

厚生労働行政推進調査事業費補助金（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 28 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  
岡山大学・医歯薬学総合研究科 教授

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、我が国より提案した AR STTA 法について OECD ガイドライン(TG 458)が成立した。また、韓国より提案された 22Rv1/MMTV\_GR-KO 試験系についてバリデーション試験管理グループメンバーとして検証研究を進めるとともに 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作成に向けた議論を進めた。ER STTA 法については JaCVAM 資料編纂委員会における評価報告書の最終化を行った。また、本年度より、皮膚感作性 AOP の key event の 1 つを評価する新たな in chemico 試験法である ADRA 法のバリデーションを開始した。本年度は、参加施設のトレーニングを実施後、海外メンバーを含む VMT 会議で合意された SOP 及び試験計画に従い、フェーズ 1 試験により施設内再現性の高い結果を得た。

A. 研究目的

本研究では、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、アンドロゲン受容体転写活性化試験法(AR STTA 法)、エストロゲン受容体転写活性化試験法(AR STTA 法)PBTG について新たに提案される試験法を取り込んだアップデートへの対応、国内外機関と連携した関連プロジェ

クトへの参画により、これらガイドラインの行政利用を推進するため化学物質の内分泌かく乱性評価の枠組みの国際共同のもとの構築を目的としている。本年度は、我が国より提案した AR STTA 法について OECD ガイドライン(TG 458)が成立し、同様のアッセイ系として韓国より提案された 22Rv1/MMTV\_GR-KO 試験系についてバリデー

ション試験管理グループメンバーとしてバリデーションに協力した。また、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議論に引き続き参画した。ER STTA 法については JaCVAM 資料編纂委員会における評価報告書の最終化を行った。また、本年度からは、内分泌かく乱性評価のための2つの試験法ガイドライン化の経験をもとに、我が国で開発された皮膚感作性 AOP(Adverse Outcome Pathway)の KE(Key Event)の評価系として行政的有用性が期待される試験法である ADRA(Amino acid Derivative Reactivity Assay) 法の OECD ガイドライン化を目的とした研究を開始した。

## B. 研究方法

### 1) ER STTA 法関連

#### 1 - 1 JaCVAM 内分泌かく乱試験法資料編纂委員会評価報告書の作成

昨年度までに、JaCVAM 内分泌かく乱試験法資料編纂委員会(メンバーは、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))における議論をもとに JaCVAM に提出した ER STTA 法の評価報告書について、JaCVAM で実施したレビューにより示されたコメント対応を行い、最終版を完成して提出した。

### 2) AR STTA 法関連

#### 2 - 1 AR STTA 法 OECD ガイドライン化の研究

アンドロゲン受容体転写活性化試験法

(AR STTA 法)のうち、本研究班で提案してきた 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)については本年度 OECD ガイドライン(TG458)として成立した。本年度は、主に韓国から提案された AR 転写活性化試験法である 22Rv1/MMTV\_GR-KO 試験系について、VMG-NA メンバーから構成されるバリデーション試験管理グループメンバーとして、試験計画や試験結果について議論を行った。

#### 2 - 2 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。

### 3) ADRA 法

#### 3 - 1 ADRA 法の多施設検証研究

新規 *in chemico* 皮膚感作性試験法として我が国で開発された ADRA(Amino acid Derivative Reactivity Assay)法について、再現性・信頼性を検証するため多施設バリデーション研究を実施した。本年度は、海外メンバーを含むバリデーション管理グループ会議を実施して、バリデーション試験に

における SOP 及び 2 フェーズから構成される試験計画を策定し、フェーズ 1 で得られた測定結果をもとに、施設内再現性の評価とフェーズ 2 に向けた SOP の最適化を行った。

#### 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 JaCVAM 内分泌かく乱試験法資料編纂委員会評価報告書の作成

昨年度、資料編纂委員会内で最終化を行い JaCVAM に提出した当該報告書に対して、JaCVAM 評価委員等より出されたコメント対応に対応した修正を行った。

多くは細かい編集上のコメントであったが、主な変更点としては以下が挙げられる。バリデーション試験については、バリデーション研究と変更された。8. 試験法の有用性、限界および提言において、「9) ER STTA 法を化学物質の安全性評価にどのように利用するかについての検討も今後の課題である。」と記載されていた点について、結論が必要とのコメントに対応して、「9) ER STTA 法は、化学物質の内分泌かく乱性をスクリーニングするための試験法であり、化学物質の安全性評価に用いる際には、他の *in vivo* 評価系等との結果と併せて実際の生体影響について総合的に判断を行うべきである。」との記載に改められた。また表題については、評価委員からのコメントに基づい

て当初の「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」から、本文中で用いている本試験系のタイトルとあわせて「ER STTA 法: hER $\alpha$ -HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法の評価報告書」に修正された。更新された最終の評価報告書を本報告書の参考資料 1 として添付した。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 - 1 AR STTA 法 OECD ガイドライン化の研究

アンドロゲン受容体転写活性化試験法 (AR STTA 法) のうち、本研究班で提案してきた 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) については本年度 OECD ガイドライン (TG458) として成立した。本報告書には、成立した TG458 を参考資料 2 として添付した。TG458 成立を受けて、来年度より JaCVAM 内分泌かく乱スクリーニング資料編纂委員会において評価報告書の作成を行うこととなった。

22Rv1/MMTV<sub>GR</sub>-KO 試験系については、韓国で実施されたアゴニスト試験法バリデーション結果について VMG-NA 会議に併せて実施された SMT 会議及び SMT 電話会議等で議論を行い、以降の方針について検討した。図 1 にバリデーション組織図を示した。バリデーション結果において施設間再現性は良いものの一部のアンドロゲン活性の無い物質について陽性判定となっていたことから、細胞のキャラクタリゼーションの実施、反応率計算のための陽性コントロール濃度の修正が提案された。一方、試験濃度が高く用量反応性を評価できるデータが得られて

いない物質があった。これらの物質について、より低濃度まで測定することで用量反応性を評価出来るデータが得られたことから（図2）、SOPに試験濃度設定試験の追加や測定濃度に関する修正を行った。修正されたSOPに従い、アゴニスト試験の再実施を行い、アゴニスト試験において再現性・信頼性を示す結果が得られた後、アンタゴニスト試験を実施することとなった。

## 2 - 2 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 Androgen Receptor Reference Chemical Working GroupにおいてAR系についてin vivo, in vitro試験法開発のためのリファレンス化合物リスト構築を終了し、引き続きステロイド産生能試験、TR系試験法などリファレンス化合物リスト構築に向けた議論を開始した。また、今後はAR系のみでなく内分泌かく乱性の評価を行う試験系全般を対象としてリファレンス化合物リストの構築を進めて行くこととなり、今後はグループの名称についてはReference Chemical Working Groupとして活動を継続することとなった。

## 3) ADRA法

### 3 - 1 ADRA法の多施設検証研究

ADRA法バリデーション試験については、2フェーズからなる試験計画及び各フェーズで測定を行う被験物質について海外専門家を含むVMT会議で議論を行い決定した。ADRA法バリデーション組織図を図3に、VMTメンバーリストを表1に示した。これまで

に試験計画に従いフェーズ1試験が終了した。フェーズ1試験では、10物質の被験物質を3セット独立にコード化した30サンプルの測定を各施設で実施し、得られた結果より各施設の施設内再現性を評価した。フェーズ1試験測定結果の概要を図4に示す。1物質について2施設において陰性・陽性の混在する結果となった以外、残りの9物質については、いずれの参加施設とも3回の測定結果の判定が一致する結果を得た。一方、1施設では、3物質について得られていた結果がクライテリアを満たしていないことが後から判明したため結果は不採用とされた。これとは別に全ての施設で1~3回の再試験が実施され、不採用データが多いことが課題としてあげられた。そこで、フェーズ2試験実施に先立って、SOPの見直しについてVMT会議で議論を行った。結果の解析から不採用の主な原因は、1、陽性対象がクライテリアの範囲を逸脱、2、プレート内でのデータばらつき、3、水もしくはアセトン溶媒の参照コントロールの逸脱もしくはばらつきであった。これらのうち、2、3については、サンプル調整に起因するばらつきと判断されたことから、SOPに注意深くサンプル調整を行う旨、記載を追加することとなった。一方、1については、フェーズ1で用いた陽性対象のクライテリアは、暫定的にリードラボの背景データから設定されたものであったことから、フェーズ1試験における4施設のデータからクライテリアの再設定を行った。修正されたSOPを用いてフェーズ2試験を実施することがVMTにおいて了承されたため、現在、フェーズ2試験を実施中である。

#### D. 考察

本研究ではこれまで化学物質の内分泌かく乱性による AOP(Adverse Outcome Pathway) の MIE(Molecular Initiating Event)の評価系であるエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体の2つの転写活性化試験法について、OECD VMG-NA と連携してガイドラインを進めてきた。これまでの研究により、ER 転写活性化試験法(ER-STTA)については、OECD TG455 として、AR 転写活性化試験法(AR-STTA)については、OECD TG458 として、ガイドラインを成立させることが出来た。それぞれの試験法については、同等の試験法についてバリデーション研究が進められており、我が国は両ガイドラインのリード国であり、本研究班では、今後もそれらのバリデーション及び OECD ガイドラインへの組み込みに協力していくことが重要であると考察された。特に AR STTA については、現在の TG458 は、ER Ecoscreen 系単独のガイドラインであることから、本研究班も VMT としてバリデーションに参加している 22Rv1/MMTV\_GR-KO 試験系、また欧州において AR CALUX 系のバリデーションが進められており、それらの試験の OECD ガイドライン化にあたっては本年度成立した TG458 の PBTG 化が必要であり、TG458 の提案国として、今後も引き続き VMG-NA と連携して対応が求められている。

一方、本年度からは、新たに ADRA 法バリデーション研究を開始した。本系は、我が国で開発された皮膚感作性の AOP における MIE である被験物質と生体タンパクとの共有結合性評価を行う in chemico 試験法である。皮膚感作性評価系としては、AOP の各 key event 評価を行う幾つかの試験系がガ

イドライン化されており、これらを組み合わせることにより信頼性の高い評価が可能になると考えられる。皮膚感作性 AOP の key event と各種試験法との関係を図 5 に示した。ADRA 法と同じメカニズムに基づく評価系として OECD では既に DPRA 法(OECD TG442c)が、ガイドライン化されている。DPRA 法と ADRA 法の概要の比較を図 6 に示す。DPRA 法では合成ペプチドを用いるため比較的高濃度の被験物質溶液を用いる必要があり、被験物質の析出や共溶出等の問題が指摘されているのに対して、低分子化合物を用いる ADRA 法では、DPRA 法の 100 分の 1 の被験物質濃度、5 分の 1 の反応液量で十分な感度が得られる事から、DPRA 法で指摘されている問題の解決が期待される。よって ADRA 法については、先行した DPRA 法より優れた試験法ではあるが、原理は同じであることから、本研究班における検証研究の結果をもとに DPRA 法の同等(me too)試験として PBTG 化の提案を行う予定をしている。本系は、これまでに終了したフェーズ 1 試験では施設内再現性において非常に良好な結果が得られており、これまでの内分泌かく乱評価系の OECD ガイドライン化や PBTG 化の経験をもとに早期のガイドライン化が可能であると考察される。

#### E. 結論

現在、OECD を中心として様々な毒性に関して AOP の構築が進められており、今後、AOP を活用するため、その MIE や KE の評価系が提案されると想定される。AOP の MIE や KE に相当する評価系は、それ自体は AO(Adverse Outcome)ではないとの観点から、試験結果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、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確立・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

- M. Matsumoto, H. Todo, T. Akiyama, M. Hirata-Koizumi, K. Sugibayashi, Y. Ikarashi, A. Ono, A. Hirose and K. Yokoyama ; Risk assessment of skin lightening cosmetics containing hydroquinone.; *Regul Toxicol Pharmacol*, 81,128-135 (2016)
- M. Hirata-Koizumi, R. Ise, H. Kato, T. Matsuyama, T. Nishimaki-Mogami, M. Takahashi, A. Ono, M. Ema and A. Hirose ; Transcriptome analyses demonstrate that Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR ) activity of an ultraviolet absorber, 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole, as possible mechanism of their toxicity and the gender differences.; *J Toxicol Sci*, 41,(5) 693-700 (2016)

### F-2 . 学会発表

A. Ono, J. Ciloy, M. Matsumoto, M. Takahashi, T. Kawamura and A. Hirose :Development and validation of a QSAR model to classify chemicals for toxic potency of sub-acute repeated dose toxicity. *17th International Conference on QSAR in environmental and health sciences* (2016.6, Miami Beach, Florida, USA)

A. Ono, H. Jinno and A. Hirose :Comparative analysis of respiratory and skin sensitization potential of chemicals using Japanese GHS classification.. *The 52nd Eurotox2016* (2016.9, Sevilla, Spain)

A. Ono, H. Jinno and A. Hirose :Evaluation of the OECD QSAR Toolbox in the screening of chemical sensitizer.. *The 14th International Congress of Toxicology* (2016.10, Merida, Mexico)

## 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

参考資料 1 ; ER STTA 法 : hER -HeLa-9903 細胞を用いたエストロゲン受容体恒常発現系転写活性化試験法の評価報告書

參考資料 2 ; OECD TG458

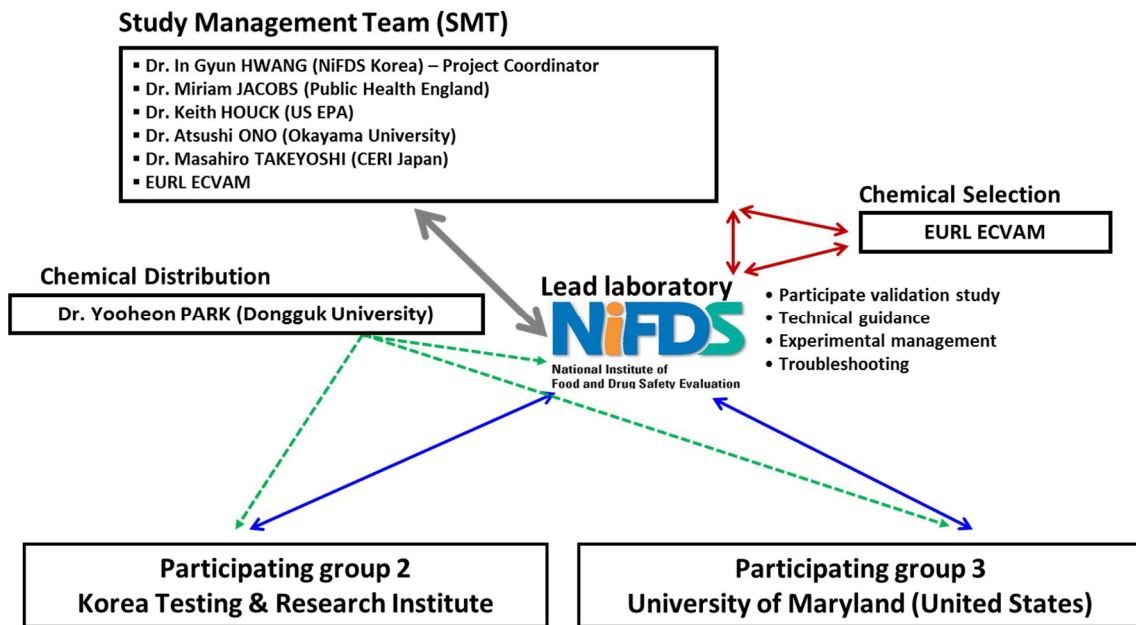


図 1 22Rv1/MMTV\_GR-KO 試験法バリデーション組織図

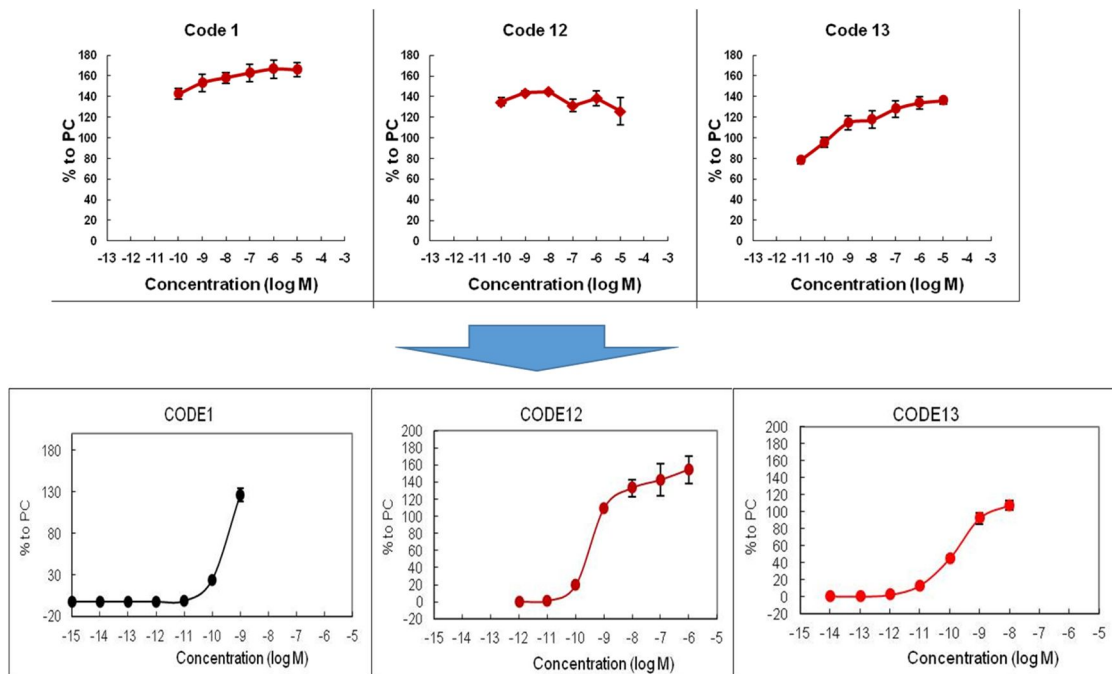


図 2 22Rv1/MMTV\_GR-KO アゴニストアッセイバリデーション結果で用量依存性が得られていなかった物質の再測定結果



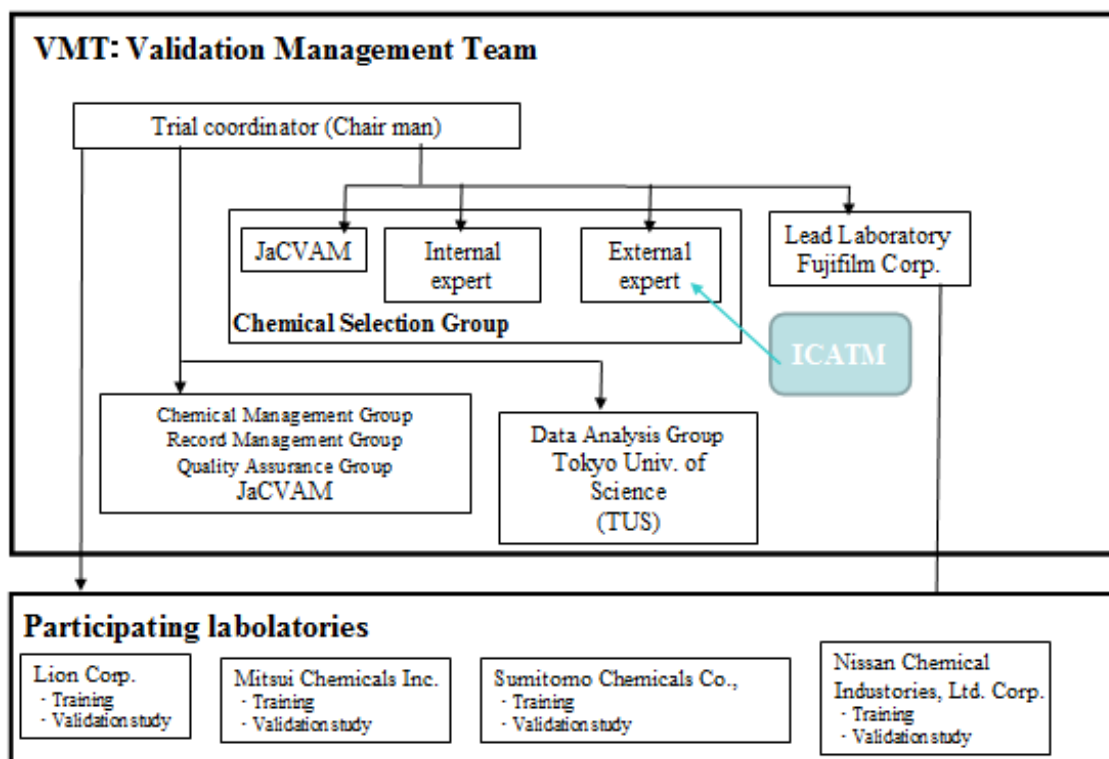


図3 ADRA 法バリデーション組織図

表1 ADRA 法バリデーション VMT メンバーリスト

- Trial coordinator (Chairman): Atsushi Ono, Okayama University
- Expert: Nicole Kleinstreuer, NICEATM
- Expert: Jon Richmond, Ethical Biomedical Research and Testing Advice and Consultancy
- Expert: Bae-Hwan Kim, Keimyung University
- Expert: Tsuyoshi Kawakami, National Institute of Health Sciences
- Expert: Kohichi Kojima, Food and Drug Safety Center
- JaCVAM: Hajime Kojima, National Institute of Health Sciences
- Biostatistician: Takashi Sozu, Tokyo University of Science
- Biostatistician: Takuto Nakayama, Tokyo University of Science
- Biostatistician: Takeru Kusao, Tokyo University of Science
- Lead Laboratory: Toshihiko Kasahara, Fujifilm Corporation
- Lead Laboratory: Masaharu Fujita, Fujifilm Corporation
- Lead Laboratory: Yusuke Yamamoto, Fujifilm Corporation

No.	Test Chemical	DPR prediction	Lab A			Lab B			Lab C			Lab D		
			1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
1	A	S	97.8	96.3	96.3	59.3	58.5	96.8	83.0	60.3	71.6	96.3	96.4	96.8
2	B	S	56.6	55.9	56.5	58.0	58.1	56.0	57.9	57.7	56.2	56.2	56.5	56.6
3	C	S (Lys co-elution*)	94.1	95.0	96.3	99.0	99.3	99.5	97.7	97.5	96.5	50.0	54.1	55.6
4	D	S	30.8	28.2	15.1	21.0	22.5	22.7	54.0	—	36.2	24.7	16.1	26.6
5	E	S	25.0	22.1	21.7	27.0	27.7	27.5	24.5	—	40.6	50.0	44.2	50.0
6	F	S	45.7	45.7	46.1	46.7	48.1	47.0	48.8	25.1	48.9	51.2	50.3	53.1
7	G	S	14.9	10.1	11.5	10.2	11.5	10.2	12.3	15.1	15.1	13.0	14.7	19.8
8	H	NS	0.3	0.1	0.6	0.1	0.0	0.1	0.2	2.8	2.9	0.6	1.1	4.8
9	I	NS (Lys co-elution)	1.5	1.4	1.8	2.8	2.0	4.9	0.6	—	6.1	2.8	1.3	9.0
10	J	NS	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.1	0.3	2.5	3.0	0.4	1.9	4.8

[-] marks show the data that were not measured in error.

[\*] mark shows that Lys peptide co-eluted with test chemical at two out of three laboratories.

図4 ADRA 法バリデーション試験 Phase1 測定結果の概要

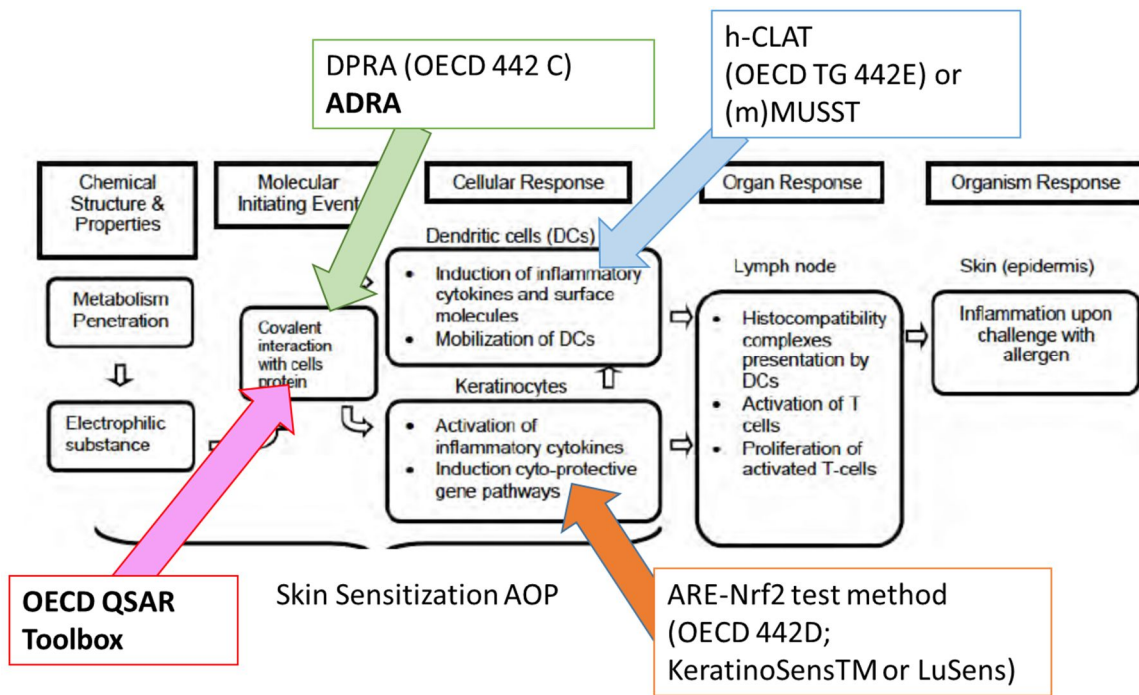


図5 皮膚感作性 AOP(Adverse Outcome Pathway)と AOP の key event 評価系の関係

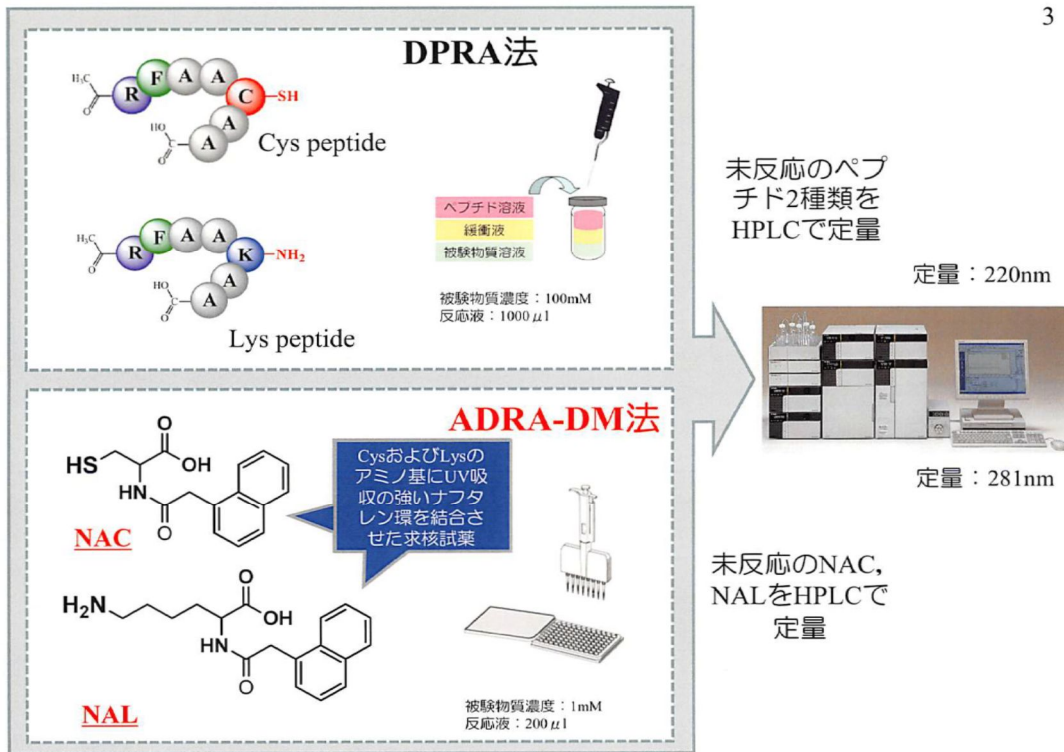


図6 DPRA法とADRA法の概要の比較