環境物質の毒性に関する決定を化学的性質の特定だけで行うのは十分でないことが予想される。

毒性試験

提案された展望（図S-1参照）では、毒性試験には毒性経路検討および標的試験の2つの構成要素がある。当委員会は、最終的には、経路ベースの予測検討が、新規および既存化合物の生物学的活性評価に対する幅広い毒性試験手法の中心的構成要素となることを期待している。標的試験はこの検討を補完し、評価をサポートする役割を果たす。

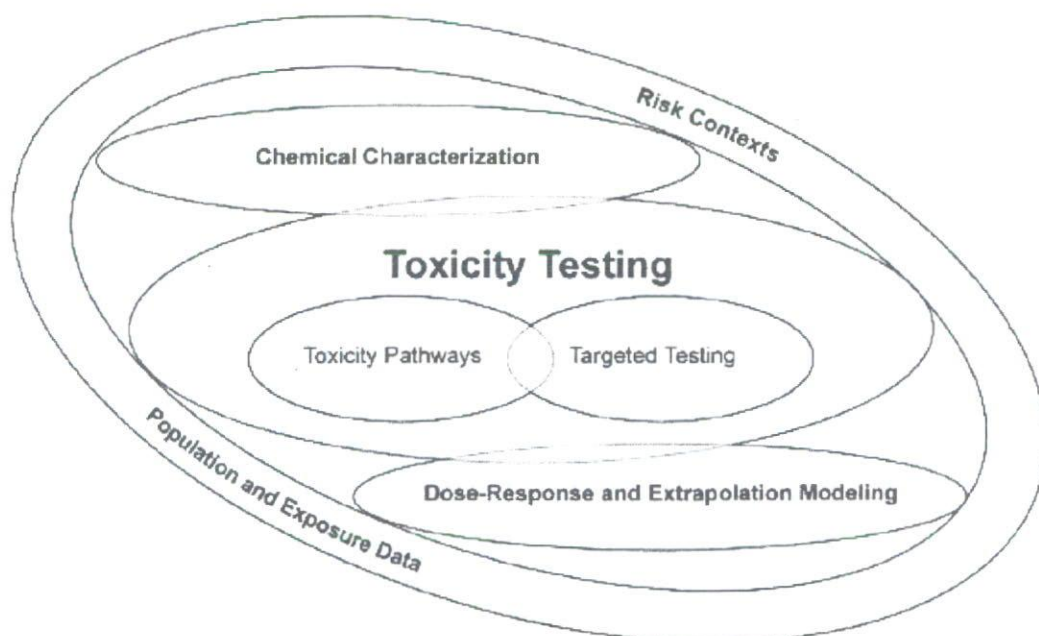


FIGURE S-1 The committee's vision for toxicity testing is a process that includes chemical characterization, toxicity testing, and dose-response and extrapolation modeling.

毒性経路

図S-2は、毒性経路の活性化を示している。初期における細胞シグナルの刺激、遺伝回路、細胞応答ネットワークの乱れは、化学物質暴露による不可避の変化であり、最終的には病気となってしまう可能性がある。生物学的な乱れの結果は、用量に関連した大きさ、タイミングと期間、そして宿主感受性に左右される。このため、恒常性の範囲内にある低用量

では、生物学的システムは正常に機能する場合が多い。多少高い用量になると、はっきりとした生物学的反応が生じる。順応により問題なく処理される場合もあるが、一部の感受性が高い人々にはその影響が発現することもある。より激しく、長期にわたる乱れを受けると、システムが順応できる容量を超え、組織障害および健康に対する有害作用を引き起こすことがある。

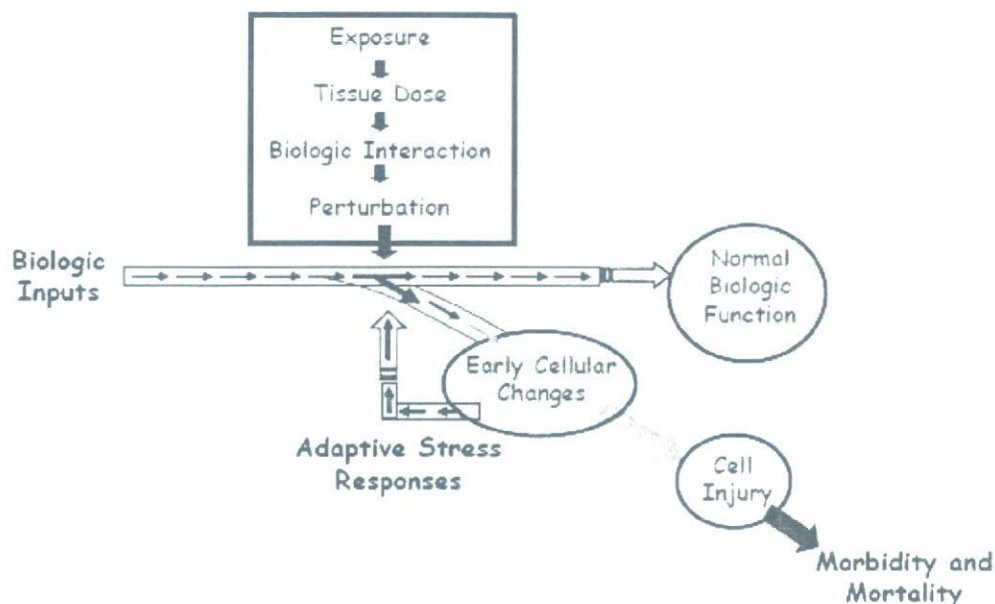


FIGURE S-2 Biologic responses viewed as results of an intersection of exposure and biologic function. The intersection results in perturbation of biologic pathways. When perturbations are sufficiently large or when the host is unable to adapt because of underlying nutritional, genetic, disease, or life-stage status, biologic function is compromised, and this leads to toxicity and disease. Source: Adapted from Andersen, M.E., J.E. Dennison, R.S. Thomas, and R.B. Conolly. 2005. New directions in incidence-dose modeling. *Trends Biotechnol.* 23(3):122-127. Reprinted with permission; copyright 2005, *Trends in Biotechnology*.

当委員会の展望は、毒性試験および用量反応モデルに対する新しいアプローチの基礎として、毒性経路の特定と利用に投資するものである。よって、この展望では、主要な毒性経路における妥当な乱れを評価するために、可能であればヒトの細胞や細胞株を利用する、一連の予測ハイスループットアッセイ²の構築を重視する。こうしたアッセイにより、細胞

² ハイスループットアッセイとは効率的に設計された実験で、自動化ができ、対象生体内作用に関する物質の影響を迅速に測定可能である。こうしたアッセイを利用すると、遺伝子、経路、細胞機能に関する化学作用を同定するのに、数百から数千もの化学物質を幅広い濃度範囲にわたって評価することができる。

タンパク質と環境物質との結合およびその結合による遺伝子発現の変化といった比較的単純なプロセスが測定可能となる。場合によっては、細胞分裂および細胞分化といったより統合的な応答を測定可能なこともある。この展望において、大半の毒性試験ではハイスループット手法の使用が期待されているが、その他の試験では、細胞毒性、細胞増殖、アポトーシスといったより統合的な細胞応答についてのメディアムスループットアッセイが用いられる。時間とともに、従来の動物試験で要求されていたことは大幅に減少し、場合によっては淘汰されることになるはずである。

標的試験

標的試験は、毒性経路試験を補完し、確実に適切な評価を得るために使用される。その目的は、(1) 毒性経路データの解釈における本質的な不明点を明確にする、(2) ナノ粒子などの一連の標準的なアッセイには含まれないが毒性経路を活性化しうる物質の分類から、代表的な原型化合物の影響を理解する、(3) 標的試験により不確実性が減少する場合やより改善された推定値が意志決定に必要な場合に、リスクの推定値をさらに高精度にする、(4) 有毒な可能性のある代謝産物の生成を調査する、(5) 重要な毒性経路およびエンドポイントが適切に網羅されるよう、毒性経路試験手法における空白部分を埋めることである。毒性評価用*in vitro*試験システムを構築する上での課題の一つに、現在、動物個体において代謝を反映する細胞アッセイを利用できないことが挙げられる。将来の見通しが立つ範囲では、いずれの*in vitro*手法においても、動物個体試験により予想される代謝産物を評価できるようにしておく必要がある。

標的試験は、利用可能な毒性試験に応じて、*in vivo*もしくは*in vitro*で実施され、既存の毒性試験システムを基本とするが、おそらく将来的には従来の試験と異なるものとなる。この試験では、トランスジェニック動物、同質遺伝子系統、新しい動物モデル、その他の斬新な試験システムが利用され、幅広い用量範囲における組織反応のトキシコゲノミクス評価も組み込まれる。どのようなシステムが使用されることになると、動物個体の毒性試験から得られる情報量を最大限にまで高める試験プロトコールとなるであろう。

用量反応モデルと外挿モデル

提案された展望(図S-1参照)では、毒性試験の構成要素で説明されたように、用量反応モデルは機構的な*in vitro*アッセイから得られたデータに基づく環境物質に対して展開される。この用量反応モデルは、試験培養液中の濃度と*in vitro*での応答の程度との間にある関係を表現するものである。一部のリスク背景では、*in vitro*の結果に基づいた用量反応モデルにより、リスクマネジメントの決定をサポートする適切なデータを得ることができる。一例として、ヒトにおける宿主感受性の要因が明確になっている化合物が挙げられ、人体への

バイオモニタリングから、その化合物の組織中濃度や血液中濃度、およびヒト集団において毒性経路に影響を与えるその他の関連暴露についての有益な情報が得られる。

外挿モデルでは、*in vitro*での毒性経路の乱れと関連するヒト組織濃度を導き、宿主感受性要因となる環境暴露もしくは人体への摂取が推定される。提案された展望では、外挿モデルには3つの主要構成要素がある：(1) 毒性経路モデルで、環境物質による経路の乱れに対する用量反応関係の定量的・機構的理解が得られる。(2) 生理学に基づいた薬物動態モデルで、*in vitro*での乱れを引き起こした濃度に匹敵する、組織中濃度の原因となる人体暴露の予測に用いられる。(3) ヒトのデータで、同じ毒性経路に影響を与える目立たない化学物質暴露および病気の経過に関する情報、ならびに定量的に宿主感受性を扱うための基礎が得られる。

ヒト集団暴露データとヒト個人暴露データ

集団ベースの暴露データとヒト個人暴露データは、当委員会の毒性試験手法における重要な構成要素である(図S-1参照)。この2つのデータは、展望に挙げられる各構成要素を情報面で補っており、試験手法全体の整合性を確かなものにする。ヒト細胞における根本的な生物学的乱れの機構的なデータ収集へ移行するには、データ解釈のために大規模なバイオモニタリングおよびヒトにおけるサーベイランス研究の利用が必要となってくる。さらに、集団ベースの研究と毒性試験の間にある相互作用が、個人および集団レベルで健康リスクに影響を与える分子、細胞、遺伝要因について、主要な疑問点を解明するための各研究設計を向上させることになる。この展望では、環境物質がヒトの生物学的反応に対してどのように影響を与えるかを示すヒト細胞での研究を重視するため、ヒト集団を観察・研究できるバイオマーカー(人体暴露、影響、感受性の指標)の使用が推奨される。

細胞ベースの研究へと毒性試験を移行させていくにつれて、バイオモニタリング研究から得られるヒト暴露データ(NRCの報告書である環境化学物質に対するヒトバイオモニタリング(*Human Biomonitoring for Environmental Chemicals*)³で推奨される研究など)は、極めて重要なものである。こうしたデータは毒性試験の用量決定に利用可能であり、環境がかかわる暴露において、生物学的影響に関する情報を得ることができる。さらに重要な点として、毒性経路を活性化する濃度とヒト集団における血液、尿、その他の組織の物質濃度とを比較することで、ヒト暴露ガイドラインを定める際に、余裕のある安全ラインを確保する上で、可能性のある重要な暴露を特定しやすくなる。

リスク背景

³ NRC (National Research Council). 2006. *Human Biomonitoring for Environmental Chemicals*. Washington, DC: The National Academies Press.

結局のところ、毒性試験は、規制者、産業、一般市民の公衆衛生への懸念に対して、情報に基づいた効率的な対応を取るのに使用される場合のみ有用である。当委員会が「リスク背景」として定めた共通のシナリオでは、毒性試験は意志決定に使用されるものであり、このシナリオには予想される環境物質の評価、既存の環境物質、環境汚染場所、環境中でヒトに病気を引き起こすもの、異なる環境物質の相対リスクが含まれている。一部のリスク背景では、数万もの環境物質を直ちにスクリーニングする必要があり、環境に関連した暴露濃度に拡張しつつも、高度に正確な用量反応データが要求されるものもある。また、別の一部のリスク背景では、混合物を試験したり、特定メカニズムに焦点を当てたアッセイを使用したりすることが求められる場合や、集団での健康サーベイランスおよびバイオモニタリングなどの集団ベースのアプローチを使用することが要求される場合もある。重要な毒性経路における生物学的に有意な乱れを評価するために、ヒトの細胞、細胞株および細胞成分を用いたハイスループットアッセイに重点を置くことから、ここで提案される展望は、各リスク背景における意志決定プロセスに役立つこととなる。

展望の実現

この展望の実現に必要なことは、(1) 利用可能な一連の*in vitro*試験（可能であればヒトの細胞、細胞株、細胞成分）が、予想される幅広い毒性反応に関連した毒性経路の活性を評価するのに十分包括的であること、(2) 利用可能な標的試験が*in vitro*試験を補完し、リスクマネジメントの意志決定に用いられる適切な毒性データベースが確実に得られること、(3) 毒性経路のコンピューターモデルが、有害な変化を引き起こす可能性のある、一般集団での暴露を予測した*in vitro*試験結果の利用をサポートすること、(4) インフラの変更が、試験および経路モデルの構築に必要な基本的・応用的調査をサポートすること、(5) 試験および試験手法の検証が、新しいアッセイ結果の解釈や結論導出の方向性を示す化学物質評価ガイドラインに組み込まれること、(6) 毒性経路の乱れに基づいた試験結果に、意志決定時に使用される有害な健康影響を適切に予測していることを正当化する根拠が存在することである。

こうした要件を満たすには、大規模で集中的な調査への取り組みが必要となり、新しい科学知識および新毒性試験手法の両方を構築することが要求される。この知識および手法の構築に際して、対処する必要がある主要な論点をボックスS-1に取り上げた。

ボックスS-1 実現に向け対処する必要がある主要論点

知識の構築

毒性経路の特定—乱れが毒性につながる主要経路はどれか？

複数の経路—複数経路で同時に生じる乱れから、応答でどのような変化が予想されるか？

有害性—どういった有害影響が、特定の毒性経路における乱れと関連づけられるか？有害な健康影響に対して、どういった乱れのパターンおよびどの程度の乱れの大きさが予測されるか？

ライフステージ—ハイスループットアッセイを向上させられるように、発育タイミングもしくは加齢と関連した毒性経路の乱れをうまく捉える方法は何か？

暴露期間の影響—生物学的反応が、異なる期間の暴露によりどのように影響を受けるか？

低用量反応—既存の内因および外因によるヒト暴露の観点から、少量の毒物では毒性経路にどのような影響が出るか？

ヒトによるばらつき—毒性経路構成の発現および病気や障害に対する傾向において、異なるヒトの間でどのような相違がみられるか？

手法の構築

代謝を予測する手法—ハイスループットアッセイで代謝産物への適切な試験をどのように実現するか？

化学的性質の特定用ツール—どのコンピュータツールが、化学的性質、代謝産物、生体異物の細胞相互作用および分子相互作用、生物活性を予測するのに一番適しているか？

細胞の回路を発見するアッセイ—どの手法を取ると、毒性経路と関連した回路の発見を一番容易に実施することができるか？

大規模な利用でのアッセイ—どのアッセイが、経路の解明およびin vivo条件の反映に一番適切か？揮発性化合物の試験に適しているのはどの試験設計か？

一連のアッセイ—経路ベースのハイスループットアッセイとミディアムスループットアッセイとの組み合わせ、および標的試験について、どれを選ぶことで対象範囲を適切なものにすることができるか？毒性経路アッセイを補足するには、どの標的試験を構築する必要があるか？アッセイを検証するのにふさわしい陽性対照および陰性対照はどれか？

ヒトにおけるサーベイランスに関する戦略—さまざまなヒト感受性および背景暴露の観点から、経路試験の結果を解釈するのにどういったサーベイランスが必要か？

データ解釈および外挿における数学モデル—ヒトに対する環境暴露のリスクの有無について評価するのに、どういった手順を用いる必要があるか？

試験手法の不確実性—試験手法における全体的な不確実性をどのように評価するか？

この展望を実現するのに必要な研究開発は、スケジュールを重複しながら、複数段階にわたって進展していくことになる。第1段階では、毒性経路の解明、データ保存・データアクセス・データ管理システムの開発、調査方法および報告に関する標準プロトコールの策定、毒性経路試験アプローチをサポートするヒトにおけるサーベイランスおよびバイオモニタリングの手法の立案に焦点を当てる。第2段階では、毒性経路アッセイの構築と検証、ならびにヒト集団についてのサーベイランスおよびバイオモニタリングの利用における暴露マーカー、影響、感受性の確認を実施する。第3段階では、多量のデータセットがあり、これ以外にはスクリーニングプロセスとして試験を実施されないと考えられる化学物質について、従来の毒性試験と平行してアッセイを行うことにより、そのアッセイを評価する。試験を平行して実施することで、新しいアッセイのみでは見逃されている可能性のある毒性を確認することができ、アッセイの構築が強制的にこうした空白部分を処理することになる。ヒト集団におけるサーベイランスおよびバイオモニタリングも、第3段階で開始される。最後に第4段階で、従来実施されてきた同一の毒性試験に代わって利用できるようにするため、検証されたアッセイが識者に対して集められる。

検証はこの研究開発段階において、非常に重要な構成要素である。新しい毒性アッセイの検証を確立することは、費用面、時間面さらに論理的・技術的に高いハードルを要求されるため、非常に困難なことである。以下に挙げるような理由により、当委員会が想定する機構をベースにした試験に対して、検証は特に困難なものとなる。1つ目の理由は、新しいパラダイムに沿って作成される試験結果は、健康に関する勧告およびガイドラインを定める規制機関が使用する従来のデータとは異なるものになるからである。2つ目の理由は、規制目的で特定の実用例を検証する前に、数多くの開発された新テクノロジーを標準化し、さらに向上させていく必要があるからである。3つ目の理由は、新テクノロジーは急速に進歩しているため、個々の実用例における最適化を中止し、正式な検証研究を開始するという決断は、やや主観的すぎるからである。4つ目の理由は、個々の従来型試験を一連の新試験へと置き換える必要があるケースが多いと当委員会は想定しているからである。5つ目の理由は、既存のガイドラインでは新アッセイと既存のアッセイにおける結果の一致に目を向けているが、新アッセイの妥当性と予測性を評価する比較検討を標準化することは困難だからである。6つ目は、実質上すべての環境物質が経路の乱れにある程度かかわっているため、こうした乱れが毒性作用を及ぼす可能性が高い場合と、そうでない場合を見極めることが困難だからである。

長期にわたる大規模な取り組みを一致団結して行うことが、毒性試験に対する当委員会の展望を実現するのに必要である。これを成功させるのに重要なことは、新毒性試験ツールの科学的根拠を確立し、試験結果の意味および意志決定で用いられるリスクアセスメントでのその実用化を理解するために必要な、変革を起こすことのできる調査の実施である。当委員会では、多くの専門分野にわたる内外での調査を促進できる妥当な組織構造が、この展望を達成するのに必要であると結論づけている。この取り組みは、単に関連調査を実

施する組織を結びつけ、一体化させる仮の団体を創設し、関連調査プロジェクトに資金を分配するだけでは成功しない。任務重視の内外でのプログラムに、上記リストの論点を解決する当組織内での多くの専門分野にわたる中心的な活動を加えることで、この唱道による成功に重要な異なる分野間での活動を促進させることができる。中心となる統合機関が意思の疎通および各専門分野からの問題解決に支障をきたした状態で、調査が異なる場所や組織に分散されてしまうと、妥当な時間内に成功を収めることが難しくなってしまう。

調査では予想外のことが頻繁に起こり、現時点における調査方針の将来性についての予測は、一部の細部において、悲観的すぎる場合もあれば楽観的すぎる場合もある。このため、軌道修正のアドバイスを得る目的で、この展望の実現をサポートする調査プログラムについて、独立した科学的評価を3～5年ごとに実施することを当委員会では推奨する。中間評価では、進捗の評価、研究領域において期待される新手法の評価、近い将来に起こると予想される科学の進歩を考慮した当委員会の展望の改善を実施する。

新毒性試験手法についての規制承認は、いくつかの要因に左右される。新試験要件は、科学的現状が反映されたもので、同僚に審査された調査、確立済み試験プロトコル、検証済みモデル、およびケーススタディの上に構築されることが見込まれている。規制承認に影響を与えるその他の要因は、科学的典拠の文書化、科学の専門家、出資者、関心を示す一般人への参画機会の提供、姉妹機関および国際組織とのコンサルタントなど、規制作成にかかわる管理手順である。展望の実現には、数十年にわたる改善と集中的な取り組みが必要であるが、将来の毒性試験に対する最良の科学的アプローチを駆使するのに、政治的な意志と現行の規制制度に適合する資金を利用できれば、この展望の実現に対して克服できない障害はないと当委員会では考えている。

資源は常に限られており、さらに現行の毒性試験慣習は確立されてから長い時間が経ち、一部の部門ではそれが根深くしみついている。よって、当委員会が提案する展望に対しても反対の声が上がるのが予想される。しかし、この展望では、環境物質がヒトの健康に対してどのように影響を与えるかを我々がさらに理解するために、現在そして将来における科学の進歩を最大限に活用する。また、費用および試験時間が大幅に削減され、環境物質の網羅範囲がより広がることにつながる。さらに、動物の使用量が劇的に減少し、ヒト集団を対象にしたより妥当性の高い投与量に焦点が当てられている。ここで明確にした21世紀の毒性試験に対する展望は、現行のシステムを向上させるだけでなく、現在ある壁を打ち破り、将来の課題を解決することができるものへと変えるパラダイムシフトである。

RIVM-report 60105001/2007

**Selected Integrated Testing Strategies (ITS) for the risk
assessment of chemicals**

化学物質のリスク評価のための選択的総合試験戦略 (ITS)

RIVM (オランダ国立公衆衛生・環境保護研究所) 報告書

RIVM-report 60105001/2007

抄録

化学物質のリスク評価に使用する実験動物を減らすための総合試験戦略 (ITS) に関する RIVM (オランダ国立公衆衛生・環境保護研究所) の調査は、改善された別の試験方法の適用に焦点を当てている。この調査は、2007年6月1日現在、工業化学薬品に関する EU の新しい規則 (REACH: 化学物質の登録、評価、認可、制限) の履行を成功させるために必要性の高い調査である。この方法で RIVM は EU および OECD (経済協力開発機構) 研究の試験戦略に寄与する。

総合的あるいは知的な試験戦略 (ITS) は、化学物質の危険性に関して効果的に試験を行うための戦略である。このような戦略は、特定物質に対し、どのような試験または数学的方法をどういった順序で用いるべきかを示すものである。ITS は、データベースの少ない多数の物質の規制に必要とされる試験需要の増大に応じることを目的とするものである。ITS の焦点は、特に、細胞レベルでの試験方法 (in vitro) および数学的方法 (in silico) に基づいた戦略の開発に当てられている。数学的方法は、曝露の評価および作用と化学構造との関係の評価に必要である。実験動物を用いた一部の試験 (in vivo) は今でも必要とされている。化学物質の影響に関しては、これらの方法を互いにうまく組み合わせることによって、十分に確実な情報を得ることができる。この方法によって、化学物質を安価で迅速に評価するとともに、使用する実験動物の数を減らすことができると期待される。

本報告書ではまず、不確実な試験結果の処理方法および、特定の ITS の各段階で用いられる方法について述べる。次に、以下の評価に関する試験戦略に焦点を当てる。すなわち、1) 環境劣化、2) 感作、3) 生殖力と子孫への悪影響である。

キーワード：ITS、総合試験戦略、リスク、化学物質、証拠の重み (weight-of-evidence)

【「7. 考察と結論」のみの翻訳】

7. 考察と結論

ITS の必要性

本報告書の目的は、従来の代替法と総合試験戦略を調査し解析することであった。次に、ITS の主題に関連して選択した題目を調査した。すなわち、一般的主題としての証拠の重み (WoE : Weight-Of-Evidence) のプロセスの調査に続いて、環境劣化、感作、生殖毒性といったエンドポイントに関する ITS の各項目を調査した。

REACH の重要性は、多数の化学物質のリスクを比較的短期間で評価しなければならないというものである。これにより、化学物質の運命と影響に関する大量の情報が入手できるようになる。動物の権利保護、コスト、流通といった理由から、実施する試験の数を制限することが重要である。これは、代替法（試験を行わない非試験的方法と *in vitro* 試験）を開発し、実証する必要があることを意味している。

しかし、欧州化学物質局 (European Chemicals Bureau) が結論したように、代替法の開発と実証を目的とした大規模プログラムが実を結ぶには長い年月が必要であるが、動物試験の代替法は一部のエンドポイントに関しては可能になることはまったくないと思われる。

そのようなわけで、総合試験戦略 (ITS) は、分類と表示、および REACH の下でのリスク評価に関する試験要件の増加に対する解決策として広く提案されている。ITS は非試験、*in vitro*、*in vivo*、曝露に関する情報を統合している。それらは、実際は階層的であり、影響と曝露に関する従来のデータを最大限に利用することから始まる。

その結果得られた決定図式に対する鍵は WoE のプロセスであり、続いて、アウトカムの不確実性を測定するためにできるだけ明白にすべきものは何かを検討することで、一貫した透明な意思決定が可能になる。

ITS は特に新しいものではない。このような戦略は、分類および表示のいずれに関しても、異なる方法で、さまざまな規制枠組み内でさまざまな程度に開発されている。しかし今のところ、これらの ITS の代替法の統合は非常に制限されている。上記結論を前提として、エンドポイントの多くに関して現在の戦略を（もちろん独占的に）含んでいる戦略に移行させる場合、代替法は莫大な研究努力が必要となり、かなりの時間を必要とする。幸いに

も、このような努力は OECD および EU の研究プログラムの範囲内で進行中である。例えば、ITS に関する 10 Me の研究プログラムが第 6 フレームワークプログラム (Framework Program) 内で開始されている。このような研究の結果を吸収することができるように、ITS のガイダンスを絶えず更新する必要がある。

ITS の構成要素

新規および既存の化学物質に関する現行の EU 法の下で、非試験法 ((Q) SAR 分類法) および *in vitro* 法の規定使用は制限されており、加盟国によって著しく異なっている。この原因は、科学社会および規制社会ではそれらの適用に関して、また評価をどの程度信頼することができるかに関して、取り決めがなされていないためである。ガイダンスの検証、適用範囲の制限、可用性の低さなどが、規制試験に対するこれらのアプローチを主として制限している。しかし、一部の方法はすでに化学物質に関する EU 法の一部である。したがって、EU 加盟国では一部の規制はすでに実施・受理されているが、さらに努力することが必要である。

in vivo 試験の最適化は、a) 関連データが得られる試験のみを実施する、b) 冗長な試験を除く、c) 一方の性だけを使用する、d) 同一動物に対していくつかの試験を同時に実施する、e) スクリーニングや予備試験をさらに利用する、ことを行い、今後の研究を保証する有用な選択肢であると広くみなされている。

試験が曝露により中止になる (*exposure based waiving*) 可能性は、特に(Q)SAR や read-across が伴うときは期待が持てるが、曝露モデルの開発にはさらに投資が必要であり、化学物質の使用パターンに関する詳細な情報 (例えば、下流の用途情報) や、現在障害となっている適所のリスク軽減手段に関する詳細な情報が必要である。REACH の下で、曝露シナリオの概念を操作可能にすることにより、この解決を成功させるべきである。曝露シナリオは、物質に対する対応戦略に関する説明であり、物質の製造に関する現実の操作上の条件、または、物質、一群の物質、または製剤の確認された使用について情報が得られる。

トキシコゲノミクスアプローチは、既存アプローチの直接的な代替法としてまだ十分に開発されていないと認識されているが、ケースバイケースで有効な証拠が得られる可能性がある。これらの方法により、汚染物質の曝露および影響に関する証拠をさらに得ることができる。

本報告書では、3つのエンドポイント (環境劣化、感作、生殖毒性) に関して、ITS、WoE、ITSすべてを含む1つの要素について考察する。主要考察ポイントおよび結論を以下に示す。

WoE

ITS の WoE に関する考察はまだ歴史が浅い。WoE はリスク評価の文献で言及されることが

多いが、適切な資料はない。多くの場合、どの方法を用いたか、どのようにして科学的証拠に適用したのか、結果はどのようなものであったのか、特定のリスク評価において決定を行うためにこれらがどのように用いられたか、については明らかではない。定性および定量の両増量法が現在用いられている。WoE における重要な問題は、認識しただけ明白にさせることが必要な、専門家の判断の影響である。評価する情報の種類、評価する理由、用いられる品質基準を文書化するべきである。解釈手段ならびに増量法は平明でなければならない、科学的証拠と（入力された値）専門家の判断とが明確に区別される必要がある。

化学物質に関する予備知識はベイズ的枠組みの WoE アプローチに用いることができる。このアプローチは本報告書で説明されており、生分解データに関して実証されている。このような予備知識は、例えば同様の化学物質の分類に関する実験結果から求める、またはモデル予測から得た情報から求めることができる可能性がある。ベイズ解析の長所は、ひとたび専門用語と表記法に精通すれば、モデル予測の結果に関する予備知識の影響を比較的簡単な計算で実証することができる点である。したがって、試験の結果に関して不確実性が高くなった場合は、追加情報の結果を評価することができる。しかしこれは、解析の結果は確率で表されるため、この情報の利用者はどの確実性が許容でき、どれができないのかを決定する必要があることを強調している。

ベイズの統計を利用することで、ITS の逐次的段階における追加情報の情報価値を定量化できることが、現在の解析によって示されている。予測値はモデルバッテリーを適用することで改善できるとはいえ、生分解の例で示されたように、モデルの結果で満足されているのか、詳細試験を実施する必要があるのかを判断する必要がある。この判断は、人が受け入れる意思のある不確実性のカットオフ確率に関する同意の問題だけでなく、コストや可能性のあるリスクの大きさに関してさらに考察することも同じく重要である。したがって、意思決定に対する統計的枠組みを拡大する必要がある。生分解データに関して示したような現在の適用は、異なる評価エンドポイントに対して拡大する必要がある。更新処理プロセスは理論的には常に同じとなるが、個別データや連続データなどさまざまな種類の情報および専門家の判断を取り扱うには変動が必要である。

生分解

本報告書は、環境劣化への QSAR の適用の現状を、分類・表示、PBT（難分解性、高濃縮性、有害性）評価、リスク評価に関して簡単に検討する。さらに、1 つの ITS の範囲内の生分解および生分解製品の評価のツールとして CATABOL（生分解性予測モデル）の有用性に焦点を当てる。

新規化学物質および既存化学物質に関する現行の EU 法の下で、評価モデルまたは(Q)SAR

の規制使用は制限されており、予備的な性質のものである。生分解性が利用できないと予測する場合モデルは優れた性能を示すという事実を考慮する。曝露評価をする際、物質が容易に分解されるか容易には分解されないと判断することができる場合と、分解速度定数が十分な確実性で予測可能である場合にのみ、(Q)SAR を適用することができる。

分解が起きる場合、分解の原因と考えられる製品の性状（毒性作用を含む）を考慮すべきであると EU の TGD は強調しているが、多くの化合物に関してはその情報は存在しない。ガイダンスでは、懸念の代謝産物を特定できる基準を確立し、代謝産物が問題でなくなる時期を決定する必要がある。しかし分解経路に関する研究は、複雑で費用がかかり、システム内で分解産物を同定するのは極めて困難なことが多い。化学物質の生分解経路における生物分解性の定量評価に用いることができる有望なモデルは CATABOL である。このシステムは最も妥当と思われる生分解産物を作成し、それらの物理化学的性質および毒性のエンドポイントの定量的評価を行うことができる。

CATABOL の解析の主な結論は以下の通りである。

1. 予測の優れた点が BOD(生化学的酸素要求量)のカットオフ値 60%に関連している場合、CATABOL は「容易に生分解されない」との予測で十分に機能する。検証試験では、「領域外」である物質の BOD の予測は「定義域内」である物質の予測とほぼ同程度に優れていることが示された。容易に生分解される物質に関しては、この性能は低い。この検証試験で選択された化学物質の多くは容易に生分解されないため、「容易」予測の優秀性に関して結論を出すには適していない。
2. 一部の既存化学物質と作られた農薬の主要代謝産物の検証により、土壤中で形成された主要代謝産物を同定する CATABOL の予測力は低いことが明らかになっている。多くの主要代謝産物は予測されるが観察されず、多くの観察された代謝産物は予測されない。これらの物質の多く (>90%) は「領域外」である。「領域内」化学物質の数は非常に少なく、「領域内」である物質に関して性能が優れているかどうかを評価することは不可能である。
3. しかしデータがない場合は、BOD または土壤中に残存する量から DT50 を求めて、土壤中での分解速度を推定することはできる。この方法で予測した値は、(最悪の場合) リスク評価の上限値として用いることができる可能性がある。
4. 土壤中で形成された代謝産物の予測性能は低いにもかかわらず、CATABOL は物質の生物分解性を十分に予測する。多数の化学物質 (4.7.3 項参照) に関しては、CATABOL で確認されていることを親化合物が持続すべきであることが、スクリーニングデータから示されている。扱いにくい断片によって変換が妨害されるかどうかを CATABOL は評価することができるが、扱いにくい分解産物の正確な同定を予測することはできない。

概して、これまで考察した不確実性にもかかわらず、また調査した多くの物質が領域外であるという事実にもかかわらず、CATABOL の予測は WoE アプローチにおいて有用である、

あるいは詳細試験をターゲットにする場合に有用であると思われる。情報がほとんどないかまったくない物質に関しては、例えば、それらの $\log K_{ow}$ をそれらの生体内蓄積の可能性の指標として予測することにより、CATABOL は最初の分解がおきやすいかどうか、また形成された代謝産物が重要であるかどうかを調査するのに用いることができる可能性がある。CATABOL によって、親化合物の BOD に加えて分解産物の量に関する情報が得られるということは、リスク評価および試験をターゲットにする場合に極めて有用となる特質である。CATABOL は read across の検証にも用いることができる。

感作

感作のセクションでは、このエンドポイントに関する ITS の RIP 3.3-2 エンドポイント作業部会 (RIP 3.3-2 Endpoint Working Group) の 2006 年末までの考察を反映している。これには、本報告書を可能にした 2 つのプロジェクトがサポートした作業部会に対するオランダ代表団の貢献について記載されている。

皮膚感作危険性の評価に利用できる多種多様な(Q)SAR や専門システムが存在する。これらのアプローチは極めて多様で、in vivo データセットが異なれば、各アプローチも異なる。多くの場合、これらのモデルは皮膚感作の正確な予測は妥当であることが証明されているが、非感作物質の正確な予測には制限がある。この理由から、モデルの予測を慎重に解釈するには、他の情報、例えばアナログ read-across を考慮検討する必要がある。さらに研究を重ね、反応しない化学物質のみならず、化学変換または代謝変換を受ける可能性が高い化学物質に関するさらに多くの知識や法則のコード化を探索すべきである。

現時点では、皮膚感作に関する公式に採用された EU-OECD in vitro 試験は存在しない。しかし、感作過程の根底にある生化学的および免疫学的機序の理解が深まったことに基づき、数種類のシステムが開発途上にある。現行の in vitro アッセイでは、感作過程の(特定の)部分のみが対象とされており、今のところ in vitro データは他のデータと共に WoE アプローチでのみ用いることができ、現在は感作物質の陽性同定のみ用いることができる。

皮膚感作の機序は複雑なため、1 回の非動物試験では完全な in vivo 実験の代わりとすることはできないと思われる。しかし、おそらくこれを最終的な目標とするべきではない。非試験アプローチおよび試験アプローチに基づく、段階的アプローチは現実性が高いと思われる。非動物試験法からなる段階的 ITS アプローチ (おそらく、わずかな比率の化学物質総量にとって最後の手段としての in vivo 試験も含まれる) は、しばらくの間は現実的であると思われる。しかしこれは、2007 年 6 月に REACH が開始する前に実施されるとは予想されていない。

非動物 ITS が科学的に時期尚早であるという以外に主に障害となっているのは、このよう

な総合試験を実施したいという業界の意欲であろう。特に、非動物 ITS が *in vivo* の代替法よりも費用や労力がかかる場合にはその可能性が高い。この代替アプローチに対する別の脅威は、来るべき GHS (Globally Harmonised System : 世界調和システム) の導入によっておそらく効力の概念が導入されることであろう。RIVM はすでに、感作に関する効力ランキングの導入の可能性に関する国家のおよび国際的な考察に関わっているが、さらに努力することでリスク評価戦略を意味する可能性の評価を実施できる可能性がある。

皮膚感作可能性を測定するためのさまざまなモルモットとマウスの *in vivo* 試験の実施および適用性領域に関しては、依然として多くの議論がなされている。REACH では、LLNA は *in vivo* 試験の第 1 選択法として述べられている。この種の試験が批判的に評価されると、他の *in vivo* 試験を実現する必要があると結論される可能性がある。REACH は呼吸器感作に関する試験要件を含めていない。低分子量化合物の呼吸器アレルギー性を検出するためのいくつかの試験プロトコルが発表されているが、いずれも検証はされておらず、広く受け入れられてもいない。利用可能な(Q)SAR および呼吸器感作の *in vitro* 試験がない場合は、呼吸器感作に関する非試験データの評価に関するガイダンスを追加提供することは不可能である。したがって、呼吸器感作に関するモデルおよび試験ガイダンスの開発を促進する必要がある。WoE 評価では、LINA で陰性の化学物質、および皮膚感作ではないと考えられている化学物質は、気道のアレルギー感作を引き起こす可能性がないとみなすことができると結論することは可能だろう。

生殖毒性

来るべき規制の変更を考慮すると、ITS の効果を現在まで後ろ向きに追跡評価する必要がある。化学試験から 20 年以上を経て、著しい量の毒性データが作成されている。この毒性データは後ろ向き解析に用いることができる。本報告書では、亜慢性試験が可能な場合の 2 世代生殖毒性試験のリスク評価に対する付加価値、2 世代生殖毒性試験内の第 2 世代のリスク評価への影響、ラットの発生学的研究が利用できる場合のウサギの発生試験のリスク評価に対する付加価値、などに焦点を当ててこのような試験に関して述べた。3 つの解析すべてで、求めた NOAEL および生殖力への毒性の分類を評価する。現在生殖毒性を分類されている物質の多くをその解析に含めた。さらに、発生毒性のデータを医薬および獣医薬に関して含めたことから、評価した物質の数は著しく多くなった。本試験ではとりわけ、2 世代試験を行わない場合は分類されないと思われる生殖毒性物質の比率に関する情報や、2 世代試験で求めた NOAEL と亜慢性試験で求めた NOAEL 間との差に関する情報を提供する。さらに、REACH の下での ITS の結果の意味を考察する。

これらの解析から得られた結果は、専門雑誌に公表するとともに国際会議で発表する。

J.D. Hamilton et al. / Regulatory Toxicology and Pharmacology, 46, 84-92, 2006.

The role of professional judgment in chemical hazard assessment and communication

化学物質の有害性評価および 危険有害性周知における専門的判断の役割

抄録

国内外を問わず、有害性評価ガイドラインおよび規制基準の多くは、有害性評価の専門的判断を肯定している。しかし、実際の専門的判断の適用は（いつ、どのようにその判断を適用すべきか）、評価者の裁量に任されることが多い。これにより、化学物質の使用、取り扱い、廃棄に関する手引きに一貫性がなくなり、最終的には効果的でない危険有害性周知および化学物質管理を招いてしまう。本論文では、有害性評価における専門的判断を世界の主要な規制および専門的基準に適用できるよう、規制の理論的解釈および立法上の規則を調査する。専門的判断を適用する一連のガイドラインは、論理的な毒性学の概念や原理と一貫性を示す規制や基準から導かれており、毒性学者および有害性評価基準遵守の責任を負う産業衛生士の経験を基にした説得力のある具体例で示されている。これらのガイドラインおよびその具体例は、国際的な規制に完全に準拠していること、評価の厳格さに関して中立的な判断を示していること、そしてより効果的で完全な危険有害性周知を構築する取り組みを反映しているものと考えている。ここでは、GHS (Global Harmonization System of Classification and Labeling of Chemicals : 化学品の分類及び表示に関する世界調和システム) および REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals : 新化学物質規制) の下での、有害性評価における専門的判断について、規制の影響およびより優れた定義づけに必要なものを議論する。

キーワード: 有害性評価、GHS、REACH、専門的判断、専門家の意見、MSDS (Material Safety Data Sheet : 製品安全データシート)

1. 緒言

職場や家庭での健康有害性評価および化学物質の予防表示の整備には、専門的判断が必要となる。広範囲の化学物質およびそれらの使用背景を考慮すると、化学物質の有害性データを正確に解釈し、危険にさらされている可能性のある集団に対して予防策を効果的に周知させるためには、専門的判断が必要である。有害性評価ガイドラインおよび規制基準すべてではないにしても、国内外を問わず、その多くは有害性評価の専門的判断を肯定している。しかし、実際にこうした判断の適用は（いつ、どのようにその判断を適用すべきか）、評価者の裁量に任されることが多い。これにより、化学物質の使用、取り扱い、廃棄に関する手引きに一貫性がなくなり、最終的には効果的でない危険有害性周知および化学物質管理を招いてしまう場合がある。

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development : 経済協力開発機構) および ILO (International Labour Organization : 国際労働機関) と協力体制を取りながら、国連が自身の「化学品の分類及び表示に関する世界調和システム (GHS)」を通じて、化学物質の分類および危険有害性周知を調和させる世界的な構想をまとめ上げようとしている (国際連合、2005 年)。有害性評価および危険有害性周知の内容と書式に関する GHS の影響は非常に大きく、世界中で数百万もの危険有害性周知に影響を与えることになる (つまり、製品安全データシート (MSDS)、欧州連合 (EU) 安全データシート)。GHS の化学物質分類システムは、欧州連合による包括的な化学物質の評価および管理システムである REACH (新化学物質規制案、欧州委員会、2006 年) に組み込まれる予定である。GHS におけるエンドポイント、分類基準、予防表示の規則は世界標準となる可能性が高く、また本論文の公表から 2 年以内に REACH により実現されると考えられる。

REACH の下では、EU 加盟国が化学物質分類の認可を続ける可能性が高く、そして GHS 標準に上乘せする形で追加の情報要件を設けることも考えられる。既存の有害性評価プログラムでみられる矛盾点が問題になっているが、これは GHS および REACH を介しても容易に解決することはできない。毒性学者、産業衛生士、および有害性評価と危険有害性周知に携わる者は、分類を目的とした巨大データベースの解釈について、さまざまな不明点および「疑問の残る判断」に直面することになる。GHS の下での化学物質分類におけるエンドポイントおよび基準は、EU 安全データシートや ANSI (American National Standards Institute : 米国規格協会) の MSDS のものとは異なるため、化学物質の分類を確実に実施するためには、更新されたデータベースを再度注意深く検証することが必要となる。

時期的な観点からも、有害性評価における専門的判断の役割を考慮に入れることは非常に重要なことである。GHS および REACH が施行される前に、有害性評価者に一任されている自由裁量の程度および専門的判断の基準を定義し、明確にしておいたほうがよい。こうした話し合いを前進させるために、本論文では、欧州および北米の主要な法律、規制、専門標準に、有害性評価における専門的判断を適用する規制当局について調査する。この情報ベースから、有害性評価における専門的判断を適用する際に、世界中の規制に共通するテーマとして浮かび上がる 6 つの基本となるガイドラインを導き出した。この提唱ガイドラインは、国際的な規制の精神および目的を完全に遵守していること、評価の厳格さに関して中立的な判断を示していること、そして効果的な危険有害性周知を実践するのに役立つものであると考えている。このガイドラインは、有害性評価の責任者であり、かつ化学物質の分類および表示における専門家の経験を基にした説得力のある具体例で示されている。

2. 有害性評価における専門的判断に必要なもの

有害性評価および危険有害性周知は、化学物質の安全使用を徹底するのに役立つ、意志決定をサポートするツールであり、化学物質評価体系の中でなくてはならない位置にある (Pittinger 他、2003 年)。他の化学物質評価用ツールと同様に、化学物質の有害性評価に