

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

国際状況の調査

研究分担者 仲井 俊司

一般社団法人日本化学工業協会 化学品管理部 部長

研究要旨

化学物質の毒性試験法は、日本国内だけでも各種法律に基づいたさまざまな試験法ガイドラインが存在する。それらに大きく影響を及ぼすガイドラインが、経済協力開発機構(OECD)で開発される毒性試験法ガイドラインである。近年は動物実験そのものを削減する方向でガイドライン開発が進められており、ここ数年、動物を使用しない新規の試験法ガイドラインあるいは既存ガイドラインの改良が活発に行われている。日本において、新たな試験法を国際的なガイドラインにするためにも、この OECD の試験法開発の状況および傾向を知っておくことは、効率的に試験法開発を進めるうえで非常に重要である。このため、OECD の試験法ガイドラインの公定化に向けた取り組みについて最新状況を調査した。

A. 研究目的

OECD が作成する毒性試験法ガイドラインは、OECD 加盟国だけでなく、非加盟国においても当該国内の試験法に多大の影響を与えている。しかし、試験法は絶えず改良され、また、新たに上がってくる問題に対処するために新しい試験法の開発も継続的に行われている。今回は、国際機関である OECD の試験法開発の動向について調査し、最新の状況を把握する。AOP ( Adverse Outcome Pathways ) や IATA ( Integrated Approaches to Testing and Assessment ) に関連する情報も調査する。

B. 研究方法

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 55 回会合(2016 年 11 月開催)の SCHEDULE OF ACTIVITIES FOR 2017 (ENV/JM(2016)45) <sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>を調査した。今回の報告は人健康関連を主な対象として行うが、他の生態毒性関連についても言及する。

C. 研究結果および考察

1. 健康影響に関する OECD 試験ガイドライン進捗状況

OECD の試験法は 3 桁の番号で作成管理されており、物化性状等に関わる試験法は 100 番台、生態毒性関連は 200 番台、環境中運命については 300 番台、人健康については 400 番台の番号となっている。中には不要となったあるいは現在は使用してはならない試験法は削除されているものもあり、必ずしも連番にはなっていない。この中で、400 番台の試験法では、使用動物が多すぎるという動物愛護の面から削除された試験法(TG401)がある。以前は使用されていた急性経口投与毒性試験法である。現在はこれに代わる複数の試験法が開発整備されている。なお、このような急性毒性試験についての動物使用削減に関するガイダンスドキュメントも最近公開されている。

現在、活発に開発されているのは、主に生きた動物を使用しない in vitro 試験法である。

また、内分泌かく乱物質やナノマテリアルなどが新規政策課題(Emerging Policy Issues)として国連環境計画[United Nations Environment Programme (UNEP)]や OECD で取り上げられている。

各国および OECD ではこれらに対処するために各種毒性試験ガイドラインの開発が進められている。

2. 第 54 回会合時 (2016 年 2 月) から今回回会合までに作成 / 改訂された試験法

以下に示すようなガイドラインが第 54 回会合時 (2016 年 2 月) から今回回会合 (第 55 回会合 : 2016 年 11 月) までの間に、新規に作成または改定されている (公開日 : 2016 年 7 月 29 日)。人健康関連では、新規ガイドラインはいずれも in vitro 試験法であり、また、改定されたガイドラインにも in vitro 試験法が多く含まれる。

また、ガイドラインでは決めきれなかったような特殊なケースなどに対応するために種々のガイダンスドキュメントが出版されている。この中に、急性毒性試験全般 (経口/経皮/吸入投与、など) における動物使用削減に関するものがある (No.237)。なお、IATA に関連するガイダンスドキュメントが多数作成されている。

#### 【ガイドライン】

##### ・新規ガイドライン

###### <生態毒性関連>

- 1) TG242: Potamopyrgus antipodarum Reproduction Test (淡水産巻貝の繁殖試験)
- 2) TG243: Lymnaea stagnalis Reproduction Test (淡水産巻貝の繁殖試験)

###### <人健康関連>

- 1) TG442E: In Vitro Skin Sensitisation (h-CLAT)
- 2) TG458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals

##### ・改定ガイドライン

###### <生態毒性関連>

- 1) TG220: Enchytraeid Reproduction Test
- 2) TG222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)
- 3) TG223: Avian Acute Oral Toxicity Test
- 4) TG226: Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil
- 5) TG228: Determination of Developmental

Toxicity to Dipteran Dung Flies (Scathophaga stercoraria L. (Scathophagidae), Musca autumnalis De Geer (Muscidae))

- 6) TG232: Collembolan Reproduction Test in Soil

###### <人健康関連>

- 1) TG421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
- 2) TG422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
- 3) TG431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method
- 4) TG455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists
- 5) TG473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test
- 6) TG474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
- 7) TG475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test
- 8) TG476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xpvt genes
- 9) TG478: Rodent Dominant Lethal Test
- 10) TG483: Mammalian Spermatogonial Chromosomal Aberration Test
- 11) TG487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test
- 12) TG489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay
- 13) TG 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene

#### 【ガイダンスドキュメント】

###### <生態毒性/人健康関連>

・IATA 関連 (一部近年発行のものを含む)

- 1) No.203: Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation (2014)
- 2) No.250: Report on Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA) - First Review Cycle (2015): Case Studies on

#### Grouping Methods as a Part of IATA

- 3) No.255: Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (2016)
- 4) No.256: Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation (2016)
- 5) No. 260: Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) (2016)

#### ・ IATA 関連以外

- 1) No. 237 Guidance Document on Considerations for Waiving or Bridging of Mammalian Acute Toxicity Tests (2016)
- 2) No. 239 Guidance Document on Honey Bee Larval Toxicity Test following Repeated Exposure (2016)

#### 【その他】

#### ・ 報告書（試験法の妥当性検証等に関連するもの）

- 1) No. 235 Potamopyrgus validation report
- 2) No. 236 Lymnea validation report
- 3) No. 238 Overview on genetic toxicology TGs Transactivation Assay to Detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity
- 4) No. 240 Draft report of the validation of the (anti-) ER CALUX bioassay: U2-OS cells Transcriptional ERalpha CALUX-assay for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals for inclusion in TG455
- 5) No. 241 Report of the First and Second Validation Studies for AR STTA Assays to Detect Androgenic and Anti-androgenic Activities of Chemicals

### 3. ガイドラインに関する 2016 年の活動

#### 【生態毒性関連 (200 番台)】

15 個のガイドライン（以下 TG）およびガイダンス（以下 GD）の開発・修正が進められている。なお、この中に OECD 文書中に AOP についての言及があるプロジェクトはなかったものの、IATA に

関連するものとして、Guidance Document on IATA for Fish Acute Toxicity Testing がある。

なお、第 54 回会合時(2016 年 2 月)と比べて、今回(第 55 回会合)は 200 番台の項目として 4 個 メダカの抗アンドロゲン作用検出スクリーニング試験のガイダンス、ミジンコの幼若ホルモン活性検出の短期試験の新規ガイドライン、ゼブラフィッシュの拡張一世代繁殖試験の新規ガイドライン、ミツバチの帰巢評価試験の新規ガイドラインが新たに追加されている<sup>1)</sup>。

#### 【健康影響関連 (400 番台)】

32 個の TG および GD の開発・修正が進められている<sup>1)</sup>(以下に OECD の Test Guidelines Programme で進行中の 32 個のプロジェクトのタイトルを記載)。

なお、これらの中で OECD 文書<sup>1)</sup>中に AOP について言及のあるプロジェクトは、EDTA Activity: Detailed Review Paper on Retinoic Acid Pathway(AOP efforts for the RAR-RXR part of the project)、New TG: Genomic Assay Rapid Detection test for skin (GARDskin) test: (AOP key event 3)の 2 つである[以下では斜体で表示]。また、IATA について言及のあるプロジェクトは GD on IATA for Serious Eye Damage and Eye Irritation、IATA on Non-Genotoxic Carcinogens の 2 つである[以下では破線(下線)で表示]。

なお、第 54 回会合時(2016 年 2 月)の文書と比べて、今回(第 55 回会合)の文書<sup>1)</sup>では 400 番台の項目として 7 個(以下の番号は 28~34[以下では一重下線部])が新たに追加されている。

#### ・ OECD Test Guidelines Programme におけるプロジェクト(健康影響関連)

- 1) New TG 433: Fixed Dose Procedure as Alternative to TG 403 (急性吸入代替)
- 2) New TG: Performance-Based Test Guideline on Androgen Receptor Transactivation Assays
- 3) Performance-Based Test Guideline for the establishment on human-derived hepatic system to investigate biotransformation and toxicity of compounds by evaluation of CYP450 induction competence
- 4) Feasibility study for a Guidance Document on Study Designs, to be used in revisions of Guidelines
- 5) Updated TG 488, Transgenic Rodent

- Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays
- 6) Revision or replacement of TG 402 on Acute Dermal Toxicity Test
  - 7) Amendments to the Inhalation TGs and GD to accommodate nanomaterial safety testing (ナノ物質; United States)
  - 8) A new TG on SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT) for identifying chemicals not requiring a classification for eye irritation or serious eye damage under UN GHS
  - 9) In vitro Macromolecular Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage
  - 10) Histopathology as Addendum to OECD Test guideline 438 Isolated Chicken Eye Test for the Determination of Ocular Irritation of Detergent and Cleaning Products
  - 11) Proposed Revision to OECD Guidance Document No. 160 on the Isolated Chicken Eye Test (including Histopathology)
  - 12) GD on IATA for Serious Eye Damage and Eye Irritation
  - 13) IL-8 Luc assay: An In Vitro Method for Identifying the Skin Sensitisation Potential of Chemicals (日本)
    - The experimental part of the IL-8 Luc assay validation study was completed in September 2014, the independent peer review by the JaCVAM started in February 2015;
    - The appropriateness of generating additional information with the IL-8 Luc assay will be contingent on the outcome of the peer review by JaCVAM. Peer review report expected 1st quarter of 2016.
  - 14) Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-Sens) for identifying skin sensitization potential of chemicals
  - 15) New Test Guideline for the Pig-a Assay, an in vivo Gene Mutation Assay Promoting the 3Rs Principles
  - 16) IATA on Non-Genotoxic Carcinogens
  - 17) Guidance Document on the Adaptation of In Vitro Mammalian Cell Based Genotoxicity TGs for Testing of Manufactured Nanomaterials (ナノ物質; European Commission)
  - 18) EDTA Activity: Detailed Review Paper on Retinoic Acid Pathway
  - 19) EDTA Activity: developing a list of reference chemicals for E-A-S metabolism
  - 20) EDTA Activity: New TG on Androgen Receptor Transactivation Assay
  - 21) EDTA Activity: Feasibility study for minor enhancements of TG 414 (Prenatal Developmental Toxicity Study) with ED-relevant endpoints
  - 22) EDTA Activity: Exploring the Concept of Developing Pathway-Based Test Method Performance Metrics: a Case Study Using Estrogen Receptor Signalling
  - 23) EDTA Activity: Elaborating the Conceptual Framework for cross linkage between the human and ecotoxicology components: Three case studies to supplement GD 181
  - 24) EDTA Activity: Species concordance and species differences considerations in extrapolation of chemical effects across species in vitro
  - 25) Joint WNT-WG GLP Activity: Development of Guidance on good in vitro method practice
  - 26) New TG: ROS Assay: An in chemico Method for Identifying the Phototoxic Potential of Chemicals (日本)
  - 27) New TG: Genomic Assay Rapid Detection test for skin (GARDskin) test: An in vitro method for identification of skin sensitizers based on a genomic interpretation of the impact of chemicals on human dendritic cell-like cells (AOP key event 3).
  - 28) New TG: Toxicogenomic analysis on 3D reconstituted epidermis for measuring skin sensitization potency - the SENS-IS assay.
  - 29) Updated TG 442B: Local Lymph Node Assay Using Flow Cytometry (LLNA: BrdU-FCM)
  - 30) DRP on the Miniaturized versions of the Bacterial Gene Mutation Test
  - 31) Stakeholder workshop on integrated testing strategy for developmental neurotoxicity (DNT)
  - 32) Update of the repeated dose oral toxicity 90-day study (OECD TG 408) with parameters for ED
4. IATAに関するプロジェクト  
OECDが取り組んでいるIATAのプロジェクトとして以下の3つがある<sup>1)</sup>。

- 1) Framework for Integrated Approaches to Testing and Assessment
- 2) Development and application of Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)
- 3) Development of a guidance document on the Evaluation and Application of Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) for Skin Sensitisation based on the AOP concept

また、「IATAの開発(新規な方法論の利用やガイダンスの作成など)に向けた共通理解を具体的なケーススタディを通して得ること」を目指したプロジェクトとしてOECDではIATAの多くのケーススタディの取りまとめが進行しており、以下の4つの報告書が公開されている(ガイダンスドキュメント No.251-254)。

- 1) In Vitro Mutagenicity of 3,3' Dimethoxybenzidine (DMOB) Based Direct Dyes
- 2) Repeat Dose Toxicity of Substituted Diphenylamines (SDPA)
- 3) Hepatotoxicity of Allyl Ester Category
- 4) Bioaccumulation Potential of Biodegradation Products of 4,4'-Bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl

#### 5. OECDのAOPに関するプロジェクト

OECDのEAGMST(Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics)が進めているAOP開発のレビュープロセスの1順目が終了し、以下の5つのAOPが文書として公開されている。

- 1) Adverse Outcome Pathway on Protein Alkylation Leading to Liver Fibrosis
- 2) Adverse Outcome Pathway on Alkylation of DNA in Male Pre-Meiotic Germ Cells Leading to Heritable Mutations
- 3) Adverse Outcome Pathway on Aromatase Inhibition Leading to Reproductive Dysfunction (in Fish)
- 4) Adverse Outcome Pathway on chronic binding of antagonist to N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) during brain development induces impairment of learning and memory abilities
- 5) Adverse Outcome Pathway on binding of

agonists to ionotropic glutamate receptors in adult brain leading to excitotoxicity that mediates neuronal cell death, contributing to learning and memory impairment

#### D. 参考資料

1. 第55回OECD Joint Meeting 資料  
<https://community.oecd.org/docs/DOC-104450>  
 (登録されたもののみアクセス可能)
2. Overview of all projects on the workplan  
<https://community.oecd.org/docs/DOC-57088>  
 (登録されたもののみアクセス可能)