

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）
OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究

令和元年度 分担研究報告書

毒性等情報収集

研究分担者 山田隆志

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 安全性予測評価部 室長

研究要旨

近年 OECD では、AOP に基づいて *in silico*、*in vitro*、*in vivo* の情報を組み合わせて化学物質の有害性を評価する Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) および Defined Approach (DA) の開発が進められている。厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業における化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究および化学物質の新たなリスク評価手法の開発に関する研究の成果を、AOP の開発や代替試験法の公定化、IATA のコンセプトに基づいた化学物質のリスク評価の促進、規制・ガイドラインの新設や見直し等に反映させていくためには、当該研究事業で取得された新規有害性評価系のデータをとりまとめ、化学物質情報や毒性情報などとともに統合して活用することが求められる。そこで本研究では、平成 30 年度に開始された厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業公募型研究 4 課題について、構築する新規有害性評価系、試験物質とその試験データおよび AOP 開発、試験法公定化などの観点から整理することとし、今後の研究開発の参考情報とする。

研究協力者

井上美香 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
安全性予測評価部

A. 研究目的

試験データのない数多くの化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。さらに、動物福祉の観点から動物実験の削減の流れも着実に進んでいる。こうした動向に対応するため、近年 OECD では AOP に基づいて *in silico*、*in vitro*、*in vivo* の情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する統合的アプローチ (Integrated Approaches to Testing and

Assessment, IATA) のコンセプトの確立へ向けた試みが進められてきた。

IATA による評価のワークフローは、現在以下のように整理されている (図1)。

- ① 課題を設定する。規制上のニーズ、制約、許容される不確実性を整理する。
- ② 関心のある化学物質について入手可能な既存の情報 (*in vivo*, *in vitro*, *in silico* 等) を収集し、Weight of Evidence (WoE) により統合的に解析し、規制上の結論を得る。
- ③ 既存の情報が不十分な場合は、効率的な試験戦略を立て、新規の情報を取得し、規制上の決定を下す。

IATA の実施において、AOP は種々の情報の

因果関係を明確化し、結論の導出に必要な情報の同定に役立つと期待されている。

さらにOECDでは、より透明性と客観性が高く標準化されたIATAを構築することを目的としてDefined Approach (DA)の検討が進められており、そのガイダンスを公開している。どのようなデータが必須であり、それぞれについてどのような重みづけを行うべきかが重要であり、それをサポートするのがAOPであると考えられている。

国際的には、IATAやDAの行政的な実運用へ向けて、種々のケーススタディを実施して、得られた経験・教訓を整理してガイダンスを開発する取り組みが進められている。今後は、動物実験への依存度を軽減しつつ、化学物質が発現しうるヒトへの毒性を効率的かつ高精度で予測するために、IATAやDAに基づいてヒト健康リスク評価のストラテジーを進化させる必要がある。

厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業では、化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究、化学物質の新たなリスク評価手法の開発に関する研究を推進し、成果をあげてきた。今後、これらの成果を、規制・ガイドラインの新設や見直し、さらには日常生活に利用される種々の化学物質のリスク評価等に反映させていくためには、当該研究事業で開発された新規有害性評価系のデータを、化学物質情報や関連物質の毒性情報などとともに統合して活用することが求められる。そのためには、各研究課題の成果を整理してデータを集積するとともに、体系的にデータを解析し、不足する情報の同定や研究事業で開発された評価系の有効利用による規制判断の支援や評価・試験の戦略を立てることが望まれると

ころである。

そこで、本研究では、厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業公募型研究でこれまでに得られた成果の基礎試験データを集積し、IATAのコンセプトに基づいた安全性評価・審議の支援、評価・試験戦略の策定に必要な情報収集の効率化やAOP開発に役立つことを目的とする。

B. 研究方法

B.1. 化学リスク研究事業総合報告書の調査

以下の平成30年度開始の厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業〔公募型〕計4課題の30年度報告書を入手して、毒性エンドポイントと解析の対象化学物質、評価系の構築状況ならびに試験結果を精査してExcel形式で整理した。さらに、各研究課題の分担研究について、AOPの構築とテストガイドライン化へ向けた位置づけを整理し、俯瞰する図をPowerPoint形式でまとめた。(http://mhlw-grants.niph.go.jp/niph/search/NIFL00.do)。

1. 平成30年度 化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づくMulti-ImmunoTox assay (MITA) による予測性試験法の確立と国際標準化 (H30-化学-一般-001)
2. 平成30年度 家庭用品化学物質が周産期中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究 (H30-化学-一般-003)
3. 平成30年度 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案 (H30-化学-一般-004)
4. 平成30年度 血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価に資する研究 (H30-化学-一般-002)

C. 研究結果および考察

C1. 各研究事業における新規有害性評価系の開発状況と AOP 開発へ向けた課題

各研究事業の分担研究ごとに、以下の項目 1) 各分担研究課題、2) 目的、3) 研究対象物質、4) 材料と方法、5) 結論、を設定し情報を整理した (4 研究課題、24 分担研究)。表 1 に一例を示す。さらにそれらを総合して AOP 開発へ向けた位置づけを整理し、課題を考察した。

“化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づく Multi-ImmunoTox assay (MITA) による予測性試験法の確立と国際標準化”においては、まず、化学物質の免疫毒性データの作成を国際協力により進めている。25 物質のデータ集積を行い、それらを *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* データに分類した。その結果、各化学物質の大凡の免疫毒性 profile が俯瞰可能となった。MITA は、T 細胞および単球のサイトカイン転写調節に及ぼす化学物質の影響をレポーター遺伝子の発光を利用して評価する *in vitro* 免疫毒性評価試験法である。そのうち IL-2 Luc アッセイについては、プロトコールならびにクライテリアの改訂によるバリデーション研究の再評価が進んでいる。さらに、転写誘導抑制を指標とした IL-1 Luc assay については、Phase 0 で国際バリデーション実行委員会にて選定した 3 物質について、3 施設間で再現性を確認し、Phase I で同委員会にて選定した 5 化学物質をコード化し施設内再現性を検証している。なお、免疫毒性の AOP 開発は、“OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究”で実施中である。

“家庭用品化学物質が周産期の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究”では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦 (胎児) や小児をシグナル異常に脆弱な集団と位置づけ、生活環境レベルでの低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響を検討している。平成 30 年度は、(1) 発生発達期にかけてのペルメトリンの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析と、(2) 発生発達期にかけての塩化トリブチルスズの低用量長期飲水投与による成熟後の中枢神経系への影響解析を実施している。図 2(A)には、本研究事業の各分担研究の役割分担を俯瞰する図をまとめた。各分担研究で対象とする被験物質を共通化し、遺伝子発現プロファイル、DNA メチル化影響など分子レベルでの解析および脳神経回路イメージング解析、神経幹細胞動態解析などの神経科学的解析により、低用量化学物質の周産期暴露による成熟後マウスの行動様式への影響の機序について体系的に解明を進めており、遅発性毒性の評価系構築を進めている。OECD では近年新しい *in vivo* 毒性試験の公定化は積極的ではないとされるが、*in vitro* 試験への代替が困難な遅発性毒性評価系について、国際的なガイドライン作出へ向けた情報発信を行っている。

“生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案”では、(1) ナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化、(2) AOP の確立、(3) 毒性試験データベースの作成、(4) *in silico* 生体影響予測を組合せたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の構築を目指

している。図 2(B)には、本研究事業の各分担研究の役割分担を俯瞰する図をまとめた。ナノマテリアルは種類が多いため、それらを用いた多面的な分担研究が進められている。しかし、AOP の開発および *in silico* 手法を組合せた統合的評価方法の確立を加速化するためには、他の研究事業のように、被験物質の共通化、毒性エンドポイントの絞り込み、*in vivo* 毒性との関連付けが課題となる可能性がある。

“血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価に資する研究”では、化学物質ばく露後のマウスの血液中の核酸のうち、エクソソーム RNA の網羅的解析により、標的臓器を特定し、更に毒性発現機序の解明を目指すことで、化学物質の「次世代型」有害性評価による迅速化、高度化および標準化を行うことを目的としている。新規の研究事業であり、平成 30 年度は、マウス血液からのエクソソーム RNA 単離の標準化を行った。さらに、化学構造の基本構造は同じであるが、側鎖の違いなどによりその毒性の強さや発現する臓器に違いがあるベンゾトリアゾール類 5 物質について、次世代シーケンス解析を実施した。本研究は基礎研究の段階であるが、将来、迅速な有害性評価系としての利活用、AOP 構築を検討するとなれば、分子マーカーと *in vivo* の臓器毒性の因果関係を明確化することが課題のひとつとして想定される。

各研究の AOP 構築へ向けた共通の課題として、分子開始イベント (Molecular Initiating Event, MIE) 情報の不足が挙げられる。MIE は化学物質と生体分子との相互作用により、毒性発現に至る最初の引き金となる反応で

ある。OECDでのAOP開発においては必須の情報であり、例えば”Histone deacetylase inhibition leading to testicular toxicity” (AOP212)のように、MIEに関する情報はAOPのタイトルに含められる。AOP開発の促進のためには、化学物質の毒性発現に寄与する標的分子を効率的に同定する研究手法の開発が求められる。

AI-based Chemical Safety Assessment Forward Evolution platform (AI-CSAFE)は、国衛研が長年にわたって整備してきた信頼性の高い毒性試験データを統合したビッグデータベースと、医薬品・食品・化学物質3分野にまたがるレギュラトリーサイエンスに基づく安全性評価の専門的知見並びに高精度の安全性研究の経験とをAIを活用し統合させることを目指した、現在開発中の安全性予測支援プラットフォームである。その共通基盤としてデータベースの充実に注力している。リスク評価書やその引用文献に加えて、AOP-Wikiに登録されているKey Eventに関連した文献情報をAI-CSAFEの情報収集源として追加することを検討する。

D. 結論

毒性等情報収集では、厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業(公募型)で実施された成果を、IATAのコンセプトに基づいた安全性評価やその基盤となるAOP開発に役立てるため、年次報告書を精査した。各研究課題の分担研究について、特にAOP開発へ向けた位置づけを整理し、課題を考察した。

E. 研究発表

E.1. 論文発表

1. Jojima K, Yamada T, Hirose A. Development

- of a hepatotoxicity prediction model using *in vitro* assay data of key molecular events. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2019, 6, 327-32.
2. Inoue K, Suzuki H, Yamada T. Comprehensive toxicity evaluation of cyclopentyl methyl ether (CPME) for establishing a permitted daily exposure level. *Fundam Toxicol Sci.* 2019, 6, 145-165.
 3. Yamada T, Matsumoto M, Miura M, Hirose A. Case study on the use of integrated approaches to testing and assessment for testicular toxicity of ethylene glycol methyl ether (EGME)-related chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Series on Testing & Assessment. 2019, No. 308. 1-75.
 4. Patlewicz G, Lizarraga LE, Rua D, Allen DG, Daniel AB, Fitzpatrick SC, Garcia-Reyero N, Gordon J, Hakkinen P, Howard AS, Karmaus A, Matheson J, Mumtaz M, Richarz A, Ruiz P, Scarano L, Yamada T, Kleinstreuer N. Exploring current read-across applications and needs among selected U.S. Federal Agencies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2019, 106, 197-209.
 5. Tachibana K, Kass GEN, Ono A, Yamada T, Tong W, Doerge DR, Yamazoe Y. A Summary Report of FSCJ Workshop "Future Challenges and Opportunities in Developing Methodologies for Improved Human Risk Assessments". *Food Safety.* 2019, 7, 83-89.
 6. 山田隆志, 足利太可雄, 小島肇, 広瀬明彦. AOP (Adverse Outcome Pathway; 有害性発現経路) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2020, 140, 481-484.
 7. 田邊思帆里, 広瀬明彦, Maurice Whelan, 山田隆志. 遺伝子ネットワーク解析による分子パスウェイ解明及び AOP 開発状況について. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2020, 140, 485-489.
- E.2. 学会発表
1. Case Study on the Use of Integrated Approach to Testing and Assessment for Testicular Toxicity of Ethylene Glycol Methyl Ether (EGME)-Related Chemicals, Yamada, T., Matsumoto, M., Miura, M., Hirose, A. EU-ToxRisk workshop on NAM-supported read-across: from case studies to regulatory guidance in safety assessment (2019.5.20, Espoo, Finland)
 2. Current status of development and improvement of *in silico* approaches for regulatory chemical safety assessment in NIHS. Yamada, T., Honma, M., Hirose, A. 第46回日本毒性学会学術年会 (2019.6.27, 徳島)
 3. データベースを活用した神経毒性の *in silico* 予測手法の開発, 大野彰子, 山田隆志, 広瀬明彦, 第46回日本毒性学会学術年会 (2019.6.27, 徳島)
 4. 水道水中の汚染化学物質に対する亜急性参照値の導入, 松本真理子, 川村智子, 井上薫, 山田隆志, 広瀬明彦, 第46回日本毒性学会学術年会 (2019.6.27, 徳島)
 5. 食品用器具・容器包装材料のポジティブリスト化に向けた安全性評価: 脂肪酸類のグループ評価, 磯貴子, 松本真理子, 鈴木洋, 川村智子, 山田隆志, 井上薫, 杉山圭一, 森田健, 本間正充, 広瀬明彦, 第46回日本毒性学会学術大会 (2019.6.27, 徳島)
 6. Development of hepatotoxicity prediction model using *in vitro* assay data of the molecular key events. Yamada, T., Jojima, K.,

- Hirose, A. IUTOX 15th International Congress of Toxicology 2019.7.16, Honolulu, USA)
7. Hazard assessment of hydrazine, a possible migration contaminant from drinking water apparatus. Matsumoto, M., Igarashi, T., Inoue, K., Yamada, T., Hirose, A. 5th Congress of the European Societies of Toxicology (2019.9.11, Helsinki, Finland)
 8. Development of *in silico* prediction model for skin sensitization using the alternative tests dataset. Suzuki, M., Ambe, K., Tohkin, M., Yamada, T., Ashikaga, T. CBI学会 2019年大会 (2019.10.22-24, 東京)
 9. 化学物質のヒト安全性評価のための *in silico* アプローチの開発と活用, 山田隆志, 内閣府化学物質の安全管理に関するシンポジウムー化学物質の評価・管理に関する手法やツール等の活用状況ー (2019.11.28, 東京)
 10. 生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータの物質群毎の特徴の解析, 明関由里子, 吉田喜久雄, 石田誠一, 山田隆志, 第32回日本リスク学会年次大会 (2019.11.23, 東京)
 11. 化学物質のヒト健康リスク評価に対する *in silico* アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第47回構造活性相関シンポジウム (2019.12.12, 熊本)
 12. Construction of databases of environmental fate and ecotoxicity for the development of environmental risk evaluation system of pharmaceuticals. Hirose, A., Kobayashi, N., Kurimoto, M., Yamamoto, H., Ikarashi, Y., Yamada, T. Society of Risk Analysis 2019 Annual meeting (2019.12.9, Arlington, USA)
 13. Read-across case study on testicular toxicity of ethylene glycol methyl ether-related substances for the fourth cycle of OECD IATA Case Studies Project. Yamada, T., Matsumoto, M., Kawamura, T., Miura, M., Hirose, A. 59th Annual Meeting of Society of Toxicology (2020.3.19, Anaheim, USA)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

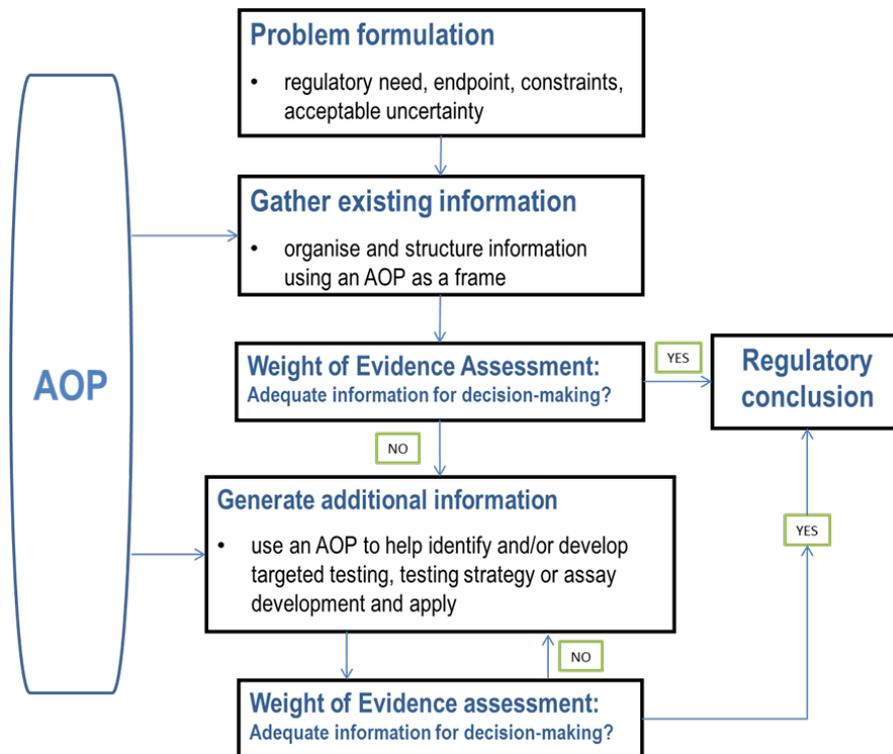


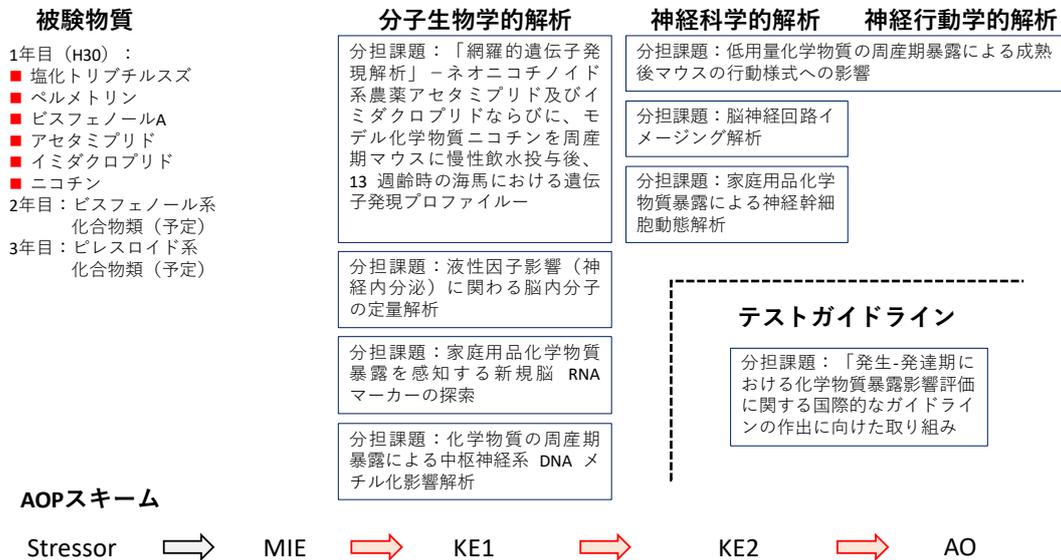
図 1 OECD が提唱する規制判断のための IATA のワークフロー

表 1 各研究事業の分担研究の情報整理の例

研究課題	化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づく Multi-ImmunoTox assay (MITA) による予測性試験法の確立と国際標準化 (H30-化学-一般-001)
分担研究課題	免疫毒性評価試験法 (Multi-ImmunoTox assay) 国際標準化に向けた評価法の検討
目的	MITA 試験法確立と OECD ガイドライン化: TGCHAC-4A 細胞を用いた試験法の確立を目指し、バリデーションの技術移転性の確認 (Phase0) および Phase1 試験の実施
研究対象物質	Phase 0 : Dapsone, Diethanolamine, p-Nitroaniline (国際バリデーション実行委員会にて選定) Phase 1 : 1 セット 5 種類のコード化した被験物質 3 セット (同委員会にて選定)
材料	IL-1 β と内部標準としての G3PDH プロモーターに SLG および SLR ルシフェラーゼ遺伝子をそれぞれ繋いだ人工染色体発現ベクターを THP-1 細胞に導入した 2 色発光細胞株 TGCHAC-4A (THP-G1 β)
方法	免疫毒性試験法における細胞培養、被験物質調製及び添加、及びルシフェラーゼアッセイ、試験結果の判定基準等については Multi-Immuno Tox Assay protocol 案 Ver.007E (Phase0) および Ver.008E (Phase1) に準ずる。発光の計測には多検体発光測定装置 Phelios を用いた。
結果	Phase 0 : バリデーション試験の実施 3 施設 (産総研健康工学研究部門、産総研バイオメディカル研究部門、東北大医学部皮膚科) の結果を比較検討した結果、良好な施設内、施設間再現性が得られ、技術移転性を確認できた。 Phase 1 : 5 物質全てにおいて、3 セットで同一の判定結果となり、良好な施設内再現性を確認した。一方、各セットにおける 1st-4th experience を確認すると、3 つの被験試薬 (MIB503、MIB601、MIB602) において、N; No effect と S; Suppression の両判定があった。
結論	プロトコルの改善や判定基準の再検証を進めることにより、より正確性、再現性を向上した試験法の確立が見込まれる。

(A)

家庭用品化学物質が周産期中枢神経系に及ぼす 遅発性毒性の評価系作出に資する研究 (H30-化学-一般-003)



(B)

生体影響予測を基盤とした ナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案 (H30-化学-一般-004)

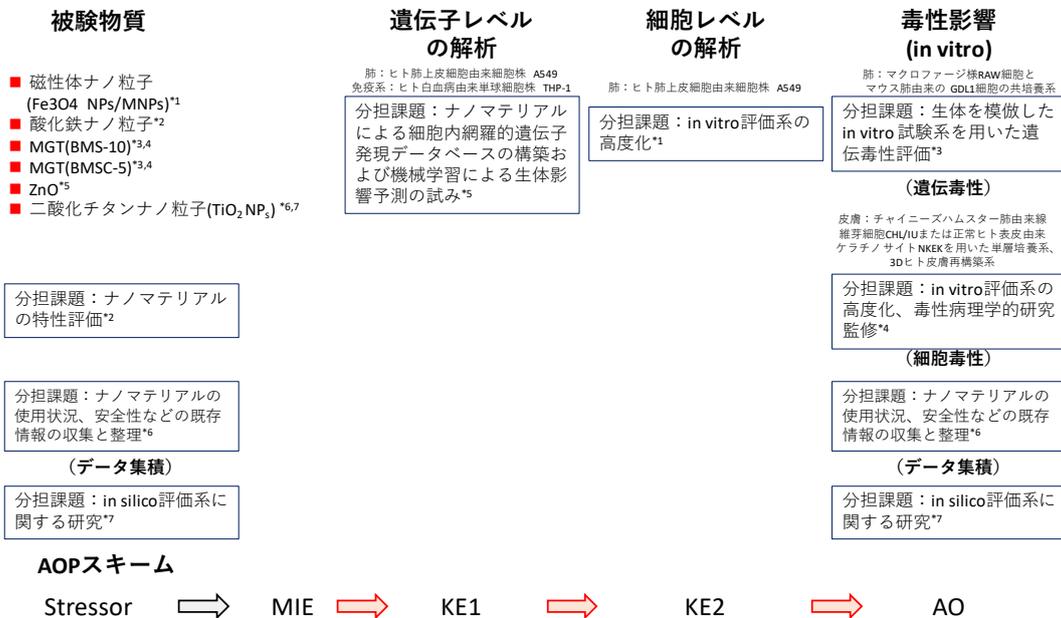


図2 各研究事業の構成とAOPスキームとの関係