

201524020A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

AOP および IATA に立脚した国際的な

安全性評価手法の確立

(H27-化学-指定-003)

平成 27 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 28(2016)年 4 月

# 目 次

## I. 総括研究報告

|   |   |
|---|---|
| AOP および IATA に立脚した国際的な安全性評価手法の確立<br>西川 秋佳 ----- | 1 |
|---|---|

## II. 分担研究報告

|  |     |
|--|-----|
| 1. 免疫抑制、光毒性および生殖毒性に関する試験法ガイドライン<br>および AOP の開発 ----- | 1 2 |
| 小島 肇   |     |
| 2. 発がん性試験および生殖毒性試験の AOP 開発-----                      | 2 1 |
| 小川久美子  |     |
| 3. 内分泌かく乱化学物質試験の試験法ガイドライン開発----                      | 2 4 |
| 小野 敦   |     |
| 4. 光毒性試験の AOP および IATA の開発-----                      | 3 4 |
| 尾上 誠良  |     |
| 5. 哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験の評価に関する研究<br>山田 雅巳 -----        | 4 7 |
| 6. Bhas 形質転換試験のプロトコル整備 -----                         | 6 4 |
| 山影 康次  |     |
| 7. 国際状況の調査 -----                                     | 6 9 |
| 仲井 俊司  |     |

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 7 4

Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷り ----- 8 5

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
AOPおよびIATAに立脚した国際的な安全性評価手法の確立  
平成 27 年度総括研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター

研究要旨

本研究は、経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）の進める安全性評価の国際的な潮流に乗り、日本が得意とする分野で主導的に AOP（Adverse Outcome Pathway）や IATA（Integrated Approaches to Testing and Assessment）を提案することを目的とする。一方で、並行して化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある試験法について、バリデーションおよび第三者評価を実施または支援することにより、OECD 試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）を成立させることを目指す。

具体的には、免疫抑制、生殖発生毒性、発がん性および光安全性に関する日本発の AOP 案を作成し、また光安全性や免疫抑制について日本主導で IATA 案の作成を進める。一方、*in vitro* 皮膚感作性試験 ヒト樹状細胞株を用いた検出法（h-CLAT: human Cell Line Activation Test）、*in vitro* 発がん性スクリーニング Bhas 形質転換試験（Bhas 法）、*in vitro* アンドロゲン受容体転写活性化法（AR STTA: Androgen Receptor Mediated Stably Transfected Transcriptional Activation）、発生毒性試験スクリーニング Hand1-Luc EST（Embryonic Stem cell Screening）および光安全性試験スクリーニング（ROS: Reactive Oxygen Species）アッセイ、遺伝毒性試験 チミジンキナーゼ遺伝子突然変異試験について、TG またはガイダンスを成立させることを目指している。

当該年度は、主に化学物質による免疫抑制および発がん性の AOP 案作成を推進した。また、h-CLAT、Bhas 法、AR STTA の TG またはガイダンスが成立の見込みとなった。

キーワード： OECD 試験法ガイドライン、AOP、IATA、免疫抑制、生殖発生毒性、発がん性、光安全性、皮膚感作性、内分泌かく乱、遺伝毒性

研究分担者の氏名・所属機関名及び所属機関における職名

|       |                             |      |  |
|-------|-----------------------------|------|--|
| 小島 肇  | 国立医薬品食品衛生研究所 安全性<br>予測評価部室長 | 山田雅巳 | 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺<br>伝部室長                 |
| 小川久美子 | 国立医薬品食品衛生研究所 病理部<br>長       | 山影康次 | 食品薬品安全センター秦野研究所<br>代替法試験部長               |
| 小野 敦  | 国立医薬品食品衛生研究所 安全性<br>予測評価部室長 | 築瀬互一 | 日本化学工業会 化学品管理部長<br>(平成 27 年 12 月 21 日まで) |
| 尾上誠良  | 静岡県立大学 薬学部教授                | 仲井俊司 | 日本化学工業会 化学品管理部長                          |

(平成 27 年 12 月 22 日から)

## A. 研究目的

昨今の動物実験の 3Rs に対する国際的な訴求に加え、医薬品の安全性評価における実験動物とヒトとの種差、動物の週齢差による毒性発現の相違等が明らかになってきたことから、動物実験からヒト材料を用いた試験、あるいは毒性作用機構に基づく安全性評価手法の開発が進んでいる。経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) でも、毒性発現機構を明確にするために AOP (Adverse Outcome Pathway) を作成し、それらの情報を網羅した IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) により化学物質の行政的な安全性評価を推進する戦略を進めている。その理由の一つが、動物実験代替法として開発された *in silico* や *in vitro* 試験のみでは、局所毒性でさえも限られた有害性の同定にしか利用できず、リスク評価は困難であることが明確になってきたからである。ましてや、実験結果が複雑多岐にわたる反復投与毒性、生殖発生毒性、感作性、発がん性などの評価には AOP に立脚した手法を開発し、曝露情報を考慮した IATA を用い、リスク評価を行っていく必要が生じている。

本研究は、このような OECD の戦略の中で安全性評価の国際的な潮流に乗り、日本が得意とする分野で主導権を取って AOP や IATA の作成を押し進める。一方で、それと並行して化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある試験法について、バリデーションおよび第三者評価を実施または支援し、OECD 試験法ガイドライン (TG: Test Guideline) を成立させることを目指すものである。

## B. 研究方法

### B-1) AOP案の作成と提案

#### (1) 情報の共有化 (小島):

OECD EGMST (Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics) に参加して、情報を収集し班員と共有した。

#### (2) 免疫抑制 (小島):

日本免疫毒性学会の協力を得て、免疫抑制の AOP (事例研究) の作成を進めた。

#### (3) 発がん性 (西川、小川):

ホルムアルデヒドによる鼻腔発がんに関する情報を収集し、AOP の提案を進めた。ラット及びマウスを用いた反復投与毒性試験の結果、疫学によるヒトのデータ、遺伝毒性、代謝ならびに細胞傷害などの局所所見に関するデータ等を収集/整理し、発がん機序について体系的にとりまとめた。

#### (4) 光安全性 (尾上、小島):

6 種類の benzophenone 誘導体 (BZPs) をモデル化合物として用い、UV/VIS 吸収測定、ROS assay ならびに 3T3 NRU PT による光化学・光生物学的特性評価および経皮的 cassette-dosing PK study による皮内動態評価によって得られるデータを統合的に解析することで、経皮適用化合物の光毒性リスクを効果的に予測できるか否か検証を行った。

#### (5) 生殖発生毒性 (初期事象) (小島、小川):

住友化学株式会社の協力を得て、関連学会の専門家とともに AOP 案を主導的に作成した。

### B-2) IATA 案の作成と提案

#### (1) 発がん性 (西川、小川):

英国主導で進められている非遺伝毒性発がん性に関する IATA の作成に協力した。

#### (2) 光安全性 (尾上、小島):

IATA 案を作成する。ICH S10 ガイドラインの適用拡大を指向し、多くの化合物に適用可能な毒性予測性や変動を網羅的に調査した。

#### (3) 免疫抑制 (小島):

OECD で進められている皮膚感作性に関する IATA の作成に協力した。

### B-3) TGまたはガイダンス案の作成と提案

- (1) ヒト樹状細胞株を用いた *in vitro* 皮膚感作性検出法 (h-CLAT: human Cell Line Activation Test) (小島) :  
国内外の専門家とともに、h-CLAT の TG 成立を推進した。
- (2) *in vitro* 発がん性スクリーニング Bhas 形質転換試験 (Bhas 法) (山影) :  
96 ウェルプレートに Bhas 42 細胞を播種し、OECD のガイダンスドキュメントに従ってイニシエーション試験およびプロモーション試験を実施した。培養終了後、メタノールで固定し、そのプレートを 1%メチレンブルーで核酸を染色し、余分な染色液を洗浄したのち 0.1 mol/L 塩酸でメチレンブルーを抽出し、677 nm の吸光度を測定した。この吸光度法の有効性を調べるために、過酸化水素法で観察法と結果が不一致となった benzo[a]pyrene、zinc chloride、L(+)-ascorbic acid を用いて試験を行った。
- (3) アンドロゲン受容体転写活性化法 (AR STTA: Androgen Receptor Mediated Stably Transfected Transcriptional Activation) (小野) :  
我が国で提案したアンドロゲン受容体転写活性化試験法 (AR STTA 法) の OECD ガイドライン化に向けたレビューコメントへの対応を実施し、ガイドライン最終案を OECD に提出した。また、我が国からの提案により PBTG (パフォーマンス基準テストガイドライン) 化された TG455 : ER 転写活性化試験法について、ER $\alpha$  CALUX assay の検証試験結果のピアレビューを担当し、TG455 への掲載による改定作業を行った。関連プロジェクトとして、JaCVAM 資料編纂委員会における評価報告書の作成、韓国より提案された 22Rv1-MMTV ARTA アッセイバリデーション試験、ICCVAM Androgen Receptor

Reference Chemical Working Group における AR 試験法開発のためのリファレンス化合物リスト作成に向けた検討を実施した。

- (4) 発生毒性試験スクリーニング Hand1-Luc EST (Embryonic Stem cell Screening) (小島、小川) :  
バリデーションおよび第三者評価結果をもとに、OECD の TG 化を進めた。
- (5) 光安全性試験スクリーニング ROS (Reactive Oxygen Species) アッセイ (尾上、小島) :  
ICH のガイドラインを考慮の上、OECD の TG 化を推進した。
- (6) 遺伝毒性 (山田) :  
発がん物質のトランスジェニックげっ歯類遺伝子突然変異試験 (TgR 試験) データベースから、Ames 試験陽性で、TgR 試験陰性の物質および、Ames 試験陰性で、TgR 試験陽性の物質を検索し、それぞれ必要データをまとめた。  
Mitchell らが 1976-1993 の文献を調査し、602 の化合物について、適切な発がん試験が実施されている化合物を抜粋し、化合物名、CAS 番号、発がん試験の判定、および MLA の判定をまとめ、さらに MLA の試験データを検索し、追記した。

### B-4) 情報収集 (築瀬、仲井)

OECD で 8 か月ごとに開催されている化学品合同会合 (Joint Meeting of Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology) の第 54 回会合 (2016 年 2 月開催) の SCHEDULE OF ACTIVITIES FOR 2016 (ENV/JM(2016)21) 1) に記載されている試験法開発状況および Community site に記載されている Overview of all projects on the workplan) を調査した。

### 倫理面への配慮

本研究は動物実験の 3Rs に配慮して試験法の開発を主とするものであり、動物実験は必要に応じ

て行う可能性はあるが、その際は動物使用数や動物に与える苦痛は最小限に留める。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規定」に従い、動物実験委員会の承認のもとに行う。ボランティアおよびヒト組織は使用しない。

## A. 研究結果

### C-1) AOP案の作成と提案

#### (1) 情報の共有化：

OECD EGMSTのメンバーとして、AOPに関する情報を収集した。さらに、OECDガイダンスであるAOPの作成法に関する情報を共有化するため、研究班内で勉強会を開催した。

#### (2) 免疫抑制：

「FK506による免疫抑制（事例研究）」に関するAOP案をOECD事務局に提出した。その結果、事務局よりタイトルに化学物質名を入れないよう指示があったため、「酵素のリン酸化による免疫抑制」としてAOP案作成を継続することになった。

#### (3) 発がん性：

収集／整理したデータに基づいて「Proposed adverse outcome pathway (AOP) for formaldehyde-induced nasal cavity carcinogenicity：ホルムアルデヒドによる鼻腔発がん（事例研究）」としてAOP案を作成し、OECD事務局に提出した。単一の化学物質の機序に基づいて作成したAOPであっても、リファレンスの化学物質名をタイトルに含めるのは望ましくないとされたため、「細胞傷害による鼻腔発がん」に関するAOPとして作成計画が認められた。

#### (4) 光安全性：

化合物の光化学・光生物学的特性評価並びに経皮的 cassette-dosing PK studyの結果を統合的に解析することにより、BZPsの *in vivo* 光毒性リスクを効果的に予測することができた。

また、化合物の光反応性を評価することで、光アレルギーを含む各種光毒性リスクを包括的に予測できる事を示唆した。さらに、本評価系では薬物動態学的評価（皮膚蓄積性評価）に cassette-dosing 法を用いているため、PK study におけるスループットが大幅に向上するだけでなく、使用実験動物数およびコストの大幅な削減が可能であった。

#### (5) 生殖発生毒性：

生殖毒性のマーカーとして住友化学が着目している Hand 1 遺伝子を中心に AOP 作成を検討した。本遺伝子は心臓の形成に重要な遺伝子であるが、骨や手肢の形成にも関与していることが示唆された。この遺伝子に関係した DNA 合成や分子経路の異常に着目して AOP 案を作成し、来年度には EAGMST に申請する予定である。また、AOP 案作成に必要な生殖発生毒性代替法、特にゼブラフィッシュを用いる方法に関する情報収集を進めた。

### C-2) IATA 案の作成と提案

#### (1) 発がん性：

非遺伝毒性発がん性 IATA の策定メンバーに西川および小川が参画することになり、2016年3月開催のOECD専門家会議に西川が出席した。

#### (2) 光安全性：

IATA 案に資するため、AOP および TG 案の作成を進めた。

#### (3) 免疫抑制：

OECD 事務局が進めている IATA ガイダンスおよび皮膚感受性ガイダンスの作成に協力した。

### C-3) TGまたはガイダンス案の作成と提案

#### (1) ヒト樹状細胞株を用いた *in vitro* 皮膚感受性検出法 (h-CLAT)：

開発者である資生堂および花王の専門家と TG 案を作成し、EURL ECVAM との調整後、OECD 事



務局に提出した。10月に開催された OECD 皮膚感作性試験専門家会議にて、本 TG 案が審議され、内諾を得た案について、OECD にてコメント募集が実施されている。

(2) *in vitro* 発がん性スクリーニング Bhas 形質転換試験 (Bhas 法) :

かなりのウェルでフォーカスが壁面に存在し、高い吸光度であるにもかかわらず陰性ウェルと判定していたウェルの多くが陽性ウェルであることが明らかとなり、メチレンブルー染色では陽性ウェルと陰性ウェルは吸光度 0.16 で完全に分かれた。吸光度の値 (カットオフ値) を 0.2 と設定した場合、benzo[a]pyrene については、過酸化水素法で偽陽性となったプロモーション試験がメチレンブルー染色では観察法と同じ陰性となったが、イニシエーション試験も陰性となり観察法と一致しなかった。Zinc chloride については、過酸化水素法で陽性となったイニシエーション試験がメチレンブルー染色では観察法と同じ陰性となり、観察法と完全に一致した。L(+)-ascorbic acid については、過酸化水素法で陽性となったイニシエーション試験がメチレンブルー染色では陰性となり、観察法と完全に一致しなかったが、発がん性の結果と一致した。

(3) アンドロゲン受容体転写活性化法 (AR STTA) :

AR 転写活性化試験法 (AR STTA 法) について、平成 29 年度中にガイドラインとして成立の見込みとなった。また、AR STTA 法に関連して、韓国より提案された 22Rv1-MMTV ARTA アッセイバリデーション試験に試験管理チームとして参加し、検証試験計画について議論を行うとともに、ICCVAM Androgen Receptor Reference Chemical Working Group において AR 試験法開発のためのリファレンス化合物リスト構築を行った。ER 転写活性化試験法 (ER STTA 法) に関連して、新たに同等試験として提案された ER $\alpha$  CALUX assay のバリデーション試験についてピアレビューを実施して、

VMG-NA で議論の結果、TG455 への掲載の合意を得た。また、JaCVAM 内分泌かく乱試験法資料編纂委員会において「ER STTA 法 : *in vitro* ヒトエストロゲン受容体活性物質試験法の評価報告書」を作成した。

(4) 発生毒性試験スクリーニング Hand1-Luc EST :

バリデーションの経過を注視した。バリデーションが終了し次第、第三者評価を進めた。

(5) 光安全性試験スクリーニング ROS アッセイ : ROS アッセイを OECD の TG にするため、SPSF (Standard Project Submission Form) を作成し、OECD 事務局に提出した。

(6) 遺伝毒性 :

Ames 試験陽性で、TgR 試験陰性の物質の数は 13、Ames 試験陰性で、TgR 試験陽性の物質の数は 15 だった。追加調査の結果、4 物質について、*HPRT* 遺伝子を用いた突然変異試験等の結果が得られた。Mitchell らの精査した 602 化合物の中で、発がん試験が適切に実施されている 243 物質のデータを抜粋した。1999 年以降の文献から CAS 番号を持つ物質の MLA データが 63 得られ、6 物質について MLA データを追記した。追加により、MLA のデータがあるものは 210 物質となり、発がん試験の結果の内訳は、陽性が 152、陰性が 45、その他 (equivocal もしくは結論できない) が 13 となった。発がん試験の結果が陽性の物質は 152 で、MLA 陽性が 116 (76%)、陰性が 3 (2%)。発がん試験の結果が陰性の物質は 45、うち MLA が陽性のものは 8 (18%)、陰性は 9 (20%) だった。

C-4) 情報収集

ヒト健康関連では 32 個の TG および GD の開発・修正が進められている。このうち 11 個が endocrine disruptors に関するもの、6 個が眼/皮膚の刺激性評価に関するもの、5 個が遺伝毒性の評価に関

するもの、3個が皮膚感作性評価に関するものであった。この中には哺乳動物を用いた試験評価における3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) を考慮した内容を含むものも多かった。なお、このうちの2個はIATAに関するものである(眼の刺激/障害性や非遺伝毒性発がんの評価)。第52回会合時(2014年11月)と比べて、今回(第54回会合)は400番台の項目として19個が新たに追加されていた。

#### D. 考察

AOPについては、海外から専門家を招聘し、トレーニングセミナーを開催することにより、AOPの理解を研究班はもとより、班以外にも広げる。これにより、日本からより多くのAOPが提案できるよう努める。現在提案中の「酵素のリン酸化による免疫抑制」および「細胞傷害による鼻腔発がん」のAOP作成を継続していくとともに、光安全性と生殖発生毒性のAOP案を平成28年度内にOECDに提案する予定である。

ホルムアルデヒドの吸入による鼻腔発がんについては、げっ歯類とヒトにおいて共通の機序を介していると考えられる。全身曝露によって、げっ歯類の鼻腔に細胞毒性を示すが、発がん性は示さない化合物も報告されており、全身曝露によって鼻腔に細胞毒性を示す化合物のすべてが鼻腔にがん原性を示す訳ではないとの意見も見られている。また、DNAと化学物質の結合がみられる臓器がすべて発がんに至るわけでもない。DNAとの結合性と細胞毒性の両機構が関与することによって発がん性が誘導されることになる可能性が示唆されるが、はじめのkey eventとしては細胞傷害が想定され、修正を加えながら、まとめる必要がある。

本研究で構築した新規光安全性係系は高い生産性および予測性を有し、多様な化合物への適用が可能であるため、経皮適用化合物の光安全性評価スクリーニングとして有用であろう。また、ROS assay および cassette-dosing 法の利用は動物

実験における3Rsの原則への貢献も大きく、本評価係が創薬を含む各種製品開発の現場で活用されることで実験動物福祉の向上に寄与しつつ光安全性の高い新規製品の創出支援となることを期待する。

IATAについては、非遺伝毒性発がん性、感作性および来年からOECDで本格化する眼刺激性に関するIATA作成に協力する。光安全性のIATA案作成については、まずはAOP案を平成28年度内にOECDに提案してその必要性を探っていく一方で、ROS アッセイに基づいてIATA案の検討を続ける。具体的には、ROS アッセイは光安全性反応の上流に位置すると考えているが、他の *in vitro* 試験方法と組み合わせることで光刺激性以外の毒性反応について予測可能か否か評価する。特に Photo-SH や Photo-NH<sub>2</sub> 試験と ROS アッセイを組み合わせることで光アレルギーのリスク予測を試みるとともに、DNA-binding assay と ROS アッセイを組み合わせることで光遺伝毒性のリスク評価が可能か否か検証する。

h-CLAT、AR STTA に関する TG 案のコメント募集に対応し、OECD TG の最終化を行う。また、OECD 事務局に提出した ROS アッセイの SPSF に対するレスポンスに応じて適切に対応する。

本研究で対象としている転写活性化試験法は、OECDとしては初めてのレポーターアッセイ系をベースとした試験法であるとともに、化学物質の内分分泌かく乱性によるAOP (Adverse Outcome Pathway) のMIE (Molecular Initiating Event) の評価系であり、本研究によるOECDガイドライン化は、今後、AOPに基づく試験法のガイドライン化の参考となる有用な知見を与える。メカニズムベースの*in vitro*試験系については、同等の試験系を構築することは難しくはなく、地域により細胞の入手のしやすさなどが異なる可能性もあことから信頼できる試験法であれば選択肢は多いほうが良く、PBTG化は有効である。我が国は、両試験法ガイドライン開発のリード国として、同等試験の

信頼性評価を含む、PBTGのアップデートに引き続き対応していく責任がある。

Bhas 法においては、メチレンブルー染色による吸光度法は、高い偽陽性率となる過酸化水素法の欠点を改善した。しかしながら、今回の判定条件はまだ最適ではないことも判明した。今後、Bhas 42 細胞形質転換試験をガイドライン化あるいはIATA で推奨される試験とするためには、様々な測定法に適用可能なプロトコルを整備し、この試験が簡便かつ汎用性のある試験であることを示し、この試験法による AOP に関連する実験データを含む多数のデータ蓄積を加速させる必要がある。

細胞を用いる遺伝毒性試験系には不適切と考えられる物質を除き、25物質から共同研究の対象物質を選択することにした。発がん試験と MLA 試験の相関を見ると、発がん性があるとされる物質で MLA が陽性になったのは76%で、偽陽性は18%、偽陰性は2%だった。これらの数字から、MLAは発がん性のスクリーニングに適していると考えられた。Ames 試験とトランスジェニックげっ歯類遺伝子突然変異試験の陽性・陰性判定が異なる発がん物質25物質を共同研究の候補とした。MLAは発がん性のスクリーニングに適していると考えられ、ヒトの細胞を使用するTK6試験も同等の役割を果たせるものと推察した。

## F. 研究発表

### F-1) 論文発表

- 1) Matsushita K, Ishii Y, Takasu S, Kuroda K, Kijima A, Tsuchiya T, Kawaguchi, H, Miyoshi N, Nohmi T, Ogawa K, Nishikawa A, Umemura T. A medium-term *gpt* delta rat model as an *in vivo* system for analysis of renal carcinogenesis and the underlying mode of action. *Exp Toxicol Pathol.*, 67: 31-39, 2015.
- 2) Ishii Y, Matsushita K, Kuroda K, Yokoo Y, Kijima A, Takasu S, Kodama Y, Nishikawa A, Umemura T. Acrylamide induces specific DNA adduct formation and gene mutations in a carcinogenic target site, the mouse lung. *Mutagenesis*, 30: 227-235, 2015.
- 3) Akagi JI, Toyoda T, Cho YM, Mizuta Y, Nohmi T, Nishikawa A, Ogawa K. Validation study of the combined repeated-dose toxicity and genotoxicity assay using *gpt* delta rats. *Cancer Sci.*, 106: 529-541, 2015.
- 4) Toyoda T, Cho YM, Akagi JI, Mizuta Y, Hirata T, Nishikawa A, Ogawa K. Early detection of genotoxic urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. *Toxicol Sci.*, 148: 400-408, 2015
- 5) Onami S, Cho YM, Toyoda T, Akagi J, Fujiwara S, Ochiai R, Tsujino K, Nishikawa A, Ogawa K. Orally administered glycidol and its fatty acid esters as well as 3-MCPD fatty acid esters are metabolized to 3-MCPD in the F344 rat. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 73: 726-731, 2015
- 6) Naiki-Ito, A., Chewonarin, T., Tang, M., Pitchakarn, P., Kuno, T., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T. and Takahashi, S. Ellagic acid, a component of pomegranate fruit juice, suppresses androgen-dependent prostate carcinogenesis via induction of apoptosis. *Prostate*. 75: 151-160, 2015.
- 7) Tokudome, S., Kuriki, K., Yokoyama, Y., Sasaki, M., Joh, T., Kamiya, T., Cheng, J., Ogawa, K., Shirai, T., Imaeda, N., Goto, C., Tokudome, Y., Ichikawa, H., Okuyama, H. Dietary n-3/long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids for prevention of sporadic colorectal tumors: A randomized controlled trial in polypectomized participants. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*.

- 94: 1-11, 2015.
- 8) Kuroda, K., Hibi, D., Ishii, Y., Yokoo, Y., Takasu, S., Kijima, A., Matsushita, K., Masumura, K., Kodama, Y., Yanai, T., Sakai, H., Nohmi, T., Ogawa, K., Umemura, T. Role of p53 in the progression from Ochratoxin A-induced DNA damage to gene mutations in the kidneys of mice. *Toxicol. Sci.* 144(1): 65-76, 2015.
  - 9) Inoue, K., Morikawa, T., Takahashi, M., Yoshida, M., Ogawa, K. Obstructive nephropathy induced with DL-potassium hydrogen tartrate in F344 rats. *J Toxicol Pathol.* 28(2):89-97, 2015.
  - 10) Toyoda T, Shi L, Takasu S, Cho YM, Kiriyama Y, Nishikawa A, Ogawa K, Tatematsu M, Tsukamoto T. Anti-inflammatory effects of capsaicin and piperine on *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis in Mongolian Gerbils. *Helicobacter*, 21(2): 131-142, 2016.
  - 11) Goto, K., Ogawa, K. Lanthanum deposition is frequently observed in the gastric mucosa of dialysis patients with lanthanum carbonate therapy: A clinicopathologic study of 13 cases, including 1 case of lanthanum granuloma in the colon and 2 nongranulomatous gastric cases. *Int J Surg Pathol.* 24(1): 89-92, 2016.
  - 12) Speit G, Kojima H, Burlinson B, Collins AR, Kasper P, Plappert-Helbig U, Uno Y, Vasquez M, Beevers C, De Boeck M, Escobar PA, Kitamoto S, Pant K, Pfuhler S, Tanaka J, Levy DD : Critical issues with the in vivo comet assay: A report of the comet assay working group in the 6th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT), *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015 May 1;783:6-12
  - 13) 小島 肇 : 化粧品原料に対する安全性規制の世界動向, *Cosmetic Stage*, 9(4), 1-9 (2015)
  - 14) 小島 肇 : 化粧品等の接触皮膚炎を起こす物質を評価するための動物実験代替法について, *アレルギーの臨床*, 35(5)471, 36-40 (2015)
  - 15) Kojima H, Kasamatsu T: Regulatory science - JEMS symposium in 2014. *Genes and Environment.* 2015; 37:12
  - 16) 小島 肇 : 経皮吸収型製剤開発における基礎と実務への応用, *情報機構*, 71-83 (2015)
  - 17) 小島 肇 : 昨今の皮膚毒性評価法の動向, 谷本学校毒性質問箱, 17, 8-14 (2015)
  - 18) 小島 肇 : 動物実験代替法の変遷と最新動向, *日本化粧品学会誌 創立 40 周年記念*, 39, 72-75 (2015)
  - 19) Sewell F, Ragan I, Marczylo T, Anderson B, Braun A, Casey W, Dennison N, Griffiths D, Guest R, Holmes T, van Huygevoort T, Indans I, Kenny T, Kojima H, Lee K, Prieto P, Smith P, Smedley J, Stokes WS, Wnorowski G, Horgan G: A global initiative to refine acute inhalation studies through the use of 'evident toxicity' as an endpoint: Towards adoption of the fixed concentration procedure, *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015;73(3):770-779.
  - 20) Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, Tice RR, Beevers C, De Boeck M, Burlinson B, Hobbs CA, Kitamoto S, Kraynak AR, McNamee J, Nakagawa Y, Pant K, Plappert-Helbig U, Priestley C, Takasawa H, Wada K, Wirnitzer U, Asano N, Escobar PA, Lovell D, Morita T, Nakajima M, Ohno Y, Hayashi M: JaCVAM-organized international

- validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; Jul;786-788, 45-76
- 21) Morita T, Uno Y, Honma M, Kojima H, Hayashi M, Tice RR, Corvi R, Schechtman L: The JaCVAM international validation study on the in vivo comet assay: Selection of test chemicals, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; Jul;786-788, 14-44
- 22) Uno Y, Kojima H, Omori T, Corvi R, Honma M, Schechtman LM, Tice RR, Burlinson B, Escobar PA, Kraynak AR, Nakagawa Y, Nakajima M, Pant K, Asano N, Lovell D, Morita T, Ohno Y, Hayashi M: JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: I. Summary of pre-validation study results, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; Jul;786-788, 3-13
- 23) Uno Y, Kojima H, Hayashi M: The JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; Jul;786-788, 2
- 24) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T: Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals, *J Appl Toxicol.* 2015; Oct 15.
- 25) 小島 肇: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM)の紹介並びに我が国における動物実験代替法の現状, *LABIO62*, 42-44 (2015)
- 26) Kojima H: The use of 3-D models as alternatives to animal testing. *Altern Lab Anim.* 2015 Sep;43(4): P40-3.
- 27) 小島 肇, 西川秋佳: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM)平成 26 年度報告, *AATEX-JaCVAM*, 4(1), 30-38 (2015)
- 28) 小島 肇: 機能性化粧品素材, シーエムシー出版, 62-69 (2016)
- 29) 小島 肇: VICH セッション 5 所感, *JVPA Digest* 55, 19 (2016)
- 30) 小島 肇: 日本で開発または評価された OECD テストガイドライン, *生物化学的測定研究会年報*, 20 (2016)
- 31) Hirata-Koizumi, M., Fujii, S., Hina, K., Matsumoto, M., Takahashi, M., Ono, A. and Hirose, A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats: perfluorohexadecanoic acid and perfluorotetradecanoic acid. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2, 177-190, 2015.
- 32) Ono, A., Kobayashi, K., Serizawa, H., Kawamura, T., Kato, H., Matsumoto, M., Takahashi, M., Hirata-Koizumi, M., Matsushima, Y. and Hirose, A., A repeated dose 28-day oral toxicity study of  $\beta$ -bromostyrene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2, 191-200, 2015.
- 33) Kato, H., Fujii, S., Takahashi, M., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. and Hirose, A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluorododecanoic acid in rats. *Environ Toxicol* 30, 1244-1263, 2015.
- 34) Seto, Y., Ohtake, H., Onoue, S. [Development of fluorometric reactive oxygen species assay for photosafety evaluation] *Toxicology in Vitro*, 34: 113-9 (2016)
- 35) Onoue, S., Ohtake, H., Suzuki, G., Seto, Y., Nishida, H., Hirota, M., Ashikaga, T.,

- Kouzuki, H. [Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens] *Toxicology in Vitro*, 33: 147-52 (2016)
- 36) Suzuki, H., Kojo, Y., Yakushiji, Yumiki, K., Hashimoto, N., Onoue, S. [Strategic application of self-micellizing solid dispersion technology to respirable powder formulation of tranilast for improved therapeutic potential] *International Journal of Pharmaceutics*, in press.
- 37) Uchida, A., Onoue, S., Ohtake, H., Seto, Y., Teramatsu, T., Terajima, T., Oguchi, T. [Photochemical mechanism of riboflavin-induced degradation of famotidine and a suggested pharmaceutical strategy for improving photostability] *Journal of Pharmaceutical Sciences*, in press.
- 38) Kato, M., Suzuki, G., Ohtake, H., Seto, Y., Onoue, S. [New photosafety assessment strategy based on the photochemical and pharmacokinetic properties of both parent chemicals and metabolites] *Drug Metabolism and Disposition*, in press.
- 39) Onoue, S., Uchida, A., Nakamura, T., Kuriyama, K., Hatanaka, J., Tanaka, T., Miyoshi, H., Seto, Y., Yamada, S. [Self-nanoemulsifying Particles of Coenzyme Q<sub>10</sub> with Improved Nutraceutical Potential] *PharmaNutrition*, in press.
- 40) Nishida, H., Hirota, M., Seto, Y., Suzuki, G., Kato, M., Kitagaki, M., Sugiyama, M., Kouzuki, H., Onoue, S. [Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools] *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 72 : 578-585 (2015)
- 41) Seto, Y., Ohtake, H., Kato, M., Onoue, S. [Phototoxic risk assessments on benzophenone derivatives: photobiochemical assessments and dermal cassette-dosing pharmacokinetic study] *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 354: 195-202 (2015)
- 42) Sato, H., Fujimori, M., Suzuki, H., Kadota, K., Shirakawa, Y., Onoue, S., Tozuka, Y. [Absorption improvement of tranilast by forming highly soluble nano-size composite structures associated with  $\alpha$ -glucosyl rutin via spray drying] *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 92: 49-55 (2015)
- 43) Werba, J. P., Misaka, S., Giroli, M. G., Yamada, S., Cavalca, V., Kawabe, K., Squellerio, I., Laguzzi, F., Onoue, S., Veglia, F., Myasoedova, V., Takeuchi, K., Adachi, E., Inui, N., Tremoli, E., Watanabe, H. [Overview of green tea interaction with cardiovascular drugs] *Current Pharmaceutical Design*, 21: 1213-1219 (2015)
- 44) Sato, H., Ogawa, K., Kojo, Y., Suzuki, H., Mizumoto, T., Onoue, S. [Physicochemical stability study on cyclosporine A loaded dry-emulsion formulation with enhanced solubility] *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 63: 54-58 (2015)
- 45) Onoue, S., Suzuki, H., Seto, Y. [Formulation approaches to overcome biopharmaceutical limitations of inhaled peptides/proteins] *Current Pharmaceutical Design*, 21 : 3867-3874 (2015)
- 46) Matsuda T, Matsuda S, Yamada M, Mutation assay using single-molecule real-time

- (SMRT™) sequencing technology, *Genes & Environ.* 37:15 (2015)
- 47) Nakagawa Y., Toyozumi T, Sui H., Ohta R., Kumagai F., Usumi K., Saito Y., Yamakage K.: *In vivo* comet assay of acrylonitrile, 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate and ethanol in rats, *Mutation Res.*, 786-788: 104-113 (2015)
- 48) Sato M., Todoriki S., Takahashi T., Hafez E., Takasu C., Uehara H., Yamakage K., Kondo T., Matsumoto K., Furuta M., Izumi K.: Modifications of azoxymethane-induced carcinogenesis and 90-day oral toxicities of 2-tetradecylcyclobutanone as a radiolytic product of stearic acid in F344 rats, *J. Toxicol Pathol.*, 28, 99-107 (2015)
- 49) Okamoto H., Tsutsumi Y., Watanabe M., Yamakage K., Ashida M., Chen P., Doi H., Miura H., Matsumura M., Hanawa T.: Evaluation of Release and Accumulation of Metal Ions from Titanium and Nickel by Accelerated Dissolution Test in Simulated Body Environments, *Electrochemistry*, 83, 1-5 (2015)

F-2) 学会発表

省略

G. 知的所有権の取得状況

G-1) 特許取得

特になし

G-2) 実用新案登録

特になし

G-3) その他

以下の日本発のTG成立に寄与した。

- 1) Test No. 491: Short Time Exposure *In Vitro*

- Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage
- 2) Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists

## II. 分担研究報告



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
AOPおよびIATAに立脚した国際的な安全性評価手法の確立  
平成27年度分担研究報告書

免疫抑制、光毒性および生殖毒性に関する試験法ガイドラインおよびAOPの開発

研究分担者 小島 肇  
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部

研究要旨

本研究は、経済協力開発機構（OECD：Organisation for Economic Co-operation and Development）の進める安全性評価の国際的な潮流に乗り、日本が得意とする分野で主導的にAOP（Adverse Outcome Pathway）やIATA（Integrated Approaches to Testing and Assessment）を提案する。一方で、並行して化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある試験法について、バリデーションおよび第三者評価を実施または支援することにより、OECD試験法ガイドライン（TG：Test Guideline）を成立させることを目指すものである。

本研究では、免疫抑制、生殖発生毒性および光安全性の部分を担当し、これらの分野の中で当該年度は免疫抑制に関するAOPを作成した。一方、*in vitro*皮膚感作性試験 ヒト樹状細胞株を用いた検出法（h-CLAT：human Cell Line Activation Test）のTG成立に尽力するとともに、光安全性試験スクリーニング（ROS：Reactive Oxygen Species）アッセイの申請書をOECDに提出した。

キーワード：AOP、IATA、TG、OECD

吉村 功 東京理科大学 名誉教授  
大森 崇 神戸大学医学部 准教授

研究協力者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部  
部長  
尾上誠良 静岡県立大学 薬学部 薬物動態学分  
野 教授  
久田 茂 日本免疫毒性学会試験法委員会  
（あすか製薬株式会社）  
串間清司 日本免疫毒性学会試験法委員会  
AOP 検討小委員会  
（アステラス製薬株式会社）  
斎藤幸一 住友化学株式会社 生物環境科学研  
究所  
足利太可雄 資生堂株式会社品質保証センター  
坂口 斉 株式会社 花王安全性評価研究所  
所 室長  
宮澤正明 株式会社 花王安全性評価研究所

A. 研究目的

昨今の動物実験の3Rsに対する国際的な訴求に加え、医薬品の安全性評価における実験動物とヒトとの種差、動物の週齢差による毒性発現の相違等が明らかになってきたことから、動物実験からヒト材料を用いた試験、あるいは毒性作用機構に基づく安全性評価の手法開発が進んでいる。経済協力開発機構（OECD：Organisation for Economic Co-operation and Development）でも、毒性発現機構を明確にするためにAOP（Adverse Outcome Pathway）を作成し、それらの情報を網羅したIATA（Integrated Approaches to Testing and Assessment）により化学物質の行政的な安全性評価を推進する戦略を進めている。その理由の一つが、動物実験代替法として開発された*in silico*や*in vitro*試験のみでは、局所毒性でさえも有

害性の同定にしか利用できず、リスク評価は困難であることが明確になってきたからである。ましてや、実験結果が複雑多岐にわたる反復投与毒性、生殖発生毒性、感作性、発がん性などの評価にはAOPに立脚した手法を開発し、曝露情報を考慮したIATAを用い、リスク評価を行っていく必要が生じている。

本研究は、このようなOECDの戦略の中で安全性評価の国際的な潮流に乗り、日本が得意とする分野で主導権を取ってAOPやIATAの作成を押し進める。一方で、それと並行して化学物質の安全性評価のための行政試験法として見込みのある試験法について、バリデーションおよび第三者評価を実施または支援し、OECD試験法ガイドライン(TG: Test Guideline)を成立させることを目指すものである。本研究では、免疫抑制、生殖発生毒性および光安全性の部分を担当して活動した。

## B. 研究方法

### B-1) AOPの作成と提案

#### (1) 情報の共有化

OECD EAGMST (Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics)に参加して、情報収集した。

#### (2) AOP勉強会

EAGMSTにて得られた情報を班員等に共有化し、円滑なAOPの開発を促すために勉強会を開催した。

#### (3) 免疫抑制

日本免疫毒性学会の協力を得て、免疫抑制のAOP作成(事例研究)を進めた。

#### (4) 生殖毒性

住友化学株式会社の協力を得て、生殖毒性のAOP作成を進めた。

### B-2) IATAの作成と提案

#### (1) 免疫抑制:

OECDで進められている皮膚感作性の事例報告書ガイダンスの策定に協力した。

### B-3) TGの作成と提案

(1) ヒト樹状細胞株を用いた*in vitro*皮膚感作性検出法(h-CLAT: human Cell Line Activation Test)

国内外の専門家とともに、h-CLATのTG成立を目指した。

(2) 光安全性試験スクリーニング ROS (Reactive Oxygen Species) アッセイ

ICHのガイドラインを考慮の上、OECDにTG申請を行った。

(3) *in vitro*発がん性スクリーニング Bhas形質転換試験(Bhas法)

ガイダンスの承認に向け、OECD事務局とともに体裁を整えた。

## 倫理面への配慮

本研究は動物実験の3Rsに配慮して試験法の開発を主とするものであり、動物実験は実施しない。ボランティアおよびヒト組織は使用しない。これらことから、倫理的問題は無いと考える。

## C. 研究結果

### C-1) AOPの作成と提案

#### (1) 情報の共有化

平成27年6月にOECD本部(パリ)で開催されたOECD EAGMSTに参加し、初日にAOPのトレーニングを受けるとともに、2日以降、AOPに関する情報を収集した。主に以下の点が議論された。会議の議事概要を添付資料1に示す。

#### (1-1) AOPトレーニング

以下のAOP案を教材にAOPの作成法、review法について指導された。

- Alkylation of DNA in male pre-meiotic germ cells leading to heritable mutations
- Aromatase inhibition leading to reproductive dysfunction (in fish)

#### (1-2) AOPの外部評価

AOPの外部評価方法について意見交換がなされ、質問項目について決定した。

以下の8つのAOPに関して、外部評価を行うことが了承された。

- Alkylation of DNA in male pre-meiotic germ cells leading to heritable mutations
- Androgen receptor agonism leading to reproductive dysfunction
- Aromatase inhibition leading to reproductive dysfunction (in fish)

- Protein Alkylation leading to Liver Fibrosis
- PPAR $\gamma$  activation leading to decreased fertility in adult female rodents
- PPAR alpha activation leading to decreased fertility upon utero exposure in rodent males
- Binding of Antagonists to NMDAR During Brain Development (Synaptogenesis) Induces Impairment of learning and Memory Abilities
- Binding of Agonists to NMDAR in Adult Brain Causes Excitotoxicity that Mediates Neuronal Cell Death, Contributing to learning and memory impairment.

(1-3) AOPの内部評価

EGMASTにて内部評価を行う6つのAOPが認められた。すでに承認されている皮膚感作性のAOPも、蛋白への共有結合による皮膚感作性としてMIE (Molecular Initiation Element) やKE (Key Element) を中心に改訂されることになった。

(1-4) 新規AOPの承認

提案されたすべてのAOP案が承認された。日本から提案された“ホルマリンの発がん性”、“FK506による免疫抑制”のAOPも承認された。ただし、その名称は、化学物質名を含まず、“MIE leading to A0”とすることが会議で合意され、さらに事例研究という用語もタイトルに使用しないことになった。これにより、“ホルマリンの発がん性”は“鼻腔腫瘍を導く細胞毒性”に名称変更することになった。細胞毒性はMIEではないが、AOPの初動が第一のKEであればよいことになった。

この他にAOPの戦略的な考え方の議論も始まったが、まだコンセンサスは得られていない。

外部評価終了後、平成27年12月および平成28年1月にOECD EAGMST電話会議が実施された。議事概要を添付資料2および3に示す。外部評価を行った結果、reviewerがAOP概念に疎い例がみられ、評価の開始にあたりトレーニングが必要との提案があった。また、最低でも3名のreviewerが必要、質問項目の再考など、次回以降の外部評価実施にあたり、修正を加えながら行っていくことになった。

外部評価されたAOPのうち、以下のAOPはOECD WNT (Working Group of the National Coordinators of the

Test Guidelines Programme)やTFHA (Task Force of Hazard Assessment) に送られず、次回のEAGMSTで再検討されることになった。この理由は、本AOPのMIEが不明確であり、MIEとKE 1の関係性が弱いことによる。

- PPAR $\gamma$  activation leading to decreased fertility in adult female rodents
- PPAR alpha activation leading to decreased fertility upon utero exposure in rodent males

その他6つのAOPはEAGMSTに承認され、WNTやTFHAに送られた。

(2) AOP勉強会

AOPの作成法に関する情報を共有化するため、平成27年9月4日に国立衛研にて研究班内で勉強会を開催した。勉強会ではEAGMSTのトレーニングで用いられた資料を用いた。参加者リストを表1に示した。

表1. AOP勉強会参加者リスト

| No. | 氏名         | 所属            |
|-----|------------|---------------|
| 1   | 相場節也       | 東北大           |
| 2   | 木村 裕       |               |
| 3   | 世戸孝樹       | 静岡県立大         |
| 4   | 成田和人       | 横浜国大          |
| 5   | 相澤寛史       | 環境省 総合環境政策局   |
| 6   | 東野正明       | 厚生労働省 化学物質対策室 |
| 7   | 山影康次       | 食薬センター 秦野研究所  |
| 8   | 赤堀有美       | CERI          |
| 9   | 斎藤文代       |               |
| 10  | 大石 巧       | (株)ボゾリサーチセンター |
| 11  | 久田 茂       |               |
| 12  | 串間清司       |               |
| 13  | 伊藤志保       | 第一三共(株)       |
| 14  | 斎藤幸一       | 住友化学(株)       |
| 15  | 鈴木紀之       |               |
| 16  | ルコーズ フロリアン |               |

|    |       |         |
|----|-------|---------|
| 17 | 築瀬瓦一  | 日本化学工業会 |
| 18 | 西川秋佳  | 国立衛研    |
| 19 | 小川久美子 |         |
| 20 | 本間正充  |         |
| 21 | 山田雅巳  |         |
| 22 | 増村健一  |         |
| 23 | 小野 敦  |         |
| 24 | 小島 肇  |         |

### (3) 免疫抑制

日本免疫毒性学会 試験法評価委員会の協力を得て、「FK506 による免疫抑制（事例研究）」に関する AOP 作成案を OECD 事務局に提出した。その結果、事務局よりタイトルに化学物質名を入れないよう指示があったため、「FK506-FKBP12 による免疫抑制」として AOP 作成を継続することになった。最終的な名称は、Binding of FK506 to FKBP12, resulting in the formation of FK506-FKBP12 complexes and leading to immunosuppression とする意向である。作成された AOP 案を添付資料 4 に示す。

日本免疫毒性学会 試験法委員会 AOP 検討小委員会の AOP 作成者は以下のメンバーである。串間 清司、小松 弘幸、大石 巧、後藤 玄、杉本 潤一郎、伊藤 志保、高橋 義博、大坪 靖治

免疫抑制に関する AOP 研究の事例研究として、免疫抑制剤 FK506 の FKBP12 との複合体形成を起点として生じる免疫抑制の AOP であることが本提案の概要である。FK506 による免疫抑制作用は adverse effect ではなく pharmacological effect であるが、免疫抑制剤の免疫抑制作用機序を理解することで、免疫抑制と関連が大きい KE や TG につながる試験法の抽出ができると考えた。この AOP の英文校正も終え、来年度から OECD の定めるサイトに本 AOP を入力する予定である。この後、EAGMST のメンバーによる内部評価を経て、OECD 加盟国の専門家による外部評価を受けることになる。

### (4) 生殖毒性

生殖毒性のマーカーとして住友化学が着目している Hand 1 遺伝子を中心に AOP 作成を検討中である。本遺伝子は心臓の形成に重要な遺伝子であり、骨や手肢の形成にも関与していると言われて

いる。この遺伝子に関係した DNA 合成や分子経路の異常に着目して、AOP 案を考案している。

来年度には AOP 作成の提案を EAGMST に申請し、正式な計画に乗り次第、AOP 案を完成させる予定である。

### C-2) IATA の作成と提案

#### (1) 免疫抑制

OECD 事務局が作成している皮膚感作性の IATA に関係する事例に関するガイダンスの作成に協力した。このガイダンスの作成はほぼ 2 年に渡り続けている。

これまでに固まったガイダンス案を添付資料 5 として示す。これまでに OECD にて作成された皮膚刺激性試験の IATA とほぼ同様、項目毎に必要なデータを提供できる試験法が列挙されている。IATA の内容よりも以下表 2 に示す事例研究のレビュー議論が作成者間で先行しており、中々ガイダンスの成立目途が立たなかった。

表 2. ガイダンスに添付される事例研究

| Case study  | Purpose               |
|---|-----------------------|
| 1 Weight of evidence in vitro ITS for skin hazard identification (BASF)           | Hazard identification |
| 2 STS for hazard identification of skin sensitisers (RIVM)                        | Hazard identification |
| 3 IATA (Dupont)   | Hazard identification |
| 4 Decision strategy (L'Oréal)   | Hazard identification |
| 5 Integrated decision strategy for skin sensitisation hazard (ICCVAM)             | Hazard identification |
| 6 Consensus decision tree model for skin sensitisation hazard prediction (EC JRC) | Hazard identification |
| 7 Sensitiser potency prediction Key event 1+2 (Givaudan)                          | Potency prediction    |
| 8 The artificial neural   | Potency               |