

	network model for predicting LLNA EC3 (Shiseido)	prediction
9	ITS/DS for hazard and potency identification of skin sensitisers (P&G)	Potency prediction
10	Tiered system for predicting sensitising potential and potency of a substance (STS) (Kao Corporation)	Potency prediction
11	Score-based battery system for predicting sensitising potential and potency of a substance (ITS) (Kao Corporation)	Potency prediction
12	IATA for skin sensitisation risk assessment (Unilever)	Potency prediction

ただ、平成 28 年 4 月に開催された電話会議において、平成 28 年 6 月に OECD にて開催される TFHA にて本ガイダンスが承認される目途が報告された。

C-3) TGまたはガイダンスの作成と提案

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

h-CLAT の開発者である株式会社資生堂および花王株式会社の専門家と TG 案を作成し、EURL ECVAM (欧州代替法評価センター) との調整後、OECD 事務局に提出した。平成 27 年 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、WNT にてコメント募集が実施された。TG 案を添付資料 6、専門家会議の議事録を添付資料 7 および 8 に示す。

h-CLAT の TG 化の支障となっている問題点は、再現性と適用限界である。

再現性に関しては、EURL ECVAM 主導で実施されたバリデーション研究にて、事前に設定した施設内再現性基準 85% を再解析によっても満たせないとともに、オランダの受託機関で本試験を実施したところ、再現性を得ることが難しかったとの指摘を受けて懸念が示されている。TG 案では、再現性を高めるために播種細胞数と暴露時間の範囲

を狭め、より安定な結果が得る改訂を日本から提案しているところである。

適用限界について、1) プレ/プロハプテン、2) 難水溶性物質の陰性結果、3) 蛍光物質を定めるなどで合意した。

これらの TG 改訂案が平成 28 年 4 月の OECD WNT 会議で合意されることを期待している。

(2) 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 にすべく、SPSF (Standard Project Submission Form) を尾上分担研究者とともに作成し、OECD 事務局に提出した。OECD に提出した申請書を添付資料 9 に示す。その評価書を添付資料 10 として示す。

表3に示すように、申請書への評価は概ね好意的ではあったが、数カ国から主に以下2点で指摘があった。

1) 特許

Pfizerは既に権利を放棄しているため特に問題ないと回答した。

2) TG432 との関連性

TG432 In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test は光刺激性予測方法であり、ROS アッセイは光化学反応性評価法である。適用性と結果が大きく異なるので、相補的な利用によって信頼性の高い光安全性評価が可能となると回答した。

本試験法を TG の作業計画に加えるか否かは平成 28 年 4 月の WNT 会議で決定する。決定後、できる限り早急に TG 案を OECD に提出する意向を持っている。

表 3 ROS アッセイへの各国の評価

No	Title	Lead	AT	CAN	CH	CZ	DK	FRA	GER	ITA	JPN	KO	NI	SWE	UK	US	EC
1	Avantika method	FR	Y	FIR	Y	Y	Y	FIR	FIR	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Diploma TG	FR	Y	Y	Y	Y	FIR	Y	FIR	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3	EUROPEI	DE	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
4	Critical TG deviation	FR	Y	Y	Y	Y	FIR	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
5	Homing assay	FR	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
6	ROS assay	FR	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Yes は同意、FIR は指摘事項あり

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

本ガイダンスは2016年1月にOECDにて承認された。添付資料11として示す。本試験法はTGを目指

していたが、形質転換試験の行政的な受け入れのためには作用機構が明確になっていない、発がん物質との予測性が低いという点で化学品安全性データの相互受理 (MAD : Mutual Acceptance Data) に相当するTGとしては認められなかった。

D. 考察

AOPに関しては、OECDのEAGMSTにおいて作成ルールの再検討、トレーニングの実施、内部および外部評価を実施しながら、手探りで手順を模索している。これに準じていることもあり、本研究班の対応もまだ手探りの状況である。AOPについては、来年度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、班以外にも広げたい。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「FK506-FKBP12による免疫抑制」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を平成28年度にOECDに提案することを考えている。

IATAについては、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策定に協力する。光安全性については、まずは平成28年度、OECDにAOPを提案してその必要性を探っていく一方で、ROSアッセイのTG成立とともに、IATAの作成を申請していきたいと考えている。

E. 添付資料

- 1) Summary Record of the 8th Meeting of Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics, 17-18 June 2015
- 2) Extended Advisory Group on Molecular screening and Toxicogenomics: Summary Record of the Teleconference held on 7 December 2015
- 3) Extended Advisory Group on Molecular screening and Toxicogenomics: Summary Record of the Teleconference held on 19 January 2016
- 4) Binding of FK506 to FKBP12, resulting in the formation of FK506-FKBP12 complexes and leading to immunosuppression
- 5) Guidance Document on the reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be used within Integrated

Approaches to Testing and Assessment for Skin Sensitisation

- 6) Draft Test Guideline on in vitro skin sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)
- 7) Summary Record: Expert Group Meeting on Skin Sensitisation, 14-15 October 2015
- 8) Summary record, Teleconference of the expert group on the draft TG on h-CLAT, 22 February 2016
- 9) OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME Standard Project Submission Form, ROS Assay: An In chemico Method for Identifying the Phototoxic Potential of Chemicals
- 10) Project Proposals for 2016: Overview of Assessments of Standard Project Submission Forms, 19-22 April 2016
- 11) GUIDANCE DOCUMENT ON THE IN VITRO BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY Series on Testing & Assessment No. 231

F. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) Kojima H, Kasamatsu T: Regulatory science - JEMS symposium in 2014. Genes and Environment. 2015; 37:12
- 5) 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)
- 6) 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)

- 7) 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)
- 8) 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.
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T: Predictive
performance of the Vitrigel-eye irritancy
test method using 118 chemicals, J Appl
Toxicol. 2015; Oct 15.
- 14) 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)
- 15) Kojima H.: The use of 3-D models as
alternatives to animal testing. Altern Lab
Anim. 2015 Sep;43(4): P40-3.
- 16) 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)
- 17) 小島 肇: 機能性化粧品素材, シーエムシー出
版, 62-69 (2016)
- 18) 小島 肇: VICH セッション 5 所感, JVPA Digest
55, 19 (2016)
- 19) 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)
- F-2. 口頭発表
- 1) 山口宏之, 小島 肇, 竹澤俊明: Vitrigel-Eye
Irritancy Test (EIT) method: Assessment of
predictive performance using 118 test
chemilcas, 日本組織培養学会 第 88 回大会
(2015.5) (広島)
- 2) Kojima H, Kleinstreuer N, Schaeffer MW, Kim
TS, Chen W, Sozu T, Watanabe M, Niitsma T,
Yamashita K, Miyazaki H, Fukuda T, Yamaguchi
N, Fujiwara S, Yamaguchi H, Takezawa T:
Validation study of Vitrigel-EIT (Eye
Irritancy Test) method, II International
Conference of Alternatives to Animal
Experimentation (2015.5) (Lisbon, Portugal)

- 3) 小島 肇: 動物実験代替法についての各国の動向および最新研究, 2015 年日中化粧品国際交流協会年度交流イベント (2015. 6) (東京)
- 4) 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 第 20 回学術集会 (2015. 6) (東京)
- 5) 細井一弘、小島 肇: シンポジウム 6 トランスレーションに有用な試験系構築の基本的考え方: ROS アッセイを例にして, 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6) (金沢)
- 6) Kojima H, Kleinstreuer N, Schaeffer MW, Kim TS, Chen W, Sozu T, Watanabe M, Niitsma T, Yamashita K, Miyazaki H, Fukuda T, Yamaguchi N, Fujiwara S, Yamaguchi H, Takezawa T: 眼刺激性試験代替法 Vitrigel-EIT のバリデーション研究, 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6) (金沢)
- 7) 山口宏之, 小島 肇, 竹澤俊明: 高感度な in vitro 眼刺激性試験法 Vitrigel-EIT の予測性評価, 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6) (金沢)
- 8) 伊藤浩太, 榊原隆史, 越田 美, 奥村宗平, 中山拓生, 平賀 武夫, 小島 肇, 松浦正男: 牛角膜を用いた混濁度および透過性試験法 (BCOP 法) による GHS 分類 2B 物質の測定結果, 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015. 6) (金沢)
- 9) 小島 肇, 西川秋佳: JaCVAM update (日本動物実験代替法評価センター) 進捗, International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) Coordination meeting (2015. 6) (韓国・済州島)
- 10) 小島 肇: JaCVAM activities update (日本動物実験代替法評価センター) 活動報告, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (2015. 6) (韓国・済州島)
- 11) 小島 肇: 動物実験代替法の国内外の最新動向, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム 第 10 回教育セミナー (2015. 7) (東京)
- 12) 小島 肇: 国立衛研の立場, 第 3 期 日本化学工業協会 LRI 研究報告会 (2015. 8) (東京)
- 13) Kojima H: New SPSF for OECD Test guideline on the in vitro skin sensitization assay, 12th Annual meeting of Korean Society for Alternative to Animal Experiments (2015. 8) (韓国・ソウル)
- 14) Kojima H: The JaCVAM/OECD activities on the comet assay, 11th International Workshop of Comet assay Workshop (2015. 9) (Antwerp, Belgium)
- 15) Kojima H: Development and validation of alternative to animal testing, ITRI seminar (2015. 9) (Shinchiku, Taiwan)
- 16) Kojima H: The Asian Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences 2016, 16th Annual Congress of European Society of Alternatives to Animal Testing (2015. 9) (Linz, Austria)
- 17) Kojima H, Oshimura M, and Imatanaka N: Update for Japanese Project “ARCH-Tox” for the Future Chemicals Management Policy: Research and Development of in vitro and in vivo Assays for Internationally Leading Hazard Assessment and Test Methods, 4th annual meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (2015. 10) (EPA, NC, U. S. A.)
- 18) 小島 肇: シンポジウム 7 : 経済産業省プロジェクト「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導の有害性試験法の開発: ARCH-Tox」の計画概要, 日本動物実験代替法学会 第 28 回大会 (2015. 12) (横浜)
- 19) 中山 拓人, 寒水 孝司, 山口 宏之, 竹澤 俊明, 小島 肇: Vitrigel-EIT (Eye Irritancy Test) 法による眼刺激性の判定法の提案, 日本動物実験代替法学会 第 28 回大会 (2015. 12) (横浜)
- 20) 古川 正敏, 榊原 隆史, 伊藤 浩太, 佐々木 啓, 越田 美, 奥村 宗平, 河村 公太郎, 松浦 正男, 小島 肇: 牛摘出角膜を用いた混濁度及び透過性試験法 (BCOP 法: 眼刺激性代替法試験) における角膜の病理所見による弱刺激性物質の評価について, 日本動物実験代替法学会 第 28 回大会 (2015. 12) (横浜)
- 21) 加藤 義直, 山本 直樹, 佐藤 淳, 中田 悟, 小島 肇: 不死化ヒト角膜細胞株 (iHCE-NY) を用いた三次元角膜再構築モデルにおける眼刺激性評価方法の検討 ~後培養による回復性の評価~, 日本動物実験代替法学会 第 28 回大会

- (2015.12) (横浜)
- 22) 内野 正, 宮崎 洋, 山下 邦彦, 小島 肇, 竹澤 俊明, 秋山 卓美, 五十嵐 良明: ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法 (Vitirigel-SST法) の室内再現性, 日本動物実験代替法学会 第28回大会 (2015.12) (横浜)
- 23) 宮崎 洋, 山下 邦彦, 内野 正, 竹澤 俊明, 小島 肇: ビトリゲルチャンバーを用いた皮膚感作性試験代替法 (Vitirigel-SST法) による感作性物質の評価 (第2報), 日本動物実験代替法学会 第28回大会 (2015.12) (横浜)
- 24) 成田 和人, Vo Thihong Phuc, 中川 史子, 小島 肇, 板垣 宏: 皮膚感作性試験の偽陰性評価解消に向けた検討: 無水フタル酸に対する LP 溶媒暴露法, 日本動物実験代替法学会 第28回大会 (2015.12) (横浜)
- 25) 九十九 英恵, 松成 夏美, 小島 肇, 板垣 宏: タンパク質のアレルギー性を評価する in vitro 試験法の開発, 日本動物実験代替法学会 第28回大会 (2015.12) (横浜)
- 26) 小島 肇: OECDで検討されてきた in vitro スクリーニング法, 環境ホルモン学会 第18回研究発表会 (2015.12) (栃木)
- 27) Furukawa M, Sakakibara T, Ito K, Sasaki S, Koshita M, Okumura S, Kawamura K, Matsuura M, Kojima H: Histopathological Findings on the Cornea in the Bovine Corneal Opacity and Permeability Test (BCOP Test) for Alternative to Eye Irritation Test, 55th annual meeting of the Society of Toxicology (2016.3) (New Orleans, U. S. A.)
- 28) Narita K, Vo P. T, Nakagawa F, Kojima H, Itagakai H: Reducing False Negatives of Chemicals in the in vitro Skin Sensitization Test, 55th annual meeting of the Society of Toxicology (2016.3) (New Orleans, U. S. A.)
- 29) Tsukumo H, Matsunari N, Sugiyama M, Toyoda A, Kojima H, Itagakai H: Development of an in vitro test for Allergenic Potency of Proteins, 55th annual meeting of the Society of Toxicology (2016.3) (New Orleans, U. S. A.)

特になし

G-2) 実用新案登録
特になし

G-3) その他
OECDガイダンス
THE IN VITRO BHAS 42 CELL TRANSFORMATION ASSAY, Series on Testing & Assessment No. 231 (2016)

G. 知的所有権の取得状況

G-1) 特許取得

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

発がん性試験および生殖毒性試験の AOP に関する研究

研究分担者 小川久美子
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 病理部長
研究協力者 長野嘉介
日本バイオアッセイ研究センター元副所長

研究要旨

実験動物を用いたがん原性試験及び生殖試験から得られる情報は重要ではあるが、動物実験の 3Rs の国際的な訴求に加え、増加する化学物質の安全性確保の観点からも、動物実験以外に実施可能な評価方法の開発が希求されている。本研究では、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て AOP の提案を進め、OECD 事務局に提出したところ、「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。

A. 研究目的

ヒトの発がん機序については、大きく遺伝毒性を介した機序と、それを介さない非遺伝毒性機序に大別して議論されるが、現在においても、一部の遺伝性の場合等を除いて、機序が明確なものは限られている。化学物質が DNA 付加体形成を示す場合やウイルス感染による場合、あるいはキメラ遺伝子が形成される場合など機序の一部が解明されている場合も、発がんの臓器特異性など、その詳細については不明の点が多い。また、生殖毒性については毒性の種類や機序はさらに多岐にわたると考えられる。主にげっ歯類を用いて、被験物質を 2 年間投与するがん原性試験、及び一代あるいは二世にわたって反復投与し生殖への影響を検討する生殖試験から得られる情報は重要ではあるが、動物実験の 3Rs の国際的な訴求に加え、増加する化学物質の安全性確保の観点からも、動物実験以外に実施可能な評価方法の開発が希求されている。

本研究では、多岐にわたる発がん性および生殖毒性の機序のうち、作用機構のカスケードについて説明可能な事例を選択し、Adverse outcome pathway (AOP) を作成し Integrated approach to testing and assessment (IATA) の構築に繋げることを目的としている。

B. 研究方法

本年度は、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 の提案を進める。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る。

（倫理面への配慮）

基本的には、文献等から情報収集を実施したが、動物実験が必要な場合は、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行うこととした。

C. 研究結果

「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。

D. 考察

ホルムアルデヒドの吸入による鼻腔発がんについては、げっ歯類において報告されており、さらにヒトにおいても報告例があるため、共通の機序を介していると考えられる。DNA と直接結合することによる遺伝毒性発がん物質としての経路とともに、局所的な細胞傷害性を示すことから、遷延する炎症、細胞増殖の亢進が惹起される経路が想定される。

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はない。

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。

E. 結論

ホルムアルデヒドの事例研究データを用い、「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。より一般化される AOP をめざすことが求められる。

F. 健康危惧情報

該当なし。

G. 研究発表 (今年度のものをご記入下さい。)

1. 論文発表

1) 書籍

該当なし

2) 雑誌

- 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.
- 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.

- 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.
- Toyoda T, Cho YM, Akagi JI, Mizuta Y, Hirata T, Nishikawa A, Ogawa K. Early detection of genotoxic urinary bladder carcinogens by immunohistochemistry for γ -H2AX. *Toxicol Sci.*, 148: 400-408, 2015.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
2. 学会発表 (発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)
1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。

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

内分泌かく乱化学物質の試験法ガイドライン開発

研究分担者 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部

研究要旨

本研究では、化学物質の内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、OECD-EDTA で提案された化学物質の内分泌かく乱性評価のコンセプトualフレームワークのレベル 2 に示された in vitro スクリーニング試験法として行政的有用性が期待される試験法について、OECD VMG-NA (非動物試験法バリデーショングループ) に参加する各国専門家との共同により試験法の評価と OECD ガイドライン化、及び国内外における関連プロジェクトにおける研究を進めている。本年度は、我が国で開発された AR 転写活性化試験法 (AR STTA 法) についてのバリデーションレポート、ガイドライン案を OECD に提出し、OECD VMG-NA ピアレビュー及び WNT におけるコメント募集で各国より指摘されたコメントへの対応を行い、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するとともに、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構築を行った。一方、既に TG455 として OECD PBTG が成立している 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 α CALUX assay のバリデーション試験についてピアレビューを担当し、VMG-NA で議論の結果、TG455 への掲載の合意を得た。ER STTA 法については、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。

A. 研究目的

本研究では、OECD-EDTA で提案された化学物質の内分泌かく乱性評価のコンセプトualフレームワークのレベル 2 に示された in vitro スクリーニング試験法であり、化学物質の内分泌かく乱性による AOP (Adverse Outcome Pathway) の MIE (Molecular Initiating Event) である受容体作用 (アゴニスト・アンタゴニスト) の評価系である、ER (エストロゲン受容体) 及び AR (アンドロゲン受容体) 転写活性化試験法

(STTA) について、OECD VMG-NA (非動物試験法バリデーショングループ) と連携して、各国専門家との共同により試験法の検証と OECD ガイドライン化に向けた研究を行うとともに、これらガイドラインの行政利用を推進するため国内外機関との連携による関連プロジェクトを実施し、国際共同のもとでの内分泌かく乱性評価のための枠組みの構築を進めている。

本年度は、我が国で提案した AR EcoScreen 細胞を用い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、同等試験として提案された ER α CALUX assay の検証試験結果のピアレビューを担当するとともに、TG455 への収載による改定作業を行った。また、関連プロジェクトとして、JaCVAM 資料編纂委員会における「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」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。

B. 研究方法

1) ER STTA 法関連

1-1 ER α CALUX assay バリデーションの TG455 収載に関する検討

ER 転写活性化試験法については、これまでの研究成果により TG455 としてパフォーマンス基準ガイドライン (PBTG) が成立しており、我が国から提案した ER STTA 法と米国で開発された BG1-Luc 法がパフォーマンス基準を満たす試験法として収載されている。本年度は、新たに基準を満たす試験法として、ヨーロッパでバリデーション試験が実施された ER α CALUX assay の TG455 への収載が提案され、本研究においては、ER α CALUX assay バリデーション試験結果の VMG-NA ピアレビューを担当し、他のレビューワーのレビュー結果をあわせて VMG-NA 会議において TG455 収載について議論した。

1-2 JaCVAM 内分泌かく乱試験法資料編纂委員会「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」の作成

昨年度までの研究による OECD TG455 へのアン

タゴニスト試験法追加のアップデートが成立したことを受けて、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」の作成を行った。資料編纂委員会委員として、小野及び、小野 宏 (委員長 : (財) 食品薬品安全センター秦野研究所)、丸野内棣 (藤田保健衛生大学)、井口泰泉 (基礎生物学研究所) の 4 名により ER STTA 法バリデーション試験報告書や TG455 及び TG455 とあわせて示されたアゴニスト試験法、アンタゴニスト試験法のパフォーマンススタンダードなどを資料として、本法の信頼性や有用性について評価を実施し、報告書として取り纏めた。

2) AR STTA 法関連

2-1 AR STTA 法 OECD ガイドライン化の研究

AR EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法 (AR STTA 法) についてバリデーションレポート、ガイドライン案を作成し、ピアレビューのため OECD に提出した。OECD VMG-NA で実施されたピアレビューコメントをもとに draft 案を完成し、第 1 回コメント募集のため WNT に提出した。WNT における第 1 回コメント募集で各国より出されたコメントへの対応について第 13 回 VMG-NA 会議で議論を行い、会議での合意内容をもとにバリデーションレポート、ガイドライン draft 案の修正を行い第 2 回コメント募集のため WNT に提出した。

2-2 22Rv1-MMTV ARTA アッセイバリデーション試験の実施

AR 転写活性化試験法である 22Rv1-MMTV ARTA アッセイのバリデーション試験管理グループに参画し、試験計画や試験結果について議論を行った。本系は、VMG-NA において韓国から提案された系であり、プレバリデーション結果から有用性が認められたことから、VMG-NA としてバリデーション試験の実施に協力することとなっ

た。

2-3 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構築

ICCVAMの提案により組織されたアンドロゲン受容体作用物質評価系構築の際のリファレンスとなる化合物リスト作成のための検討会メンバーとして参加した。EPA及びNICEATMで情報収集されたハーシュバーガー試験及び受容体結合試験、受容体活性化試験の公表文献をもとに、化学物質について報告されているAR作用の有無や強さについて解析を行い、*in vivo*、*in vitro*評価系やガイドライン構築のリファレンスとなる化合物リストの構築を進めた。

倫理面への配慮

本研究は動物実験に替わる新しい*in vitro*安全性試験法の開発を主とするものである。本研究では動物を用いる試験、ヒト臨床試験やヒト由来試料を利用した試験は行っていない。

C. 研究結果

1) ER STTA 法関連

1-1 ER α CALUX assay バリデーションのTG455 収載に関する検討

ER α CALUX assay は、BioDetection Systems BV (BDS、オランダ) で開発された、U2OS (ヒト骨肉腫) 細胞にヒトER α を恒常的に発現し、化学物質のエストロゲン様作用によりルシフェラーゼをレポーターとして発現する転写活性化試験法である。本系についてはBDSとECVAMの共同によるプレバリデーション試験において良好な再現性が示されている。今回、TG455への組み込みのためアゴニスト・アンタゴニストパフォーマンススタンダード(PS)に示された検証用化合物を用いたバリデーション試験がBDSのコーディネートによりRIVMのアドバイスの下、BDS、国立環境研究所(日本)、IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für

Wasserforschung (ドイツ) の3施設の参加により実施された(図1)。バリデーション試験結果についてVMG-NAメンバーで実施されたピアレビュー結果をもとにVMG-NA会議で評価を行った。陽性物質の定量評価値の再現性は、施設間及び施設内とも%CV<5%と良好な結果が得られた。定性評価結果(陽性/陰性)については、アゴニスト試験では1物質について(linuron)について、2施設で陽性、1施設で陰性と一致しない結果となった以外は、全ての物質で3施設の結果はPSで示す他の試験系結果と一致し、再現性について問題ないと評価された。一方、ER α CALUX assay バリデーション試験では、各施設において用量設定のためのprescreen測定1回、本測定2回が実施されていたが、新規試験法のバリデーションのための基準であるPSでは施設内再現性の検証のため各物質について3測定の実施が求められており、基準を満たしていないのではないかという指摘が出された。これに対して、バリデーション試験責任者からは、TG455では2測定の結果が一致する場合は、測定を終了すると記載されているとの意見が出されたが、これは認識ミスであり、あくまでも新規試験法のバリデーションはPSに従って実施されなければならないことがメンバー内で確認された。一方、ER α CALUX assay については、2回の本測定の施設内再現性はいずれの施設も良好であること、TG455は定性的評価を主目的としていること、定性的評価のためにはprescreen測定結果も使えると判断出来、prescreen測定結果を含めた定性評価の施設内再現性も良好であると判断できることから、TG455の新たな系として収載することに、全メンバーの合意が得られ、その他の細かいコメントへの対応を実施した上で、TG455改定案を作成し、バリデーションレポートとともに加盟国のコメント募集のためWNT送付することが決定された。

1-2 JaCVAM 内分泌かく乱試験法資料編集委

員会「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」の作成

TG455 がアゴニスト・アンタゴニスト両試験法を含むPBTGにアップデートされたことを受けて、JaCVAM からの依頼により、収載試験の一つである ER STTA 法について OECD に提案されたバリデーションレポート等もとに、妥当性等について評価を行い、評価報告書を取りまとめ JaCVAM に提案した。バリデーション試験の結果から、本系の検出感度や感受性、特異性は良好であり、施設内・施設間再現性についても問題なく、有用な試験法であると評価された。一方、問題点としてアンタゴニスト試験のバリデーション試験において、一部の施設においてプロトコールで示されている最大継代数（40 代）以下であっても細胞継代に伴うと思われる反応性の低下や用量反応性の変化が認められており注意が必要であることが指摘された。また、ルシフェラーゼ活性を利用したレポーターに共通の注意点として、ルシフェラーゼ活性に影響を与える化学物質では、ER 非特異的な亢進や阻害等により疑陽性（もしくは偽陰性）反応を惹起する可能性があるため注意が必要であることが指摘された。結論として、本系は行政規制の試験法として有用であると判断された。なお、評価報告書については、後日、JaCVAM ホームページにおいて公開される予定である。

2) AR STTA 法関連

2-1 AR STTA 法 OECD ガイドライン化の研究

AR STTA 法は、我が国で開発された AR EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体 (AR) の転写活性化試験法である。本研究に先立つ研究で実施したバリデーション試験成績について、平成 26 年度の VMG-NA 会議での報告を行い、行政試験法として有用であるとの評価を受け、ガイドライン化の合意を得た。また、AR の転写活性化試験法としては、ECVAM において AR CALUX assay のバリデーションが進められて

おり、両系を含む PBTG の構築が検討されたが、AR CALUX assay のバリデーションが終了していないことから、AR EcoScreen 系のみのガイドライン化の合意を得た。本研究では、バリデーションレポート、ガイドライン案の作成、OECD VMG-NA ピアレビューへの対応、WNT における加盟各国からのコメント対応を実施し、本年度の VMG-NA では、WNT 第 1 回コメント対応案について議論を行った。多くのコメントは、ガイドライン化において特に問題となるものではなく、対応案についても VMG-NA で特に議論はなく合意が得られたが、TG 案に示された陽性・陰性判定クライテリアでは、疑陽性が検出される可能性があるとのコメントが出され、判定クライテリアの変更の是非について議論された。特にアンタゴニスト陽性の判定において IC30 を用いるのに対して、細胞毒性の許容範囲が TG 案に示されたプロトコール (図 2) では 20%であるのに対して、10%とすべきとの意見が示されたため、バリデーション試験結果の再解析を行い、細胞毒性の許容範囲を 10%とした場合、明らかな陽性物質が偽陰性となることが明らかとなった (図 3)。さらに、バリデーション試験では提案する判定クライテリアで疑陽性は示されていないこと、本試験法はスクリーニングのための系であり偽陰性を出来るだけ排除すべきであること、本系の安定性・再現性が極めて良好なこと、などから当初の判定クライテリア案で合意を得て、最終案を作成し、第 2 回コメント募集のため WNT に提出した。本ガイドラインについては、平成 29 年度中に成立の見込みである。

2-2 22Rv1-MMTV ARTA アッセイバリデーション試験の実施

22Rv1/MMTV_siGR アッセイは、韓国 NIFDS で開発された、AR を本来発現する 22Rv1 細胞にレポーターとしてルシフェラーゼを繋いだ ARE プラスミドを恒常発現する細胞を用いた AR 転写活性化試験法である。本細胞は、GR による ARE 反

応を低減するため CRISPR-Cas9 による GR 遺伝子のノックアウトを行っていることを特徴としている。本系のバリデーションは、韓国 NIFDS のコーディネーションにより、NIFDS がリードラボとなり、Korea Testing & Research Institute、University of Maryland の 3 施設の参加により実施しており（図 4）、試験管理チームとして、小野を含む VMG-NA より 5 名が協力することとなった（図 4）。これまでにアゴニスト試験が終了しており、定性判定において、施設内・施設間再現性は非常に良いものの、AR EcoScreen 法（AR STTA 法）もしくは AR CALUX アッセイで陰性と判定されている 3 化合物について陽性の結果であった（図 5）。その後、リードラボにおいて新たなロットの試薬を用いて再試験した結果、1 物質については、陰性判定となり、バリデーション測定で使用した試薬の保管状態のためと推察された。しかし、他の 2 物質については、再び陽性の結果となったことから、その原因の解析のため 22Rv1/MMTV 細胞のキャラクタリゼーションを VMG-NA 参加メンバーの協力で実施することとなった。アンタゴニスト試験バリデーション測定については、細胞のキャラクタリゼーション結果を待って実施することとなった。

2-3 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構築

AR 試験法開発のためのリファレンス化合物リスト作成のため、*in vitro* 試験系（受容体結合試験及び転写活性化試験）について米国 NICEATM、*in vivo* 試験系（ハーシュバーガー試験）について米国 EPA で文献調査が実施され受容体結合試験については、159 報告から 103 物質、転写活性化試験については、284 報告から 133 物質、ハーシュバーガー試験については、471 試験の結果から 157 物質について信頼できる報告が得られた。本研究では、文献調査結果をもとに整理された化学物質リストに基づいて結果の信頼性や作用

分類の妥当性についての議論に参画し、リファレンス物質リストの最終化に向けて議論を進めている。最終化されたリストは、ICCVAM より公開される予定である。

D. 考察

本研究では、OECD-EDTA で提案された化学物質の内分泌かく乱性評価のコンセプチュアルフレームワークのレベル 2 に示された *in vitro* スクリーニング試験法のうち、我が国で開発された、エストロゲン受容体（ER）、アンドロゲン受容体（AR）の転写活性化試験法（STTA 法）OECD ガイドラインに向けた研究を進めてきた。

本年度は、OECD TG455 として既に PBTG が成立した ER 転写活性化試験法については、ヨーロッパで新たにバリデーションされた ER α CALUX assay のピアレビューと TG455 への掲載によるガイドライン改定の検討を、また AR 転写活性化試験法については、ガイドライン化に向けたコメント対応作業を進めるとともに、国内外における関連プロジェクトでの研究を進めた。

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ガイドライン試験法であり、同等の試験系を構築することは難しくはない。評価系として同等であることが検証された試験系を排除する理由はなく、一方で個別のガイドラインとするのは妥当ではない。現在、TG455 に 2 種の試験系が掲載されているが、地域により細胞の入手のやすさなどが異なる可能性もあることから同等性が検証された試験系であれば選択肢は多いほうが良いとも考えられる、その点で PBTG 化は有効であると考察された。我が国は、両試験法ガイドライン開発のリード国として、両試験法ガイドラインについて、新たに同等試験法が提案された際には信頼性評価を行うとともに PBTG のアップデートに引き続き対応していく責任がある。とりあえずは、今年度の成果により、平成 29 年度中に成立予定の AR STTA ガイドラインについて、韓

国でバリデーションが進められている 22Rv1/MMTV_siGR アッセイもしくは ECVAM でバリデーションが進められている AR CALUX アッセイの結果が得られた後に計画されている PBTG 化においても引き続き協力して行く必要がある。

これらの試験系は、化学物質の内分泌かく乱性による AOP (Adverse Outcome Pathway) の MIE (Molecular Initiating Event) の評価系である。現在、OECD 加盟国では、化学物質のリスク評価ツールとして様々な毒性について AOP の構築と AOP における MIE や KE を検出する *in vitro* 評価系の開発が進められている。実際、皮膚感作性に関しては、OECD で提案された AOP の KE (Key event) を検出する複数の試験系がガイドライン化されており、部分的にはあるが従来の試験法に代わり行政判断に利用されようとしている。前述のとおり、分子生物学的手法を応用した *in vitro* 評価系については、評価対象とする分子イベントにもよるが、同等の試験系を構築することは難しくはない。そのため、本研究で対象とした 2 種の試験法同様、複数の同等試験法が提案される可能性もあり、本研究における PBTG 構築の経験は、将来の AOP に基づく *in vitro* 評価系のガイドライン化において有用な知見を与えるものと考察された。

一方、本研究でガイドライン化を進めてきた ER 及び AR の転写活性化試験系は、いずれも試験系としては単純なものではあるが、そのバリデーションには、多くの時間やコストが必要であった。さらに妥当性や信頼性の評価やガイドライン作成には、多くの専門家の協力が必要であった。本研究で対象とした、両試験法については幸い、OECD において化学物質による内分泌かく乱性評価のための試験法として整備が必要とされた試験法であることから、そのガイドライン化にあたっては、有用な試験法の検討のため OECD に特別に組織された VMG-NA (非動物試験法バリデーショングループ) に参加する各国専門家の多くの協力を得ることが出来た。将来、

リスク評価や行政判断において、有望な試験法が開発されたとしても、国際ガイドラインとして認められなければ、国際的には受け入れられないため、結果として化学物質等の管理や規制に利用するのは難しい。今後、化学物質行政に有用な試験法の確立・整備を推進するためには、試験法開発だけでなく、ガイドライン化に必要な全てのプロセスを十分にカバー出来るサポート体制の整備が重要である。

E. 結論

これまでの研究により、ER 転写活性化試験法については、OECD TG455 として既にガイドラインを成立させることが出来た。本年度の研究により、AR 転写活性化試験法についても、平成 29 年度中に OECD ガイドライン成立の見込みとなった。我が国は、両試験法ガイドライン開発のリード国として試験法のアップデートに引き続き対応する責任があり、TG455 については、新たな同等試験法提案に対する信頼性評価と TG のアップデートへの対応を、平成 29 年度中に成立予定の AR STTA ガイドラインについては、現在、バリデーションが進められている 22Rv1/MMTV_siGR アッセイもしくは AR CALUX アッセイの結果が得られた後に計画されている PBTG 化においても引き続き協力して行く必要がある。また、化学物質のエストロゲンやアンドロゲン受容体への作用は、内分泌かく乱による健康影響 AOP の MIE に相当するものであり、それ自体は A0 (Adverse Outcome) ではないとの観点から、本試験法における陽性反応を実際の化学物質管理にどのように活用すべきかについて国際協調での議論が必要である。また、本研究におけるこれまでの経験から、新たな試験法のガイドライン化にあたっては、試験法そのもののリスク評価における有用性や信頼性が要求されることはもとより、バリデーションからガイドライン化にいたるプロセスには非常に多くの専門家の協力及び時間やコストが必要であり、今後、行政的に必要な

試験法の整備のためには、それを十分にサポート出来る体制の整備が重要である。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

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(4), 177-190, 2015.

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 β -bromostyrene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2015.2, 191-200

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* 2015.30, 1244-1263

F-2. 学会発表

Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Yamada, T.,

Kawamura, T., Ono, A., Hirose, A., and Ema, M., Derivation of the health advisory guidance values for sub-acute exposure of drinking water, Society of Toxicology 55th Annual meeting, New Orleans, USA, March 2016.

Hirose, A., Hirata-Koizumi, M., Kawamura, T., Matsumoto, M., Takahashi, M., Nishimaki-Mogami, T., Nishimura, T., Ema, M., and Ono, A., Derivation of subacute reference doses for drinking water quality management, The 51st EUROTOX2015, Porto, Portugal, September 2015.

Ono, A., Matsumoto, M., Takahashi, M., Kawamura, T., Hirata-Koizumi, M., and Hirose, A., Is a 14-day dose setting study able to predict its 28-day repeated dose toxicity?, The 51st EUROTOX2015, Porto, Portugal, September 2015.

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

特になし

TG 455 revised for the inclusion of a new test method:
ERα CALUX assay as Annex 4

Interlaboratory validation

- **Phase 1 – prescreen**
 - participants received pure compound
 - range-finding
 - determination of proper dose-range
- **Phase 2 – comprehensive study 1 & 2**
 - participants received stock solution compounds in DMSO
 - preparation of proper serial dilution series
 - for compr. 1 & 2 separate serial dilutions series prepared

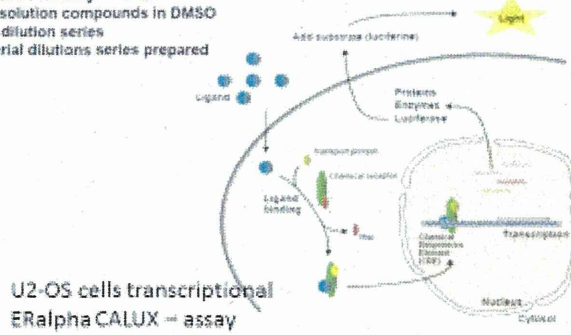


図1 ER CALUX アッセイの模式図とバリデーション試験デザイン

Data analysis of antagonist assay

- Data at concentration for which cell viability was less than 80% (e.g., cell cytotoxicity > 20%) are not used for analysis
- Chemicals which indicate more than 30% inhibition are classified as positive

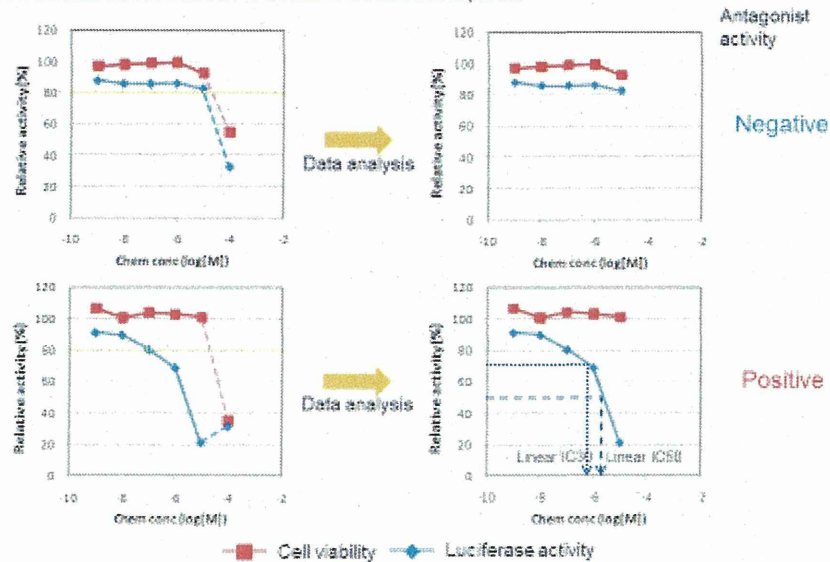


図2 細胞毒性とアンタゴニストアッセイデータの解析：プロトコールでは細胞毒性が 20%を超える濃度のデータは解析から除外する

**Reanalysis of
Effect of Cytotoxicity criteria on data
acceptability in ARTA validation study**

Following table shows the individual data for positive chemicals obtained in 1st and 2nd validation studies. **Yellow high-lighted cell** shows the data could not be accepted by 20% cytotoxicity criteria, and **Red high lighted cell** shows the data could not be accepted by 10% cytotoxicity criteria. Consequent, 10% cytotoxicity criteria consider to yield many failed data by the cytotoxicity issue.



Response:
This assay is designed for screening method; thus criteria is set to reduce false negative.

Test substance	Laboratory	Test	10% C	20% C
Squalene	CERI	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Monsanto	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
Flutamide	CERI	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Monsanto	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
Fenitrothion	CERI	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Monsanto	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
Fenitrothion	CERI	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Monsanto	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
Fenitrothion	CERI	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Monsanto	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
Fenitrothion	CERI	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00
	Monsanto	1	0.00	0.00
		2	0.00	0.00
		3	0.00	0.00

図3 AR STTA バリデーション結果（アンタゴニスト試験）の再解析結果：細胞毒性の許容範囲を10%までとすると明らかな陽性物質が偽陰性判定（赤枠のセル）となることが明らかとなった

Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)androgenic potential using 22Rv1/MMTV_GR-KO cells

Organization for additional Validation Study

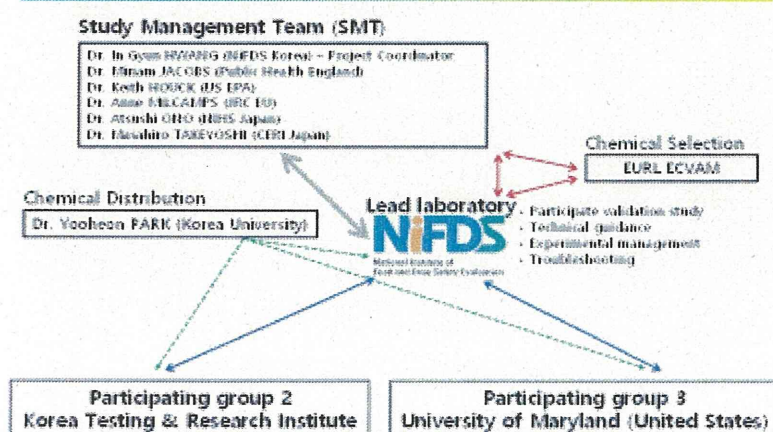


図4 22Rv1/MMTV_siGR アッセイのバリデーション組織図

22Rv1/MMTV_GR-KO Validation study - agonist

ID	Name	AR Ecoscreen	AR CALUX	ACTA 22Rv1/MMTV_GR-KO											
				MPDS			KTR			EMCP					
				Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 3			
1	Tamoxifen														
2	Methylprednisolone acetate		Inconclusive												
3	17 β -Estradiol														
4	Hydrocortisone														
5	Flutamide														
6	Vincristin														
7	Prochloraz														
8	Abiraterone														
9	Progesterone														
10	17 α -Ethinyl estradiol		Inconclusive												
11	Bupropion hydrochloride														
12	5 α -Dihydrotestosterone														
13	Mestranolone														
14	Drospirenone hydrochloride														
15	Bisphenol A														
16	Methyltestosterone														
17	Progesterone														
18	Corticosterone		Inconclusive												
19	17 β -E2														
20	Bicalutamide	Not tested	Not tested												
21	Leuprorelin	Not tested													
22	Levonorgestrel	Not tested													

図5 22Rv1/MMTV_siGR アッセイバリデーションにおけるアゴニスト試験の3施設における3測定定性判定結果

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

光毒性試験の AOP および IATA の開発
研究分担者 尾上 誠良 静岡県立大学 薬学部 教授

研究要旨

外因性光線過敏症は近年注目を集める有害事情の一つであり、本毒性リスク回避のために効果的な予測方法の開発が国内外で急務の課題となっている。本研究では *in vitro* 光化学的試験方法である ROS アッセイを主軸とした AOP を作成するため、光毒性物質の光生物化学的ならびに光化学的特性を精査することで光毒性反応機序のさらなる解明を行った。

研究協力者

世戸 孝樹（静岡県立大学 薬学部 助教）

A. 研究目的

近年、化合物の光安全性に対する関心の高まりから光毒性リスク評価に関する数多くの研究がなされており、2014 年には医薬品の光安全性評価ガイドライン（ICH S10）が発行された。ICH S10 では、光毒性化合物の特徴として、i) 光反応性が高いこと、ii) 露光部位である皮膚や眼に分布しやすいことを挙げており、化合物の光安全性評価において光化学的特性および薬物動態学的特性を評価することは非常に重要である。しかし、製品開発において、多くの製品候補化合物に対する *in vivo* PK study 実施を考えた場合、本試験に起因する光安全性評価全体のスループット低下および使用動物数の増大は重大な課題となる。当研究室では、PK study に cassette-dosing 法を適用することで、経口投与化合物に対する PK study のスループット改善および使用

動物数の削減を実現した。しかしながら、経皮適用化合物に対しては現時点で検討は為されておらず、本研究では光化学・光生物学的試験および経皮的 cassette-dosing PK study データに基づく経皮適用化合物の光安全性評価を試みた。

経口投与化合物では、投与後に露光部位である皮膚や眼へ分布しやすい化合物の光毒性リスクが高いと判断される。一方で、経皮適用化合物は皮膚へ直接的に曝露されるため、その光毒性発現リスクは高く、より信頼性の高い光安全性評価が必要となる。ICH S10 では「経皮投与製剤は、皮膚に直接適用されることから、塗布される部位が通常光に曝露されない場合を除き、光に曝露される組織に分布すると見なされる」と記載されており、一見、PK 評価が不要であるように思われるが、被験物質を経皮投与後、その皮膚中濃度をモニタリングすることで、皮膚への蓄積性を評価することができ、これをもとに光毒性発現リスクの時間的な推移を予測できると考える。

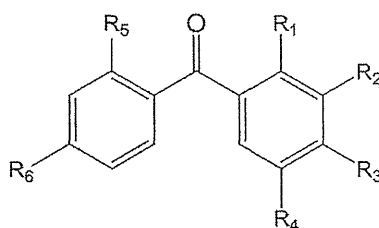
さて、benzophenone derivatives (BZPs) は医薬品としては NSAIDs や高脂血症治療薬、化粧品としてはサンスクリーン剤など、幅広い用途で用いられている化合物群である。BZPs はその用途に応じて経口剤、湿布剤、乳液やローションなどが存在し、その剤形も多岐にわたるが、投与形態に関わらず多くの BZPs で光毒性の発現が報告されている。多くの実験的・臨床的報告から、経皮投与される BZPs の光毒性は化合物毎でそのポテンシャルに強弱があると報告されており、特に ketoprofen 貼付剤 (モーラステープ®) は強力な光毒性を発現することが知られている。つまり、BZPs は共通の chromophore をもつが、修飾されている置換基によってその光毒性に強弱があるため、本研究においてはモデル化合物として適切であると考えた。本研究では、6

種類の BZPs をモデル化合物として用い (Fig. 1)、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。

B. 研究方法

B-1) 試薬類

Benzophenone (BZ) は純正化学 (東京, 日本) より購入した。Dimethyl sulfoxide (DMSO), dioxybenzone (DO), erythromycin (EM), formic acid, imidazole, ketoprofen (KT), mexenone (MX), Na₂HPO₄ 12H₂O, NaH₂PO₄ 2H₂O,




BZPs	CAS No.	Clog P ^{a)}	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Benzophenone (BZ)	119-61-9	3.18	-H	-H	-H	-H	-H	-H
Dioxybenzone (DO)	131-53-3	3.49	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-OH	-H
Ketoprofen (KT)	22071-15-4	2.76	-H		-H	-H	-H	-H
Mexenone (MX)	1641-17-4	4.08	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃
Oxybenzone (OX)	131-57-7	3.59	-OH	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H
Sulisobenzene (SB)	4065-45-6	0.80	-OH	-H	-OCH ₃	-SO ₃ H	-H	-H

Fig. 1 Chemical structure of tested BZPs. ^{a)} Clog P calculated using ChemBioDraw Ultra 13.0 software.