

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**

(H27-化学-指定-003)

平成 28 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 西川 秋佳

平成 29(2017)年 4 月

目 次

． 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 西川 秋佳 -----	1
---	---

． 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 および AOP の開発 -----	10
小島 肇	
2 . 発がん性試験および生殖毒性試験の AOP 開発-----	102
小川久美子 西川 秋佳	
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-----	131
小野 敦	
4 . 光毒性試験の AOP および IATA の開発-----	202
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 山田 雅巳 -----	210
6 . Bhas 形質転換試験のプロトコル整備 -----	244
山影 康次	
7 . 国際状況の調査 -----	252
仲井 俊司	

. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----257

. 研究成果の刊行物・別刷り-----266

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長

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。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。

これまでの成果として、昨年度の形質転換試験 Bhas 法の OECD ガイダンス成立に引き続き、今年度の *in vitro* 皮膚感作性検出法 h-CLAT および *in vitro* 内分泌かく乱スクリーニング試験 AR STTA 法の OECD TG 成立に寄与した。また、眼刺激性試験代替法 Vitrigel-EIT および LabCyte Cornea-model EIT の TG 案を OECD に申請した。次年度は、*in vitro* 皮膚感作性試験 IL-8 Luc、発生毒性試験スクリーニング試験 Hand1-Luc EST および光安全性試験スクリーニング試験 ROS の OECD TG 化を継続して推進する。また、「免疫抑制」および「光安全性」に関する AOP を OECD に提出し、「細胞傷害による発がん」および「生殖発生毒性」の AOP 作成を継続する。OECD における「発がん性」、「皮膚感作性」および「眼刺激性」に関する IATA 作成にも関与し、「光安全性」および「免疫抑制」の IATA 作成についても引き続き検討する。

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 安全性予測評価部室長
小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

小野 敦 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
尾上誠良 静岡県立大学薬学部 薬物動態学 教授
山田雅巳 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部室長

山影康次 一般財団法人 食品薬品安全センター-秦野研究所 研究開発部長
仲井俊司 一般社団法人 日本化学工業協会 化学品管理部長

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) セミナーの開催 (小島):
OECD公認のAOPセミナーを開催した。
- (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案(事例研究)を作成し、OECDに提案した。

(3) 発がん性 (小川、西川):

PubMedなどで文献調査を行い、実験動物に鼻腔発がんを誘発する化学物質をリストアップし、各々の物質について、遺伝毒性の評価状況、反復投与によって誘発される異形成、過形成、化生、炎症、萎縮などの初期の病理病変の種類、および誘発されるがんの組織型及び鼻腔内での部位等についてまとめ、データの関連性などについて考察した。

(4) 光安全性 (尾上、小島):

AOP案を作成し、OECDに提案した。

(5) 生殖発生毒性 (初期事象) (小島):

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案の作成を継続した。

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):

IATA案を作成するとともに、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。

(4) 皮膚感作性 (小島):

OECDで進められている皮膚感作性のIATAの公定化に協力した。

(5) 眼刺激性 (小島):

OECDで進められている眼刺激性のIATAの公定化に協力した。

B-3) TGまたはガイダンス案の作成と提案

(1) *in vitro*皮膚感作性検出法 (小島):

ヒト樹状細胞株を用いた(h-CLAT: human Cell Line Activation Test)について、国内外の専門家とともに、TG成立を推進した。IL-8 Luc アッセイのTG案を作成した。

(2) *in vitro*発がん性スクリーニング (山影):

Bhas 42 CTA の培養開始 14 日目と培養終了 21 日目に WST-8 試薬により生細胞数(細胞活性)を測定し、その差を細胞増殖率とし、形質転換巢の形成された陽性ウェルと細胞増殖率のパターンをMB染色および陽性ウェルの出現パターンと比較した。

(3) *in vitro* 内分泌かく乱スクリーニング(小野): アンドロゲン受容体転写活性化試験(AR STTA)のTG成立を推進した。エストロゲン受容体転写活性化試験(ER STTA)関連として、JaCVAM 内分泌かく乱試験法資料編纂委員会で評価報告書を作成した。新規 *in chemico* 皮膚感作性試験(ADRA)の多施設検証研究を実施した。

(4) 発生毒性試験スクリーニング(小島): Hand1-Luc EST (Embryonic Stem cell Screening)の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(尾上): 光毒性反応機序の解明のために被験物質として benzophenone 誘導体(BZPs)6種を選択し、UVスペクトル解析、ROS assay、経皮的カセットドージング薬物動態試験、3T3 NRU PT および *in vivo* 光毒性試験を実施した。

(6) 遺伝毒性(山田): TG490に基づいて、共同研究用のプロトコールを作成し、実施機関に配布した。馬血清については、DONOR HORSE SERUMについてロット確認の後、同一ロットを実施機関に配布した。試験には、2つのカルチャーを並行して用い、被験物質として、代謝活性化系非存在下でメチルメタンスルホン酸(MMS)、代謝活性化系存在下で、無水シクロホスファミド(CP)を用いた。

(7) 眼刺激性試験代替法(小島): Vitrigel-EITおよびLabCyte Cornea-model EITのTG案をOECDに申請するため、SPSFを作成した。

B-4) 情報収集(仲井)

OECDの試験法(ヒト健康影響評価、環境影響評価)の最新状況について、OECDの化学品合同会合の第55回会合(2016年11月開催)の活動計画等に基づいて調査した。また、AOP、

IATA開発関連の海外主要機関の動向についても調査中である。

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。ボランティアおよびヒト組織は使用しない。これらのことから、倫理的問題は無いと考える。

C. 研究結果

C-1) AOP案の作成と提案

(1) セミナーの開催:

平成28年11月に一般の方を対象にOECD公認のAOPセミナーを唐津で開催し、国内外から約30名の参加者を集めた。

(2) 免疫抑制:

Binding of FK506-binding protein 12 (FKBP12) by calcineurin inhibitors leading to immunosuppressionに関するAOPを作成し、OECDで内部評価が実施された。

(3) 発がん性:

化学物質により誘発される鼻腔発がん過程の経路を腫瘍の組織型、動物種および投与経路別に文献情報を収集し、解析した。解析のために情報を収集した化学物質は、ラット41物質、マウス5物質、ハムスター8物質であった。鼻腔発がん過程の主要な経路について得られた結果を扁平上皮乳頭腫(ラット及びマウス) 扁平上皮がん(ラット) 腺腫(ラット、マウス及びハムスター) 腺がん(ラット) 腺扁平上皮がん(ラット) 神経上皮がん(ラット) 血管腫(マウス)および血管肉腫(マウス)について、吸入及び非吸入経路による曝露を考慮してまとめた。

(4) 光安全性:

ROS (Reactive Oxygen Species) induces phototoxic reactionsのAOPをOECDに提案し、OECDで了承された。

(5) 生殖発生毒性:

Hand1 gene dysregulation leading to embryotoxicityのAOPをOECDに提案し、了承された。

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月および2017年3月開催のOECD 専門家会議に出席した。
- (2) 光安全性：
IATA 案に資するため、AOP および TG 案の作成を継続した。
- (3) 免疫抑制：
OECD 事務局が進めている IATA ガイダンス および皮膚感作性ガイダンスの作成に引き続き協力した。
- (4) 皮膚感作性：
OECD 事務局が作成した皮膚感作性 IATA は平成 28 年 6 月の OECD Joint meeting での承認を経て、同年 11 月に HP で公開された。
- (5) 眼刺激性：
平成 28 年 11 月に OECD 本部(パリ)で開催された OECD 眼刺激性試験専門家委員会に参加し、IATA の内容を議論した。

C-3) TGまたはガイダンス案の作成と提案

- (1) *in vitro*皮膚感作性検出法：
2016年9月に、ヒト樹状細胞株を用いた検出法(h-CLAT: human Cell Line Activation Test)のTG成立に寄与した。また、IL-8 Luc アッセイのTG化を継続して推進した。
- (2) *in vitro*発がん性スクリーニング：
同一プレートの細胞増殖率の結果とMB染色の結果を比較したところ、ウェル側面に形質転換巣が形成されたウェルを陽性ウェルとすると、MBの吸光度が高いウェルはほぼ陽性ウェルとなり、これまでの結果と同様にMBの高い吸光度を示すウェルでは形質転換巣が形成されていることが確認された。また、WST-8前処理することにより、形質転換率が低下する傾向が認められた。
- (3) *in vitro*内分泌かく乱スクリーニング：
本研究班で提案してきたEcoScreen細胞を用いたAR STTA法は、2016年7月にOECDガイドライン(TG458)として成立した。ADRA法については、修正SOPを用いてフェーズ2試験を実施中である。ER STTA法に関する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が作成された。

(4) 発生毒性試験スクリーニング：

OECDに提出したHand1-Luc ESTのTG案に対する専門家からのコメントが集約されるのを見守った。

(5) 光安全性試験スクリーニング：

全てのBZPsはUVA/B領域において高い光吸収を示し、高い光励起性を有していた。6種のBZPsのうち、4種は高い光反応性を有し、2種は光反応性が低かった。BZPs経皮共投与後の薬物動態学的解析の結果、3種は高い皮膚曝露リスクを示した。また、2種は強い*in vitro*/*in vivo*光毒性を示した。ROS assayのOECD TG案をOECDに提出した。

(6) 遺伝毒性：

チミジンキナーゼ(TK)突然変異体頻度の平均は、代謝活性化系非存在下、溶媒対照で $8.2(X10^{-6})$ 、陽性対照物質のMMSで $44.2(X10^{-6})$ であった。代謝活性化系存在下では、溶媒対照で $6.3(X10^{-6})$ 、陽性対照物質のCPで $32.6(X10^{-6})$ であった。平均値としては、いずれも陽性対照物質が溶媒対照の約5倍の値を示し、十分な高頻度が得られていたが、ばらつきが大きい2機関と、誘発が不十分な他の機関とに二極化していた。

(7) 眼刺激性試験代替法：

Vitrigel-EITおよびLabCyte Cornea-model EITのTG案に関するSPSFをOECDに提出した。

C-4) 情報収集

IATA関連のガイダンス文書が多く作成されているが、AOP関連のTGやガイダンスには顕著な動きはみられなかった。

D. 考察

これまでの特記すべき成果として、昨年度の形質転換試験Bhas法のOECDガイダンス成立に引き続き、今年度の*in vitro*皮膚感作性検出法h-CLATおよび*in vitro*内分泌かく乱スクリーニング試験AR STTA法のOECD TG成立に寄与した。いずれも我が国で開発された試験法である。今後、次年度にかけて、*in vitro*皮膚感作性試験IL-8 Luc、発生毒性試験スクリーニング試験Hand1-Luc ESTおよび光安全性試験スクリーニング試験ROSのOECD TG化を目指す。

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引き続き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。現在までに、「免疫抑制」および「光安全性」に関するAOPをOECDに提出し、「細胞傷害による発がん」および「生殖発生毒性」のAOP作成を継続している。OECDにおいて承認されたAOPはまだ6つと提案数のごく一部に過ぎないことから、承認までの道のりはそれほど平坦ではないと思われるが、本研究班の研究期間内に1つでも多くのAOP最終化を目指したい。

IATAについては、OECDで承認されているのが皮膚感作性に関するものだけであり、道はさらに険しいと言わざるを得ない。本研究班においても、OECDで検討されている「非遺伝毒性発がん性」に関するIATA作成作業に参画しているが、非遺伝毒性発がん性の定義や非遺伝毒性発がん性物質の閾値について十分なコンセンサスが得られているとは言えない。「光安全性」および「免疫抑制」のIATAについても引き続き検討していくが、IATAの作成過程そのものが試行錯誤の段階にあることから、難作業が予想される。本研究班としては、困難な作業を通じて、IATA作成の基礎を築いていくことが重要と考えている。

F . 研究発表

F- 1) 論文発表

- 1) Hibi D, Yokoo Y, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Kijima A, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T. Lack of genotoxic mechanisms in early-stage furan-induced hepatocellular tumorigenesis in gpt delta rats. J Appl Toxicol. 2017 Feb;37(2):142-149.
- 2) Hirata T, Cho YM, Toyoda T, Akagi JI, Suzuki I, Nishikawa A, Ogawa K. Lack of in vivo mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of gpt delta rats administered singly or in combination. J Appl Toxicol. 2016
- 3) Suzuki, I., Cho, Y-M., Hirata, T., Toyoda, T., Akagi, J., Nakamura, Y., Park, E-Y., Sasaki, A., Nakamura, T., Okamoto, S., Shiota, K., Suetome, N., Nishikawa, A. and Ogawa, K.: 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (*Raphasatin*) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats, Journal of Toxicologic Pathology, 2016, 29: 237-246.
- 4) Suzuki, I., Cho, Y-M., Hirata, T., Toyoda, T., Akagi, J., Nakamura, Y., Sasaki, A., Nakamura, T., Okamoto, S., Shiota, K., Suetome, N., Nishikawa, A. and Ogawa, K.: Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (*Raphasatin*) in the rat urinary bladder without genotoxicity, Journal of Applied Toxicology, 2017, 37: 485-494.
- 5) Matsushita, K., Toyoda, T., Inoue, K., Morikawa, T., Sone, M. and Ogawa, K.: Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat, Journal of Toxicologic Pathology, 2017, 30: 57-62.
- 6) Toyoda, T., Cho, Y-M., Akagi, J., Mizuta, Y., Matsushita, K., Nishikawa, A., Imaida, K. and Ogawa, K. Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic toxicity induced by 3-monochloropropane-1,2-diol. Journal of Toxicologic Sciences, 2017, 42: 1-11.
- 7) Nonaka, M., Amakasu, K., Saegusa, Y., Naota, M., Nishimura, T., Ogawa, K. and Nishikawa, A. Non-neoplastic lesions found only in the two-year bioassays but not in shorter toxicity studies of rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2017, 86 : 199– 204.
- 8) Cho, Y-M., Hasumura, M., Imai, T., Takami S., Nishikawa A. and Ogawa, K. Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water. Journal of Applied Toxicology, (in press)
- 9) 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)
- 10) 小島 肇: 皮膚毒性評価に関する最近の話題, 評価方法, 第 17 回日本毒性学会生涯教育講習会テキスト, 89-108 (2016)
- 11) Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S, Curren R, Desprez B, Eskes C, Griesinger C, Guo J, Hill E, Roi AJ, Kojima H, Li J, Lim CH, Moura W, Nishikawa A, Park H, Peng S, Presgrave O, Singer T, Sohn SJ, Westmoreland C, Whelan M, Yang X, Yang Y, Zuang V.: International Harmonization and

- Cooperation in the Validation of Alternative Methods, *Advance in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 856: 343-386
- 12) 小島 肇 : 皮膚細胞を用いた最新の in vitro 皮膚安全性評価研究, 月刊コスメティックステージ, 12, 1-4 (2016)
- 13) 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 27 年度報告書. AATEX-JaCVAM, 5(1), 45-56 (2016)
- 14) Yamamoto N, Kato Y, Sato A, Hiramatsu N, Yamashita H, Ohkuma M, Miyachi E, Horiguchi M, Hirano K, Kojima H: Establishment of a new immortalized human corneal epithelial cell line (iHCE-NY1) for use in evaluating eye irritancy by in vitro test methods, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*. 52(7), 742-748 (2016)
- 15) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T: Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals, *J Appl Toxicol*. 36(8): 1025-1037 (2016).
- 16) 小島 肇: 皮膚毒性評価に関する最近の話題, 評価方法, 第 17 回日本毒性学会生涯教育講習会テキスト, 89-108 (2016)
- 17) Uchino T, Kuroda Y, Ishida S, Yamashita K, Miyazaki H, Oshikata A, Shimizu K, Kojima H, Takezawa T, Akiyama T, Ikarashi Y: Increase of 2-integrin on adhesion of THP-1 cells to collagen vitrigel membrane, *Biosci Biotechnol Biochem*. 4: 1-6 (2016)
- 18) Marx U, Andersson TB, Bahinski A, Beilmann M, Beken S, Cassee FR, Cirit M, Daneshian, Fitzpatrick S, Frey O, Gaertner C, Giese C, Griffith L, Hartung T, Heringa MB, Hoeng J, Jong WH, Kojima H, Kuehl J, Leist M, Luch A, Maschmeyer I, Sakharov D, Sips AJAM, Steger-Hartmann T, Tagle DA, Tonevitsky A, Tralau T, Tsyb S, Stolpe A, Vandebriel R, Vullo P, Wang J, Wiest J, Rodenburg M, Roth A: Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing. *ALTEX*. 33(3): 272-321 (2016)
- 19) Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S, Curren R, Desprez B, Eskes C, Griesinger C, Guo J, Hill E, Roi AJ, Kojima H, Li J, Lim CH, Moura W, Nishikawa A, Park H, Peng S, Presgrave O, Singer T, Sohn SJ, Westmoreland C, Whelan M, Yang X, Yang Y, Zuang V.: International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods, *Advance in Experimental Medicine and Biology*. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing, Springer, 2016, pp.343-386
- 20) Kojima H., Safety Assessment of Cosmetic Ingredients, *COSMETIC SCIENCE AND TECHNOLOGY: THEORETICAL PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, Elsevier 2017; 793-803
- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Hideyuki Sato, Hayato Nishida, Morihiko Hirota, Takao Ashikaga, Anne Marie Api, David Basketter, Yoshiki Tokura: Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments.; *Journal of Dermatological Sciences*, 85(1): 4- 11 (2017)
- 24) Hiroto Ohtake, Yukiko Suzuki, Masashi Kato, Yoshiki Seto, Satomi Onoue [Photosafety testing of dermally-applied chemicals based on photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data] *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1): 237- 8 (2016)
- 25) Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, Satomi Onoue: Development of fluorometric reactive oxygen species assay for photosafety evaluation; *Toxicology in Vitro*, 34: 113- 9 (2016)
- 26) Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Sharon Shui Yee Leung, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue [Development

- of an Improved Inhalable Powder Formulation of Pirfenidone by Spray-Drying: In Vitro Characterization and Pharmacokinetic Profiling] *Pharmaceutical Research*, 33(6): 1447- 55 (2016)
- 27) Satomi Onoue, Hiroto Ohtake, Gen Suzuki, Yoshiki Seto, Hayato Nishida, Morihiko Hirota, Takao Ashikaga, Hirokazu Kouzuki: Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens.; *Toxicology in Vitro*, 33: 147- 52 (2016)
- 28) Sugiyama K, Yamada M, Awogi T, Hakura A, The strains recommended for use in the bacterial reverse mutation test (OECD guideline 471) can be certified as non-genetically modified organisms. *Genes and Environ.*, 2016, 38, 2.
- 29) Wada, K., Kato, Y., Ohnuma-Koyama, A., Takahashi, N., Yamada, M., Matsumoto, K.: 2-Nitroanisole-induced oxidative DNA damage in *Salmonella typhimurium* and in rat urinary bladder cells, *Mutation Research*, 816, 18-23, 2017.
- 30) Kimoto, T., Horibata, K., (省略30名), Yamada, M., and Honma, M.: The PIGRET assay, a method for measuring Pig-a gene mutation in reticulocytes, is reliable as a short-term in vivo genotoxicity test: Summary of the MMS/JEMS-collaborative study across 16 laboratories using 24 chemicals, *Mutation Research*, 811: 3-15, 2016.
- 31) Tsuji S., Ohbayashi T, Yamakage K., Oshimura M., Tada M.: A Cytoplasmic form of *Gaussia luciferase* provides a highly sensitive test for cytotoxicity, *PLoS One*. 2016 May 26;11(5):e0156202.
- F-2) 学会発表
- 1) 小川久美子: 前向き評価におけるがん原性評価文書(CAD)に対する中間報告. 第43回日本毒性学会学術年会、名古屋、2016年6月.
- 2) 小川久美子、高須伸二: 新規臭素系難燃剤の毒性影響について. 環境科学会 2016年會、横浜、2016年9月. Kojima H: View and suggestion about how to promote progress and cooperation in Asia, 2016 上海化粧品科学フォーラム (2016.4) (Shanghai, China)
- 3) 小島 肇: 国際機関で承認されている in vitro 試験法, 日本組織培養学会 第89回大会 (2016.5)(大阪)
- 4) 山本直樹, 平松範子, 加藤義直, 佐藤 淳, 中田 悟, 松井優子, 真野陽介, 原 和宏, 増蘭夕紀子, 中村政志, 小島 肇: ヒト不死化角膜上皮細胞を用いた三次元角膜モデルの有用性, 日本組織培養学会 第89回大会 (2016.5)(大阪)
- 5) 小島 肇: 医薬品に係わる新添加剤の安全性評価における諸課題, 第43回日本毒性学会学術年会 (2016.6)(名古屋)
- 6) 小島 肇: 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的有害性試験法の開発: Arch-Tox」の計画概要, 第43回日本毒性学会学術年会 (2016.6)(名古屋)
- 7) 伊藤浩太, 榊原隆史, 古川正敏, 奥村宗平, 越田 美, 川村公太郎, 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 (BCOP法: 眼刺激性代替法試験) における角膜病理学的検査により弱刺激性物質の評価, 第43回日本毒性学会学術年会 (2016.6)(名古屋)
- 8) Kojima H: Japanese activities for alternative to animal testing around the world, 6th Workshop & Training of Alternative Methods (2016.6) (Guangzhou, China)
- 9) 小島 肇: 皮膚毒性評価に関する最近の話題, 評価方法, 第17回日本毒性学会生涯教育講習会テキスト (2016.7)(名古屋)
- 10) 小島 肇: 代替法試験の基礎から最新知見まで, マツモト交商 安全性試験セミナー (2016.7) (東京)
- 11) 小島 肇: 動物実験代替法の国内外の動向, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム第11回教育セミナー (2016.7)(東京)
- 12) Kojima H: Strategy on the OECD TG in Japan, 13th Annual meeting of Korean Society for Alternatives to Animal Experiments (2016.8) (Seoul, Korea)
- 13) Kojima H: The current status of non-animal test methods and prospects for Asian cooperation, 17th Annual Congress of European Society for Alternative to Animal Testing (2016.8) (Linz, Austria)

- 14) 小島 肇: AOP の考え方, OECD による AOP プロジェクトの目的, 経緯と最終的なゴール, 第 23 回日本免疫毒性学会学術年会(2016.9)(北九州, 福岡)
- 15) Kojima H: International validation study on Hand1-Luc Embryonic stem cell test (Hand1-Luc EST): A reporter gene assay using engineered mouse ES cells evaluate embryotoxicity in vitro, 5th Annual meeting of American Society for Cellular and Computational Toxicology (2016.9) (North Carolina, USA)
- 16) 小島 肇: JaCVAM における 3Rs 原則と動物実験代替法, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 17) 藤田正晴, 笠原利彦, 山本裕介, 渡辺真一, 菅原経継, 若林晃次, 田原 宥, 堀江宣行, 藤本恵一, 高橋寛明, 黒川嘉彦, 小野 敦, 小島 肇: Cys および Lys 誘導体を用いた皮膚感作性試験代替法 (ADRA 法) のバリデーション研究のための技術移転結果報告, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 18) 松成夏美, 九十九英恵, 謝 丹, 岡 朱音, 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 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 19) 内野 正, 宮崎 洋, 山 邦彦, 竹澤俊明, 小島 肇, 秋山卓美, 五十嵐良明: 改良型コラーゲンビトリゲル膜チャンバーでの THP-1 細胞の細胞接着性及びサイトカイン産生量, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 20) VO P.T.H, Narita K, Nakagawa F, Kojima H, Itagaki H: Reducing false negative results in an in vitro skin sensitization test: The human cell line activation test, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11)(福岡)
- 21) 小島 肇: 医薬品食品領域での動物愛護管理法の現在と未来, NPO 法人動物実験関係者連絡協議会 第 5 回シンポジウム 「動物愛護管理法」の過去・現在・未来 (2016.12)(東京)
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) 世戸孝樹, Hak-Kim Chan, 尾上誠良: 体内動態制御により患者の QOL 改善に寄与する新規 pirfenidone 粉末吸入製剤の開発. 2016 年, 第 32 回 日本 DDS 学会学術集会
- 26) 世戸孝樹, 佐藤秀行, 尾上誠良: 安全性向上を指向した pirfenidone の DDS 研究. 2016 年, 第 2 回日本医薬品安全性学会学術大会
- 27) Yoshiki Seto, Satomi Onoue: An improved reactive oxygen species assay for photosafety assessment of chemicals with limited aqueous solubility. 2016, EUSAAT 2016, 17th Annual Congress of EUSAAT
- 28) Yosuke Iyama, Hiroto Ohtake, Hideyuki Sato, Yoshiki Seto, Satomi Onoue: Verification study on applicable domain of photosafety assessment by combined use of photochemical and pharmacokinetic data. 2016, 31st JSSX Annual Meeting
- 29) 尾上誠良: 光毒性リスク評価の開発と課題, 2016 年, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会
- 30) 山田雅巳, 森田健: 遺伝毒性評価における染色体異常試験の要否を問う, 日本環境変異原学会第 45 回大会 シンポジウム, 2016 年
- 31) Yamada, M., Matsuda, S., Matsuda, T.: Application of single-molecule real-time (SMRT™) sequencing technology to mutation assay, 45th European Environmental Mutagenesis & Genomics Society, 2016
- 32) 須藤鎮世, 工藤季之, 白菊敏之, 小枝暁子, 小松佳奈, 関博, 山影康次, 山本美佳, 若田明裕, 松元郷六, 森田健: 変異原の閾値に関する共同研究: 提案と予備試験結果, 2016 年, 第 45 回 日本環境変異原学会

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) OECD Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation, Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)
- 2) OECD Test No. 458: Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals (AR STTA)

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

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）の作成を進める一方で、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日本発の試験法について、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。

当該年度は日本免疫毒性学会の有志とBinding of FK506-binding protein 12 (FKBP12) by calcineurin inhibitors leading to immunosuppressionに関するAOPを作成し、OECDの専門家グループに内部評価を依頼した。ROS (Reactive Oxygen Species) induces phototoxic reactions およびHans1 gene dysregulation leading to embryotoxicityのAOP作成提案をOECDに行い、了承された。また、平成28年11月に一般の方を対象にOECD公認のAOPセミナーを唐津で開催し、国内外から約30名の参加者を集めた。

一方、平成28年9月に*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を成立させることができた。皮膚感作性試験 IL-8 Luc アッセイおよび光安全性試験スクリーニング ROS アッセイのTG案をOECDに提出し、IL-8 Luc アッセイの成立に努めた。一方、生殖発生毒性試験代替法 Hand1 Luc EST、眼刺激性試験代替法 Vitrigel-EIT および LabCyte Cornea-model EIT のTG申請書をOECDに提出した。

キーワード：AOP、IATA、TG、OECD

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）

研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における
職名

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

小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部
部長

（アステラス製薬株式会社）
斉藤幸一 住友化学株式会社 生物環境科学研究
所

相場節也 東北大学医学系研究科・医学部・皮
膚科学分野教授

山影康次 一般財団法人 食品薬品安全センタ
ー 秦野研究所

尾上誠良 静岡県立大学 薬学部 薬物動態学分
野 教授

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日本発の試験法について、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、眼刺激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

B-1-1. 情報収集

AOPを統括するOECD EAGMST(Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics)に参加して、情報を収集した。

B-1-2. AOP勉強会

EAGMSTにて得られた情報を一般の方を対象に普及するため、OECD公認のAOPセミナーを唐津で開催した。

B-1-3. 免疫抑制のAOP

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。

B-1-4. 生殖毒性のAOP

住友化学株式会社の協力を得て、生殖毒性のAOPを作成した。

B-1-5. 光安全性のAOP

尾上分担研究所の協力を得て、光安全性のAOP作成をした。

B-2. IATAの作成と提案

B-2-1. 皮膚感作性

OECDで進められている皮膚感作性のIATAの公定化に協力した。

B-2-2)眼刺激性

OECDで進められている眼刺激性のIATAの公定化に協力した。

B-3. TGの作成と提案

B-3-1. 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。

B-3-2. *in vitro*皮膚感作性検出法 IL-8 Luc アッセイ

国内外の専門家とともに、IL-8 Luc アッセイのTG案を作成し、その成立に努めた。

B-3-3. 光安全性試験スクリーニング ROS (Reactive Oxygen Species) アッセイ

尾上分担研究所の協力を得て、ROS アッセイのTG案を作成した。

B-3-4. *in vitro*発がん性スクリーニング Bhas形質転換試験(Bhas法)

ガイダンスで生じた細胞のクロスコンタミ問題に対処し、GDの改訂に向け尽力した。

B-3-5. 生殖発生毒性試験Hand1 Luc EST

OECDに申請するHand1 Luc ESTのSPSF(Standard Project Submission Form)を作成した。

B-3-6. 眼刺激性試験代替法Vitrigel-EIT

OECDに申請するVitrigel-EITのSPSFを作成した。

B-3-7. 眼刺激性試験代替法LabCyte Cornea-model EIT

OECDに申請するLabCyte Cornea-model EITのSPSFを作成した。

B-3-8. アンドロジェンスクリーニングStably Transfected Transactivation to detect Androgen Receptor Agonists and Antagonists (AR STTA assays) : TG458

TG458に掲載されているChinese hamster ovary cell line (CHO-K1)細胞分与で生じた問題に対処するため、TGの改訂に向け尽力した。

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。これらのことから、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

C-1-1. 情報収集

平成28年6月にOECD本部(パリ)で開催されたOECD EAGMSTに電話会議で参加し、日本からの新規申請内容を伝えた(以下、(4)および(5)参照)。また、12月に開催された電話会議にて、日本発の免疫抑制に関するAOPをEAGMSTのメンバーにて内部評価するように依頼した。

なお、本年度、5つのAOPがOECDで正式に承認され、すでに承認されている皮膚感作性のAOPと合わせ、6つのAOPが承認されている。

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

C-1-2. AOP勉強会

平成28年11月14日に一般の方を対象にOECD公認のAOPセミナーを唐津市民開会で開催した。海外から2名の講師(Dr. Catherine WILLETT Humane Society of the United States / Humane Society International, USA および Dr. Kellie FAY US Environmental Protection Agency, USA)を招聘し、国内外から約30名の参加者を集めた。AOPの原案を作成した米国からの講師の説明は、参加者に好評であった。Dr. FAYの発表資料を添付資料1に示す。

C-1-3. 免疫抑制のAOP

日本免疫毒性学会 試験法評価委員会の協力を得て、“Binding of FK506-binding protein 12 (FKBP12) by calcineurin inhibitors leading to immunosuppression”に関するAOP案を作成し、AOP wikiに入力した。この案を添付資料2として示す。

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 Outcome (AO) 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(Key Event)やTGにつながる試験法の抽出ができると考えた。

現在、EAGMSTのメンバーにて内部評価が実施さ

れ、以下の指摘があった。

1. MIE (Molecular Initiation Event) を 1 化学物質に關与する事象ではなく、もっと一般的なものにすべきである。
2. A0 は一つにすべき、さらに、途中の KE もサイトカイン産生の抑制、と言うアバウトなものではなく、測定可能な具体的な事象にすべき (IL2 産生抑制とか) である。
3. KER (Key Event Relationship) に關する記載をペンディングにしていたので、これらについて追記する。
4. AOP を結合する、という目的を考慮して、KE の記載はより一般的なものとし、その A0 に特異的な現象等については、KER の方で記載すべきである。
5. カルシニューリン阻害を MIE にしてはどうかと提案しています。
6. MIE に影響を与える因子を、Chemical stressor として列挙する。
7. FK506 以外に、少なくともシクロスポリン A に關する情報も調べて追記する。
8. A0 発現に至る最終段階の記載がアバウトすぎる (KE との關連の記載が不十分)。

これらの指摘を受け、改定について作成グループで検討中である。

C-1-4. 生殖毒性の AOP

生殖毒性のマーカーとして住友化学株式会社が着目している Hand 1 遺伝子を MIE とした AOP の作成を OECD に提案し、EAGMST に認められた。来年度、AOP 案の作成に入る予定である。

C-1-5. 光安全性の AOP

光毒性のマーカーとして ROS を MIE とした AOP の作成を OECD に提案し、EAGMST に認められた。来年度、AOP 案の作成に入る予定である。

C-2. IATA の作成と提案

C-2-1. 皮膚感作性

OECD 事務局が作成している皮膚感作性の IATA は平成 28 年 6 月の OECD Joint meeting での承認を経て、同年 11 月に HP で公開された。

C-2-2. 眼刺激性

平成 28 年 11 月に OECD 本部 (パリ) で開催された OECD 眼刺激性試験専門家委員会に参加し、IATA の内容を議論した。平成 29 年 4 月の WNT での合意が見込まれている。

C-3. TG またはガイダンスの作成と提案

C-3-1. 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 TG は平成 28 年 4 月の OECD WNT 会議で承認され、同年 9 月に HP で公開された。最終的な TG を添付資料 3 に示す。

C-3-2. *in vitro* 皮膚感作性検出法 IL-8 Luc アッセイ

IL-8 Luc アッセイの開発者である東北大学 相場節也教授等と TG 案を作成し、OECD 事務局に平成 28 年 7 月に提出した。OECD での意見募集期間を経て、同年 11 月に開催された OECD 皮膚感作性試験専門家会議にて、本 TG 案が審議された。本会議で内諾を得た案について、WNT にて 2 回目の意見募集が実施された。

意見募集での主な指摘事項について 3 月の専門家会議にて以下のような議論がなされた。

1. 難水溶性物質への対策

本試験法は、難水溶性物質を溶解させるため、一般的な DMSO でなく、X-VIVO という溶解剤を用いている。しかも、このプロトコルでは被験物質を 20mg/mL となるように X-VIVO に加え、加温・超音波処理などの溶解操作後、遠心操作を加えて上澄みだけを段階希釈に用いることになっている。このプロトコルを用いることにより、DMSO を用いるよりも予測性が向上するというものである。

このプロトコルに対し、OECD の専門家からクレームがついた。陽性結果は受け入れられるが、陰性の場合、溶解性が低いがために陰性となった偽陰性を否定できないという理由である。ゆえに、陰性結果はすべて不採用にするという提案を受けた。最低でも、沈殿が除去された (難水溶性の) 陰性結果は採用できないという見解である。開発者の相場ら (すなわち、日本) がこの意見に同意せず、昨秋の専門家会議以降、抵抗が続いた。

結果として、Option 1 として、陰性結果で細胞毒性が 80% 以上認められない結果は採用できない。Option 2 として、難水溶性の陰性結果は採用できない。異例のことではあるが、以上の Option の選択

は決まっておらず、2017年のWNTに結論を委ねることになった。

2. 細胞の権利

本試験法に関するレポーター細胞の特許権は放棄されている。本来ならば、本細胞は公的な細胞バンクから供給されるべきである。相場らは本細胞を一企業でライセンス契約を付加して販売したいとの拘りを持っている。その理由として、2つのレポーター遺伝子の維持管理は簡単でなく、公的バンクには任せられないという理由である。

これに当たり、類似法の開発を促す性能標準を日本から提案することになった。

以上の問題が解決され、いずれかのoptionが選択されたTG案(添付資料4)が平成29年4月のOECD WNT会議で合意されることを目指している。

C-3-3. 光安全性試験スクリーニング ROS アッセイ

ROS アッセイの開発者である尾上分担研究者と共同でTG案を作成し、OECD事務局に平成28年9月に提出した。OECDでの意見募集が実施された。

C-3-4. *in vitro*発がん性スクリーニング Bhas法

Bhas細胞の起源はBalb/Cマウスではなく、swissマウスであることが医薬基盤・健康・栄養研究所の研究で明らかになった。経産省から意見書および改訂ガイダンス案がOECDに平成28年9月に提出されたことから、本内容を同年11月にパリで開催されたVMG-NA会議にて説明した。趣旨を説明し、ガイダンスの改訂に協力を得た。さらに追加で届いた細胞種の感度に関する英国やイタリアからの山影分担研究者らとコメントに対応した。

C-3-5. 生殖発生毒性試験Hand1 Luc EST

本試験法開発者の斎藤分担研究者らとともに、OECDにTGのSPSFを提出した。

C-3-6. 眼刺激性試験代替法Vitrigel-EIT

本試験法開発者の竹澤ら(国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構および関東化学株式会社)とともに、OECDにTG作成のSPSFを提出した。

C-3-7. 眼刺激性試験代替法LabCyte Cornea-model EIT

本試験法開発者の加藤ら(株式会社J-TEC)とともに、OECDにTG作成のSPSFを提出した。

C-3-8. アンドロジェンスクリーニングAR STTA assays

CHO-K1細胞の分与で生じた帰属権問題に対処するため、細胞の無料譲渡との記載のあるパラグラフを改訂したTG案を武吉ら(一般財団法人 化合物評価研究機構)とともに作成し、OECDに提案した。

3. 考察

本年度は昨年度に検討してきた日本発の皮膚感作性試験代替法h-CLATをOECD Test No. 442Eとして成立させることができた。さらに、主に、免疫抑制のAOP作成およびIL-8 Luc assayのTG成立を目指し、国際的な専門家と意見調整を繰り返し、成立の目途がついた。引き続き、上記2文書の成立を目指し、来年度成果として明示するべく、国際的な調整を進めていく所存である。

一方で、すでにOECDで成立した日本発の試験法であるBhas法やAR STTA assaysにおいても、用いられている細胞株で問題が生じている。成立したTGの管理に関しても、適切に解決していきたいと考えている。

4. 添付資料

- 1) AOPセミナー 講演資料
- 2) “Binding of FK506-binding protein 12 (FKBP12) by calcineurin inhibitors leading to immunosuppression”に関するAOP案
- 3) OECD Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation, *Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)*
- 4) OECD IL-8 Luc assay TG案

5. 研究発表

F-1. 論文発表

- 1) 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)

- 2) Yamamoto N, Kato Y, Sato A, Hiramatsu N, Yamashita H, Ohkuma M, Miyachi E, Horiguchi M, Hirano K, Kojima H: Establishment of a new immortalized human corneal epithelial cell line (iHCE-NY1) for use in evaluating eye irritancy by in vitro test methods, *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal*.2016; Aug;52(7):742-8
 - 3) Yamaguchi H, Kojima H, Takezawa T: Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals, *J Appl Toxicol*. 2016 Aug;36(8):1025-37.
 - 4) 小島 肇: 皮膚毒性評価に関する最近の話題, 評価方法, 第17回日本毒性学会生涯教育講習会テキスト, 89-108 (2016)
 - 5) Uchino T, Kuroda Y, Ishida S, Yamashita K, Miyazaki H, Oshikata A, Shimizu K, Kojima H, Takezawa T, Akiyama T, Ikarashi Y: Increase of α 2-integrin on adhesion of THP-1 cells to collagen vitrigel membrane, *Biosci Biotechnol Biochem*. 2016; Jul 4:1-6
 - 6) Marx U, Andersson TB, Bahinski A, Beilmann M, Beken S, Cassee FR, Cirit M, Daneshian, Fitzpatrick S, Frey O, Gaertner C, Giese C, Griffith L, Hartung T, Heringa MB, Hoeng J, Jong WH, Kojima H, Kuehn J, Leist M, Luch A, Maschmeyer I, Sakharov D, Sips AJAM, Steger-Hartmann T, Tagle DA, Tonevitsky A, Tralau T, Tsyb S, Stolpe A, Vandebriel R, Vullo P, Wang J, Wiest J, Rodenburg M, Roth A: Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing. *ALTEX*. 2016; 33(3):272-321
 - 7) Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S, Curren R, Desprez B, Eskes C, Griesinger C, Guo J, Hill E, Roi AJ, Kojima H, Li J, Lim CH, Moura W, Nishikawa A, Park H, Peng S, Presgrave O, Singer T, Sohn SJ, Westmoreland C, Whelan M, Yang X, Yang Y, Zuang V.: International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods, *Advance in Experimental Medicine and Biology. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing*, Springer, 2016, pp.343-386
 - 8) Kojima H., *Safety Assessment of Cosmetic Ingredients, COSMETIC SCIENCE AND TECHNOLOGY: THEORETICAL PRINCIPLES AND APPLICATIONS*, Elsevier 2017; 793-803
 - 9) 小島 肇: 医薬品に係わる新添加物の安全性評価, 月刊ファームステージ, 16(6), 1 (2016)
 - 10) 小島 肇: 皮膚細胞を用いた最新の in vitro 皮膚安全性評価研究, 月刊コスメティックステージ, 12, 1-4 (2016)
 - 11) 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 27 年度報告書. *AATEX-JaCVAM*, 5(1), 45-56 (2016)
- F-2. 学会発表
- 1) Kojima H: View and suggestion about how to promote progress and cooperation in Asia, 2016 上海化粧品科学フォーラム (2016.4) (Shanghai, China)
 - 2) 小島 肇: 国際機関で承認されている in vitro 試験法, 日本組織培養学会 第 89 回大会 (2016.5)(大阪)
 - 3) 山本直樹, 平松範子, 加藤義直, 佐藤 淳, 中田 悟, 松井優子, 真野陽介, 原 和宏, 増藺夕紀子, 中村政志, 小島 肇: ヒト不死化角膜上皮細胞を用いた三次元角膜モデルの有用性, 日本組織培養学会 第 89 回大会 (2016.5)(大阪)
 - 4) 小島 肇: 医薬品に係わる新添加剤の安全性評価における諸課題, 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6)(名古屋)
 - 5) 小島 肇: 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的有害性試験法の開発: Arch-Tox」の計画概要, 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6)(名古屋)
 - 6) 伊藤浩太, 榊原隆史, 古川正敏, 奥村宗平, 越田 美, 川村公太郎, 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 (BCOP 法: 眼刺激性代替法試験) における角膜病理学的検査により弱刺激性物質の評価,

- 第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016.6) (名古屋)
- 7) Kojima H: Japanese activities for alternative to animal testing around the world, 6th Workshop & Training of Alternative Methods (2016.6) (Guangzhou, China)
 - 8) 小島 肇: 皮膚毒性評価に関する最近の話題, 評価方法, 第 17 回日本毒性学会生涯教育講習会テキスト (2016.7) (名古屋)
 - 9) 小島 肇: 代替法試験の基礎から最新知見まで, マツモト交商 安全性試験セミナー (2016.7) (東京)
 - 10) 小島 肇: 動物実験代替法の国内外の動向, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム第 11 回教育セミナー (2016.7) (東京)
 - 11) Kojima H: Strategy on the OECD TG in Japan, 13th Annual meeting of Korean Society for Alternatives to Animal Experiments (2016.8) (Seoul, Korea)
 - 12) Kojima H: The current status of non-animal test methods and prospects for Asian cooperation, 17th Annual Congress of European Society for Alternative to Animal Testing (2016.8) (Linz, Austria)
 - 13) 小島 肇: AOP の考え方, OECD による AOP プロジェクトの目的, 経緯と最終的なゴール, 第 23 回日本免疫毒性学会学術年会 (2016.9) (北九州, 福岡)
 - 14) Kojima H: International validation study on Hand1-Luc Embryonic stem cell test (Hand1-Luc EST): A reporter gene assay using engineered mouse ES cells evaluate embryotoxicity in vitro, 5th Annual meeting of American Society for Cellular and Computational Toxicology (2016.9) (North Carolina, USA)
 - 15) 伊藤浩太, 榊原隆史, 古川正敏, 奥村宗平, 越田 美, 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組織学的検査による弱刺激性物質の評価, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11) (福岡)
 - 16) 小島 肇: JaCVAM における 3Rs 原則と動物実験代替法, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11) (福岡)
 - 17) 萩原沙織, 篠田伸介, 仲原 聡, 小島 肇, 大森 崇, 遠藤麻衣, 佐竹真悠子, 池田英史, 西浦英樹, 笠原利彦, 山本祐介, 加藤雅一, 菅原 桂: 培養角膜上皮モデル LabCyte CORNEA-MODEL24 眼刺激性試験の多施設バリデーション研究, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11) (福岡)
 - 18) 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) を用いて作製した三次元角膜再構築モデルの眼刺激性試験代替法 ~ 再構築ヒト角膜様上皮 (RhCE) 試験法用性能標準の 30 物質 (TG492PS) に対する回復性を取り入れた予測性 ~, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11) (福岡)
 - 19) 藤田正晴, 笠原利彦, 山本裕介, 渡辺真一, 菅原経継, 若林晃次, 田原 宥, 堀江宣行, 藤本恵一, 高橋寛明, 黒川嘉彦, 小野 敦, 小島 肇: Cys および Lys 誘導体を用いた皮膚感作性試験代替法 (ADRA 法) のバリデーション研究のための技術移転結果報告, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11) (福岡)
 - 20) 松成夏美, 九十九英恵, 謝 丹, 岡 朱音, 小島 肇, 板垣 宏: タンパク質のアレルギ性を評価する in vitro 試験法の開発, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11) (福岡)
 - 21) 内野 正, 宮崎 洋, 山 邦彦, 竹澤俊明, 小島 肇, 秋山卓美, 五十嵐良明: 改良型コラーゲンビトリゲル膜チャンバーでの THP-1 細胞の細胞接着性及びサイトカイン産生量, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11) (福岡)
 - 22) VO P.T.H, Narita K, Nakagawa F, Kojima H, Itagaki H: Reducing false negative results in an in vitro skin sensitization test: The human cell line activation test, 日本動物実験代替法学会第 29 回大会 (2016.11) (福岡)
 - 23) Kojima H: Guidance on use of alternative methods for testing in the safety assessment of cosmetics and quasi-drug,

Asian Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (Asian Congress) 2016, (2016.11) (Karatsu, Saga)

- 24) 小島 肇: 医薬品食品領域での動物愛護管理法の現在と未来, NPO 法人動物実験関係者連絡協議会 第5回シンポジウム 「動物愛護管理法」の過去・現在・未来 (2016.12) (東京)
- 25) Furukawa, M., Sakakibara, T., Kouta I., Kawamura, K., Matsuura, M., Kojima, H.: Special stain for detection of corneal histopathological changes in BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) assay, 56th Annual meeting of Society of Toxicology, March 12-16, Baltimore USA
- 26) 小島 肇: 日本における動物実験代替法研究の胎動, シンポジウム「日本における動物実験代替法の新たな技術展開」, 第90回日本薬理学会年会 (2017.3) (長崎)

6. 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

試験法ガイドライン

OECD Test No. 442E: In Vitro Skin

Sensitisation, *Human Cell Line Activation Test (h-CLAT)*

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

発がん性試験および生殖毒性試験の AOP 開発

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
研究分担者 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長

研究要旨

細胞毒性をキーイベントとした鼻腔発がんに関する AOP 案の作成を目標として、文献検索によって実験動物の鼻腔発がん誘発化学物質をリストアップし、遺伝毒性並びに異形成、過形成、化生、炎症など初期病変の性格及び発生するがんの組織型等に関するデータの関連性を解析した。

A. 研究目的

OECD を中心に進められている AOP と IATA を用いた化学物質の毒性評価法の確立に貢献するため、その一例として「鼻腔の細胞毒性をキーイベントとした鼻腔発がんの AOP 案」を作成することを研究目的としている。

B. 研究方法

PubMed などの公表論文の文献調査をおこない、実験動物に鼻腔発がんを誘発する化学物質をリストアップし、各々の物質について 1) 遺伝毒性の評価状況、2) 反復投与によって誘発される異形成、過形成、化生、炎症、萎縮などの初期の病理病変の種類 3) 誘発されるがんの組織型及び鼻腔内での部位等についてまとめ、データの関連性などについて考察する。

（倫理面への配慮）該当なし

C. 研究結果

化学物質により誘発される鼻腔腫瘍について、鼻腔発がん過程の経路を腫瘍の組織型、動物種および投与経路別に文献情報を収集し、解析した。解析のために情報を収集した化学物質は、ラット 41 物質、マウス 5 物質、ハムスター 8 物質である。鼻腔発がん過程の主要

な経路について得られた結果を 扁平上皮乳頭腫（ラット及びマウス） 扁平上皮がん（ラット） 腺腫（ラット、マウス及びハムスター） 腺がん（ラット） 腺扁平上皮がん（ラット） 神経上皮がん（ラット） 血管腫（マウス）及び 血管肉腫（マウス）について、吸入及び非吸入経路による曝露を考慮してまとめた。（別紙）

D. 考察

それぞれの病変の先行病変として、扁平上皮乳頭腫は呼吸上皮の扁平上皮化生、扁平上皮がんは呼吸上皮と嗅上皮の変性・壊死および扁平上皮化生、腺腫は呼吸上皮、特に移行上皮部の過形成、腺がんは嗅上皮の壊死・萎縮、過形成および異型的過形成、ポウマン腺の壊死と過形成、呼吸上皮の粘膜下腺の過形成が重要であると考えられた。一方、腺扁平上皮がん、神経上皮がん、血管腫及び血管肉腫では解析に利用できる化学物質が限られていることから、先行病変の特定は困難であった。

E. 結論

扁平上皮がん及び腺がんについては、それぞれ異なる先行病変が見られており、発がん経路については、個別に検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

該当なし

2) 雑誌

1. Suzuki, I., Cho, Y-M., Hirata, T., Toyoda, T., Akagi, J., Nakamura, Y., Park, E-Y., Sasaki, A., Nakamura, T., Okamoto, S., Shiota, K., Suetome, N., Nishikawa, A. and Ogawa, K.: 4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (*Raphasatin*) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats, *Journal of Toxicologic Pathology*, 29: 237-246, 2016.
2. Suzuki, I., Cho, Y-M., Hirata, T., Toyoda, T., Akagi, J., Nakamura, Y., Sasaki, A., Nakamura, T., Okamoto, S., Shiota, K., Suetome, N., Nishikawa, A. and Ogawa, K.: Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate (*Raphasatin*) in the rat urinary bladder without genotoxicity, *Journal of Applied Toxicology*, 37: 485-494, 2017.
3. Matsushita, K., Toyoda, T., Inoue, K., Morikawa, T., Sone, M. and Ogawa, K.: Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat, *Journal of Toxicologic Pathology*, 30: 57-62, 2017.
4. Toyoda, T., Cho, Y-M., Akagi, J., Mizuta,

Y., Matsushita, K., Nishikawa, A., Imaida, K. and Ogawa, K. Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic toxicity induced by 3-monochloropropane-1,2-diol. *Journal of Toxicologic Sciences*, 42: 1-11, 2017.

5. Nonaka, M., Amakasu, K., Saegusa, Y., Naota, M., Nishimura, T., Ogawa, K. and Nishikawa, A. Non-neoplastic lesions found only in the two-year bioassays but not in shorter toxicity studies of rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 86 : 199-204, 2017.
6. Hirata, T., Cho, Y-M., Toyoda, T., Akagi, J., Suzuki, I., Nishikawa, A. and Ogawa, K.: Lack of *in vivo* mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of *gpt* delta rats administered singly or in combination. *Journal of Applied Toxicology*, (in press)
7. Cho, Y-M., Hasumura, M., Imai, T., Takami S., Nishikawa A. and Ogawa, K. Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water. *Journal of Applied Toxicology*, (in press)

2. 学会発表

1. 小川久美子: 前向き評価におけるがん原性評価文書(CAD)に対する中間報告. 第43回日本毒性学会学術年会、名古屋、2016年6月.
2. 小川久美子、高須伸二: 新規臭素系難燃剤の毒性影響について. 環境科学会2016年会、横浜、2016年9月.

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 α -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 α -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

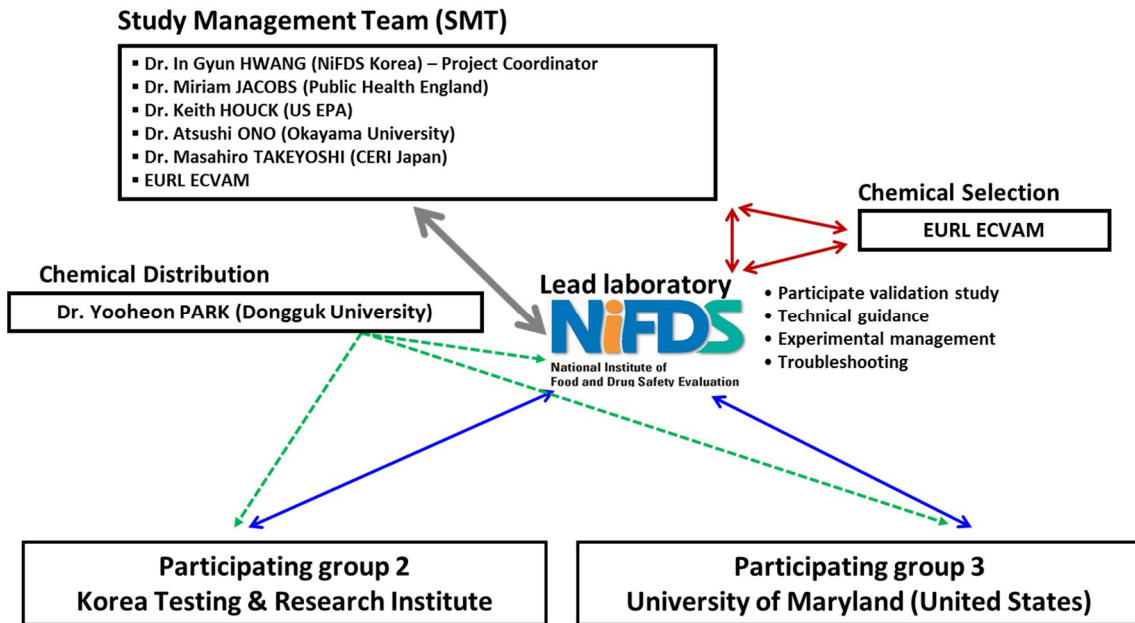


図 1 22Rv1/MMTV_GR-KO 試験法バリデーション組織図

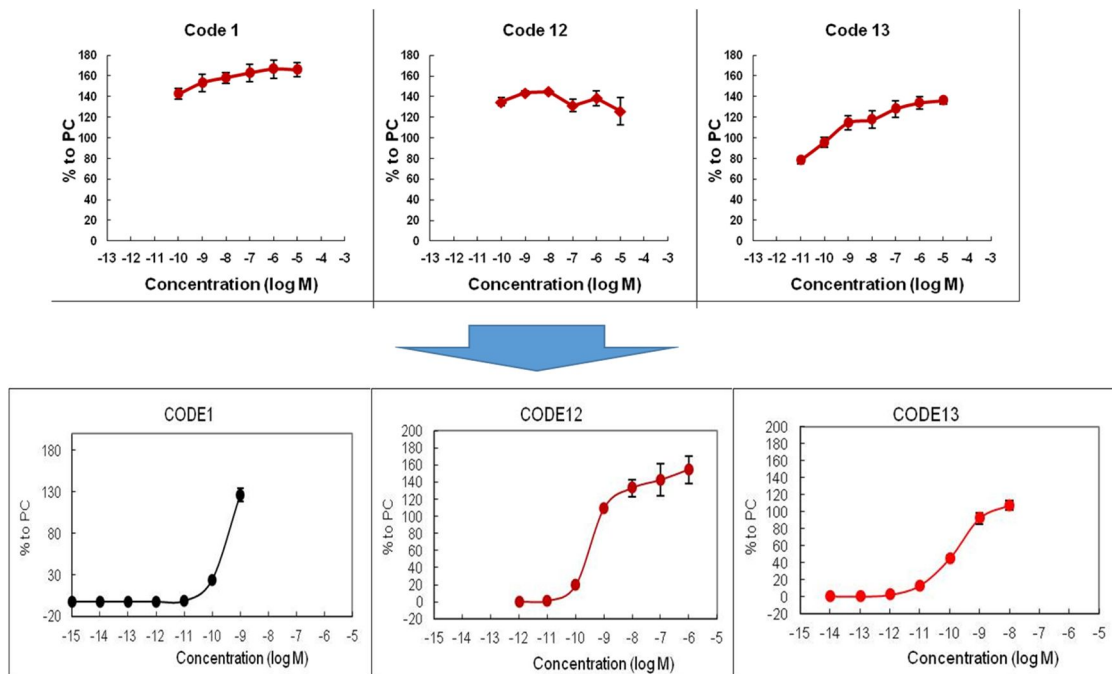


図 2 22Rv1/MMTV_GR-KO アゴニストアッセイバリデーション結果で用量依存性が得られていなかった物質の再測定結果

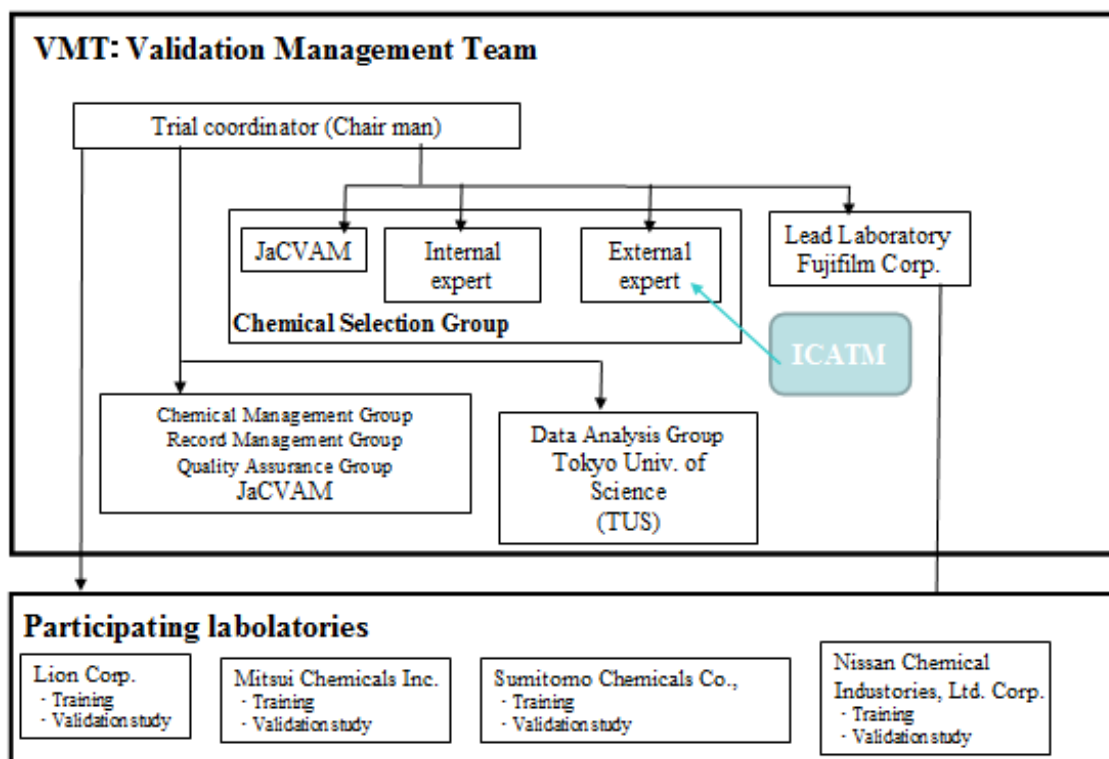


図3 ADRA 法バリデーション組織図

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

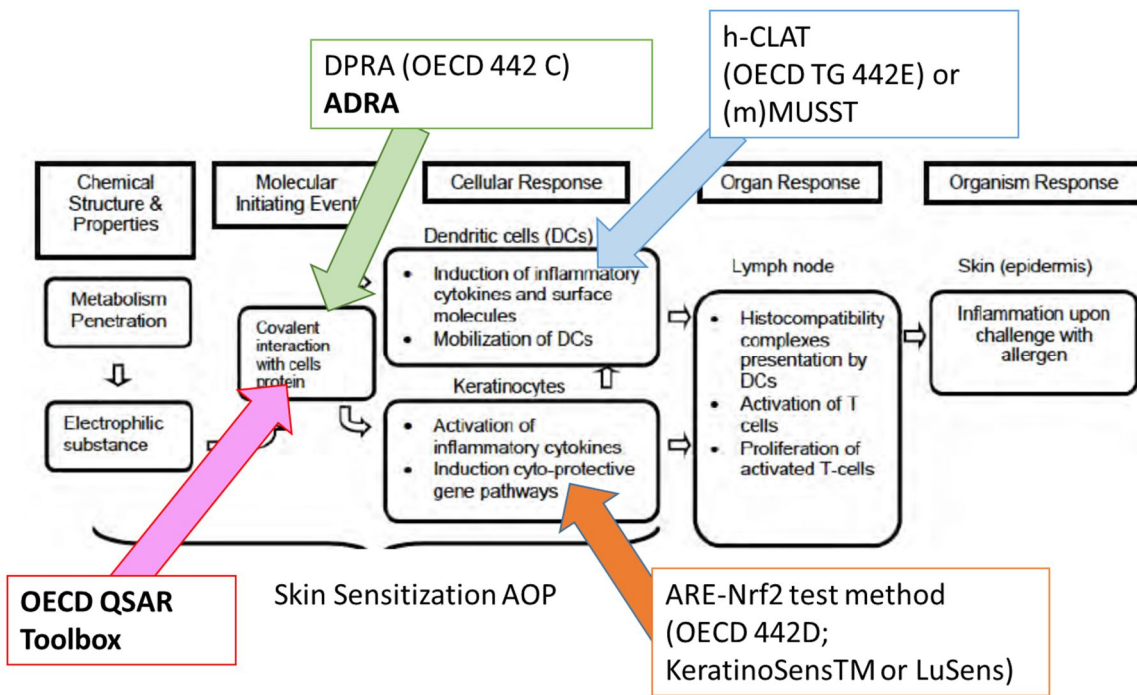


図5 皮膚感作性 AOP(Adverse Outcome Pathway)と AOP の key event 評価系の関係

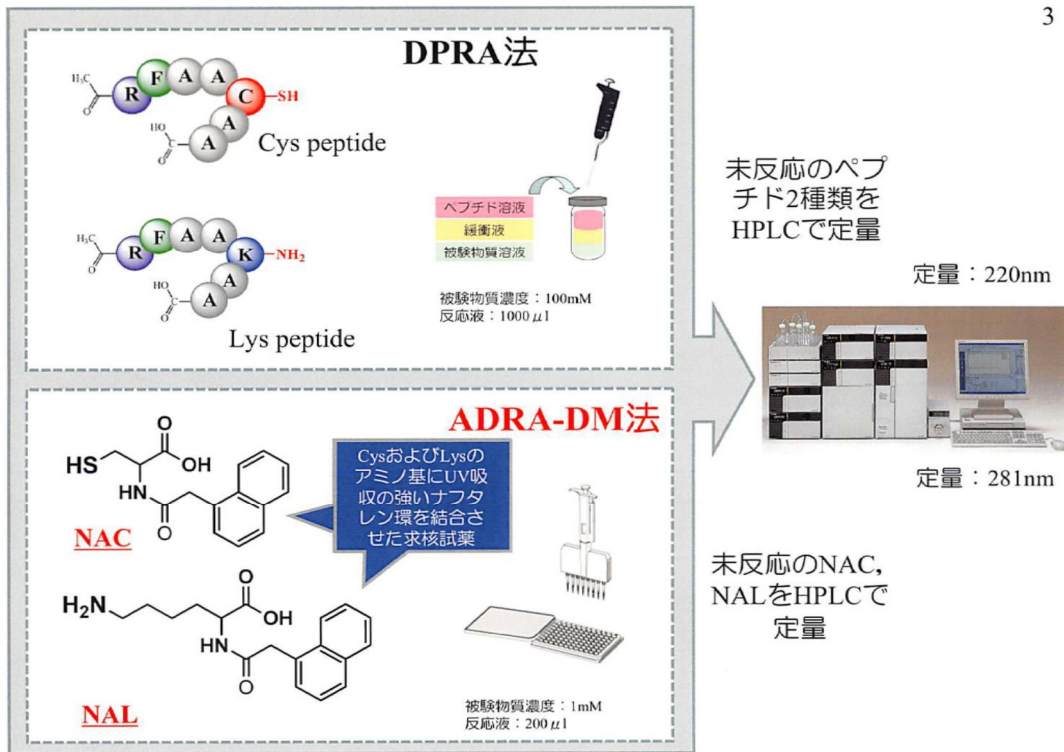


図6 DPRA法とADRA法の概要の比較

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

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。また、得られた科学的根拠をベースにした ROS アッセイの OECD test guideline 案を作成した。

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行われている。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。当研究室では既に光化学的評価方法として Reactive oxygen species (ROS) assay を開発し、本データと薬物動態情報を組み合わせることで信頼性ある光安全性評価が可能となることを明らかにしてきた。この知見を検証すべく、本研究では、多数の光毒性物質を対象とし、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検証を行った。また、これらの検証結果をもとに光毒性に関する AOP ならびに ROS assay に関する OECD test guideline 案を作成した。

B．研究方法

B-1) ROS アッセイ

研究分担者らが既に公表している ROS assay 推奨プロトコールに基づき、各検体（6 化合物、Benzophenone (BZ)、dioxibenzene (DO)、ketoprofen (KT)、mexenone (MX)、oxybenzone (OX)、sulisobenzene (SB)）について ROS assay を行った。

B-2) 薬物動態実験

Sprague-Dawley 系の雄性ラットを用いて薬物動態試験を実施した。全ての動物実験は静岡県立大学内の動物委員会の承認を得て実施した。血中および皮膚中薬物濃度は UPLC/ESI-MS システムを用いて評価した。

B-3) 3T3 NRU PT

マウス由来不死化線維芽細胞である Balb/c 3T3 cells (CloneA-31) を用い、OECD TG432 に基づいて 3T3 NRU phototoxicity test (3T3 NRU PT) を実施した。

B-4) ラット in vivo 光毒性試験

あらかじめ腹部を剃毛したラットに被検物質を塗布し、black light (FL15BL-B, National, 東京, 日本) を用いて UVA 照射量が 30 J/cm² となるまで照射した。照射終了後 24 h において色差計 (NF333, 日本電色工業, 東京, 日本) を用いて皮膚表面の色調を計測し、光毒性の指標とした。

C. 研究結果

C-1) 光安全性評価

化合物が太陽光に含まれる UV もしくは VIS (λ=290-700 nm) の一部を吸収し、励起状態になることは各種光毒性の引き金となる。そこでモデル化合物である BZPs に対して UV/VIS 吸収測定を実施した。全ての BZPs は UVA/B 領域において高い光吸収を示したが、可視光領域の光吸収は観察されなかった。また、ICH S10 では、「290 から 700 nm の波長において MEC が 1,000 M⁻¹・cm⁻¹ を上回らない化合物については、

直接的な光毒性反応を引き起こすほどの光反応性がないと考えられる」と明記されている。この波長領域における BZPs の MEC の最大値は 2,317 (BZ), 10,833 (D0), 4,350 (KT), 2,850 (MX), 6,817 (OX) および 11,700 (SB) M⁻¹・cm⁻¹ であった。すなわち 6 種の BZPs はそのすべてが高い光励起性を有しており、光化学的反応を引き起こす可能性がある。

また、光照射時における化合物からの ROS 産生は光毒性の指標として有用である。この性質を評価すべく、ROS assay を実施した。陽性対照である QN は擬似太陽光照射時に ¹O₂ および O₂⁻ を産生し、陰性対照である EM では両者の産生を認めなかった。以前の研究から ROS assay には明確な criteria [¹O₂ (ΔA_{440 nm} × 10³): > 25; and O₂⁻ (ΔA_{560 nm} × 10³): > 20] が定められており、この値を下回る化合物に関しては光毒性の懸念が非常に低いと判断できる。6 種の BZPs の内、BZ, KT および OX は露光時に非常に強い ROS 産生を認め、その光反応性は高いと判断した。MX に関しては ROS assay における被験物質濃度 (200 □M) では反応液中において析出が生じたため、希釈した状態 (100 □M) で同様の試験を実施した結果、ROS 産生を認めた [¹O₂ (ΔA_{440 nm} × 10³): 67; および O₂⁻ (ΔA_{560 nm} × 10³): Not detected]。すなわち、BZ, KT, MX および OX は高い光反応性を有しており、D0 および SB は光反応性が低いと判断した。

C-2) 薬物動態学的評価

経皮投与された化合物は皮膚へ直接曝露されるため、化合物の皮膚透過性や皮膚滯

留性の高さが光毒性のリスクファクターとなる。そこで、経皮投与された BZPs の皮膚透過性や滞留性を評価すべく、BZPs 経皮投与後における皮内動態を評価した。本検討では、PK study におけるスループット改善および動物資源削減を実現すべく、経皮的 cassette-dosing PK study を実施した。得られたデータをもとに皮膚における薬物動態学的パラメーターを算出することで皮膚滞留性を評価した。BZ は経皮共投与後 4 h において最高皮膚中濃度 (C_{max} : 6.1 $\mu\text{g/g tissue}$) に到達し、その後は速やかに消失した。DO, MX および OX は経皮共投与後、約 4 h で C_{max} に到達したが、投与後 8 h まで皮膚中に高濃度で滞留し、その後消失した。本知見から、この 3 化合物は経皮投与後 4-8 h において最も光毒性のリスクが高いと見積もることができる。一方で、KT および SB は経皮共投与後 24 h で C_{max} を迎え、消失相は本実験条件内では観察されなかった。特に KT の皮膚中濃度は投与後 8-24 h において C_{max} (8.7 $\mu\text{g/g tissue}$) とほぼ同程度の値を維持し、その $AUC_{0-24 h}$ および MRT の値はそれぞれ、160.0 h $\cdot \mu\text{g/g tissue}$ および >14.2 h と、他の BZPs と比較して非常に高値であり、KT の皮膚滞留性は非常に高いと判断できた。また、SB は皮膚中濃度の立ち上がりが緩やかであったが、MRT が高値 (>14.9 h) であり、高い皮膚滞留性を示した。

C-3) 光毒性試験

BZPs の *in vitro* 光毒性を評価するため、3T3 NRU PT を実施した。3T3 NRU PT では被験物質を濃度依存的に Balb/c 3T3 細胞に曝露後、UVA 照射/非照射時におけるそれ

ぞれの細胞生存曲線から IC_{50} 値を計算し、それらの比である PIF 値によって *in vitro* 光毒性を評価する。PIF の値に関して、OEDG TG 432 では i) phototoxicity: $PIF > 5$, ii) probable phototoxicity: $2 < PIF < 5$ および iii) non-phototoxicity: $PIF < 2$ としている。BZPs のUVA 照射時/非照射時における細胞生存曲線によると、BZ および KT については UVA 照射によって細胞生存曲線が低濃度側へシフトし、DO, OX および SB の生存曲線は UVA 照射による変化をほとんど認めなかった。BZ および KT の PIF 値はそれぞれ 49.5 および 68.9 と算出され、この値は光毒性の基準値を大きく超えており、すなわち BZ および KT は非常に強い *in vitro* 光毒性を示した。DO, OX および SB の PIF 値は約 1.0 であり、これら 3 化合物は *in vitro* 光毒性を示さなかった。また、MX についてはその溶解度の低さから、調製した濃度において析出が生じ、3T3 NRU PT では評価不能であった。

BZPs の *in vivo* 光毒性を評価すべく、BZPs に対してラットを用いた *in vivo* 光毒性試験を実施した。本試験では各化合物をラットに経皮投与 (10 mg/site) 後、UVA を照射し、UVA 照射前後における皮膚表面の色調変化を *in vivo* 光毒性の指標とした。陽性対照である QN の UVA 照射後における ΔE 値は UVA 非照射群と比較して有意に増大し ($P < 0.05$)、陰性対照である EM については UVA 照射群/非照射群の間において ΔE 値に有意な差はなかった。すなわち、本試験では UVA 照射群/非照射群における ΔE 値の差に基づき、化合物の *in vivo* 光毒性評価が可能であると考えられる。

UVA 照射後における BZ および KT の $\square E$ 値は UVA 非照射群と比較して有意に増大し ($P < 0.05$), 特に BZ の $\square E$ 値には UVA 照射群/非照射群の間に大きな差があった。MX の $\square E$ 値は UVA 照射群/非照射群の間に有意な差はなかったが, その値には増加傾向があった ($P = 0.0607$)。つまり, BZ および KT はラットに対して非常に強い *in vivo* 光毒性を惹起し, MX では中程度の *in vivo* 光毒性を観察した。一方で, D0, OX および SB については EM と同様, UVA 照射群/非照射群における $\square E$ 値の間に差がなく, ラットにて *in vivo* 光毒性を示さなかった。

C-4) AOP および OECD TG 案の作成

化学物質の光化学的反應を中心とした光毒性に関する AOP を OECD に提案した。また, ROS assay の OECD TG 化のため SPSF を提出し, OECD からのコメントに対応した。続いて ROS assay の TG 案を提出した。現在は本 TG 案に関するパブコメを収集中である。

D. 考察

本研究ではモデル化合物である 6 種の BZPs の *in vivo* 光毒性リスクを予測すべく, 光化学・光生物学的試験および経皮的 cassette-dosing PK study を実施した。まず, 光化学的特性について, 全 6 種の BZPs は UV 領域において非常に高い光吸収特性を有しており, その MEC 値は ICH S10 で定められる基準値 (Non-phototoxicity: $MEC < 1000$) を大きく超えていた。一方で, ROS assay では BZ, KT, MX および OX のみが擬似太陽光照射時に ROS を産生し, D0

および SB は ROS 産生を認めなかった。すなわち, BZ, KT, MX および OX は高い光反応性を有しており, 光毒性を誘発する可能性があると考えられる。一方で, D0 および SB は ROS assay の結果から光毒性を発現するほどの光反応性がないと判断できた。6 種の BZPs の光反応性を比較すると, 以下のような順となった。

光反応性:

KT > BZ > OX > MX SB D0

また, 光生物学的試験である *in vitro* 3T3 NRU PT では BZ および KT において UVA 照射によって細胞毒性は増強し, すなわちこの 2 化合物は *in vitro* 光毒性を示した。MX についてはその水溶性の低さから試験条件下で析出を認め, 3T3 NRU PT によって *in vitro* 光毒性評価ができなかったが, 他の 5 種の BZPs の *in vitro* 光毒性は以下のような順であった。

in vitro 光毒性:

KT > BZ OX SB D0

経皮的 cassette-dosing PK study では, 経皮投与された KT および SB は他の BZPs と比較して高濃度かつ長期間, 皮膚中で滞留する事を確認し, これら 2 化合物の皮膚曝露リスクは高いと考える。薬物動態学的パラメーターである C_{max} および MRT を指標として皮膚滞留性を評価すると以下のような順となった。

皮膚滞留性:

KT > SB OX > MX > BZ > D0

ICH S10 では光毒性化合物の特徴について, 化合物が i) 太陽光 ($\square = 290-700$ nm) を吸収すること, ii) ROS を含む反応性の高い分子種を生成すること, iii) 露光部位である皮膚や眼に分布しやすいことを挙げ

ている。したがってこの 3 点を評価し、これらのデータを統合的に解析することによる効果的な光毒性リスク予測が可能であると考えられる。そこで、光化学・光生物学的試験および経皮的 cassette-dosing PK study から得られたデータを用いて decision matrix を作成し、BZPs の光毒性リスクを予測した。一般的に、decision matrix は多数の実験から得られたデータを系統的に分析し、判断するために用いられる模式的なデータ表である。ICH S10 にも記載されているように、高い光反応性を有し、露光部位である皮膚や眼への曝露リスクが高い化合物は、光反応性が低く、曝露リスクが低いものと比較して光毒性を引き起こしやすい。つまり、decision matrix による BZPs の光毒性リスク判定においては、光化学・光生物学的試験および PK study の両データにおいて高レベルと判断された化合物は、その光毒性リスクが高いことを表し、どちらか一方、あるいは両方のレベルが低い化合物はその光毒性リスクは中程度または低いと予測できる。しかしながら、化合物の光反応性が低ければ、たとえそれが露光部位に長時間、多量に曝露されたとしても光毒性を起こす可能性は非常に低くなるため、光反応性が低い化合物は光毒性リスクも低いと判定する。Decision matrix を用いた光毒性リスク予測において、光化学・光生物学的特性については MEC 値、ROS データおよび PIF 値を用い、皮膚蓄積性の指標として C_{max} および MRT を採用した。Decision matrix から、KT は光反応性、*in vitro* 光毒性および皮膚蓄積性の全てで高い光毒性リスクを示し、KT の光毒性リスクは非常に高いことが予測できた。加えて、

KT の MRT は他の BZPs と比較して非常に長く、KT は経皮投与後、皮膚中で長時間滞留するために、その光毒性リスクは長時間にわたると考える。BZ については高い光反応性および *in vitro* 光毒性を認めたと、皮膚への蓄積性は比較的であった。MX および OX は ROS assay において高い光反応性を認め、皮膚蓄積性は中程度であった。OX は *in vitro* 光毒性を示さず、MX の *in vitro* 光毒性は評価不能であったが、この 2 化合物の光反応性は高いことから中程度の光毒性リスクがあると予測した。SB は高い皮膚蓄積性を有していたが、光反応性が非常に低く、*in vitro* 光毒性も観察されなかったため、光毒性リスクは低いと判断した。D0 は光反応性、*in vitro* 光毒性および皮膚蓄積性のすべてにおいて他の化合物と比較して低レベルであったことから、その光毒性リスクは最も低いと予測した。予測した BZPs の光毒性リスクは以下の順であった。

光毒性リスク予測：

KT BZ > MX > OX SB D0

続いて、被験物質である 6 種の BZPs の *in vivo* 光毒性を明らかにするため、ラット光毒性試験を実施した。その結果、UVA 照射によって、BZ、KT および MX はラットに対して光毒性反応を惹起し、他の 3 化合物は *in vivo* 光毒性を認めなかった。実際に観察した *in vivo* 光毒性反応は以下のようであった。

In vivo 光毒性：

BZ > KT MX SB OX D0

本評価系の予測精度を検証すべく、本評価系で予測した 6 種の BZPs における光毒性リスクとラットにおいて実際に観測さ

れた *in vivo* 光毒性を比較した。

光毒性リスク予測：

KT BZ > MX > OX SB DO

In vivo 光毒性：

BZ > KT MX SB OX DO

Matrix decision により得られた光毒性リスク予測とラット光毒性試験で観察した *in vivo* 光毒性の順序は良好に対応し、すなわち本評価系が高い予測性を有することを示唆した。しかしながら、OX については光毒性リスク予測と観察された *in vivo* 光毒性の間に乖離があった。今回実施した *in vivo* 光毒性試験では OX の光毒性反応は観察されなかったが、OX は光アレルギー化合物であるという臨床的報告がされている。光アレルギーは光によって励起された化合物が生体内タンパク質などへの付加を介し、抗原性を獲得することで誘発される免疫反応である。光アレルギーの発現には生体における複雑な免疫反応が関与していることから、光アレルギー性化合物は評価が難しく、各種光毒性試験において偽陰性となる場合もあるという報告もされている。今回実施した 3T3 NRU PT およびラット *in vivo* 光毒性試験も例外ではなく、OX の光アレルギーを正確に評価できなかった可能性がある。一方で、ROS assay は各種光毒性反応の発現機序上流部に共通して存在する化合物の光化学的反応 (ROS 産生) を光毒性の指標とするため、理論的には光アレルギーを含む各種光毒性リスクを包括的に予測することができる。そのため、本評価系では化合物の光反応性評価 (ROS assay) を実施することで、OX の光毒性 (光アレルギー) リスクを示唆するデータが得られたと考える。また、3T3 NRU PT は

難水溶性化合物の評価が難しいことが課題として挙げられており、MX はその水溶性低さから評価不能であった。3T3 NRU PT では OX および MX の光毒性リスクを適切に評価できなかった一方で、ROS assay では、BZ, KT, OX および MX の光毒性リスクを正確に予測することができ、光反応性のデータは光毒性リスクを予測する上で非常に重要な指標であり、ROS assay を光安全性評価系に取り入れることで包括的な光毒性リスク予測が可能であると考えられる。

E. 結論

今回の検討では、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る。近年では規制当局から基礎研究や製品開発研究において、3Rs (refinement, reduction, replacement) への貢献を求める動きが強まっており、cassette-dosing 法は、reduction の面からこの要求に応えることが可能であろう。以上より、本評価系は実験動物福祉の向上に貢献しつつ、高い信頼性およびスループットを有する経皮適用化合物の光毒性リスク評価系としての発展が期待できる。実用に向けては、本評

価系に対する他の化合物を用いたバリデーション研究が必要であると考えが、本評価系は創薬を含む製品開発段階における光安全性評価への貢献が期待できる。

また、本検討で得られた知見は現在提案中の光毒性に関する AOP および ROS assay の OECD TG 化の実現に大きく貢献できると期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Satomi Onoue, Yoshiki Seto, Hideyuki Sato, Hayato Nishida, Morihiko Hirota, Takao Ashikaga, Anne Marie Api, David Basketter, Yoshiki Tokura [Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments] *Journal of Dermatological Science*, 85(1): 4-11 (2017)
- 2) Hiroto Ohtake, Yukiko Suzuki, Masashi Kato, Yoshiki Seto, Satomi Onoue [Photosafety testing of dermally-applied chemicals based on photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data] *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(1): 237-8 (2016)
- 3) Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, Satomi Onoue [Development of fluorometric reactive oxygen species assay for photosafety evaluation] *Toxicology in Vitro*, 34: 113-9 (2016)
- 4) Satomi Onoue, Hiroto Ohtake, Gen Suzuki, Yoshiki Seto, Hayato Nishida,

Morihiko Hirota, Takao Ashikaga, Hirokazu Kouzuki [Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens] *Toxicology in Vitro*, 33: 147-52 (2016)

- 5) Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Sharon Shui Yee Leung, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue [Development of an Improved Inhalable Powder Formulation of Pirfenidone by Spray-Drying: In Vitro Characterization and Pharmacokinetic Profiling] *Pharmaceutical Research*, 33(6): 1447-55 (2016)

2. 学会発表

- 1) 世戸孝樹, Hak-Kim Chan, 尾上誠良: 体内動態制御により患者の QOL 改善に寄与する新規 pirfenidone 粉末吸入製剤の開発. 2016 年, 第 32 回 日本 DDS 学会学術集会
- 2) 世戸孝樹, 佐藤秀行, 尾上誠良: 安全性向上を指向した pirfenidone の DDS 研究. 2016 年, 第 2 回 日本医薬品安全性学会学術大会
- 3) Yoshiki Seto, Satomi Onoue: An improved reactive oxygen species assay for photosafety assessment of chemicals with limited aqueous solubility. 2016, EUSAAT 2016, 17th Annual Congress of EUSAAT
- 4) Yosuke Iyama, Hiroto Ohtake, Hideyuki Sato, Yoshiki Seto, Satomi Onoue: Verification study on applicable domain of photosafety

- assessment by combined use of photochemical and pharmacokinetic data. 2016, 31st JSSX Annual Meeting
- 5) 尾上誠良:光毒性リスク評価の開発と課題, 2016年, 日本動物実験代替法学会第29回大会
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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

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

研究分担者 山田 雅巳

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

OECD の試験ガイドライン (TG490) の運用について検討するため、TK6 細胞を用いた遺伝子突然変異試験を、代謝活性化系非存在下ではメチルメタンサルホン酸 (MMS) を、代謝活性化系存在下ではシクロホスファミド (CP) を用いて、11 機関が実施した。

A. 研究目的

遺伝毒性は、発がん過程の一部である。遺伝毒性を検出するための試験には *in vitro* では細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) と、哺乳類培養細胞を用いるマウスリンフォーマ試験 (MLA) 染色体異常試験、小核試験、コメット試験がある。*in vivo* ではマウス個体を用いる染色体異常試験、小核試験、コメット試験のほか、トランスジェニックげっ歯類を用いる遺伝子突然変異試験がある。この研究課題では、採択された OECD のテストガイドライン「チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験」(TG490) について実際にガイドラインに沿って試験を実施し、TG490 の運用について検討することを目的とする。具体的には、マウスリンフォーマ試験とチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子座を用いたヒトリンパ芽球株化細胞試験 (TK6 試験) による同一化合物に対する遺伝子突然変異誘発性の評価、および TK6 試験と他の遺伝子突然変異試験の発がん性のスクリーニング試験としての位置づけを検討する。

B. 研究方法

【細胞】

TK6 細胞、ヒトリンパ芽球様細胞 ; p53 遺伝子は正常で、 θ -メチルグアンニンメチルトランスフェラーゼ (MGMT) 遺伝子を発現していない。凍結保存された細胞を速やかに融解後 50 ~ 200 ml 程度の細胞培養液で、

5% CO₂ 存在下 37 °C で培養し、細胞濃度が 1.5×10^6 /ml 以上にならないように適宜細胞を希釈しながら培養を続け、数日間後、安定した対数増殖期に達したものを使用した。

【試薬等】

馬血清 (SAFC Biosciences; Cat. No. 12449C-500ML) についてロット確認の後、同一ロットを実施機関に配布した。細胞培養液は、上記馬血清を室温状態においたのち 56 °C の湯浴で 60 分間非働化処理したものを 10% 含み、ペニシリン・ストレプトマイシン (Gibco-BRL; Cat. No. 15140) 及びピルビン酸ナトリウム (Gibco-BRL Cat. No. 11840) を、最終濃度がそれぞれ、100 units/mL、100 µg/mL、200 µg/mL になるよう加えた。

TK 変異体の検出にトリフルオロチミジン (TFT; Sigma T2255) を用いた。被験物質として、代謝活性化系非存在下でメチルメタンサルホン酸 (MMS, Sigma-Aldrich 129925-5G) 代謝活性化系存在下で、無水シクロホスファミド (CP, 塩野義製薬 エンドキサン注 100 mg) を、いずれも 5、2.5、1.25、0.625 µg/mL の 4 用量で実施した。但し、一機関は、MMS が 8、5、3、1 µg/mL、CP が 5、3、2、1 µg/mL の用量で実施している。

【操作手順】

- 1 細胞を解凍してフラスコにて 3 日間培養する。以後培養条件はすべて、CO₂ 5%、37 °C である。試験には 2 つのカルチャーを並行して用いた。
- 2 培養後の細胞を計数し、細胞の数を調整して一晩

前培養した。

- 3 細胞数をそろえて、被験物質等で 4 時間処理した。
- 4 処理後すぐに細胞毒性試験用プレート(96ウェル)に細胞播種を実施し、2週間後に黄変ウェルを計数した。これよりPE0を計算。
残りの細胞を洗って検体を除きフラスコに戻したら、24、48、72時間後に細胞を計測し、そのつど細胞濃度を調整した。
- 5 3日間の発現時間をおいた後、TK遺伝子突然変異頻度検出用プレート(MFプレート)と平板効率を求めるためのプレート(PE3プレート)に細胞播種を実施し、2週間後に、黄変ウェルを計数する(normally-growing mutant: NG)。
- 6 MFプレートに再びTFTを添加し、さらに14日間培養し、新たに黄変したウェルを数える(slowly-growing mutant: SG)。
- 7 検体処理直後(PE0)およびTFTプレート播種時(PE3)に、同時に細胞の平板効率を算出し、細胞毒性の指標とした。NGおよびSG変異体の数を合計した総変異体数から突然変異体頻度を計算した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた実験で該当しない。

C. 研究結果

参加した11機関のうち、2機関は適切な結果が得られず、9機関(B、C、E、K、L、N、O、S、T)の結果をまとめた(表1)。うち1機関は代謝活性化系存在下で適切な結果が得られなかった。機関Nの外れ値を除いた溶媒対照の平板効率の平均は、代謝活性化系非存在下で 92.3 ± 18.8 (%)、代謝活性化系存在下で 81.9 ± 13.8 (%)だった。PE0とPE3の分布を図1(a)(b)に示した。

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で処理した場合のTK突然変異体頻度を機関別にまとめた(表2)。平均は、代謝活性化系非存在下、溶媒対照で $8.2 \pm 6.0 (X10^{-6})$ 、陽性対照物質のMMSで $44.2 \pm 19.1 (X10^{-6})$ であった。代謝活性化系存在下では、溶媒対照で $6.3 \pm 5.2 (X10^{-6})$ 、陽性対照物質のCPで $32.6 \pm 28.1 (X10^{-6})$ であった。平均値としては、いずれも陽性対照物質が溶媒対照の約5倍の値を示し、十分な高頻度が得られていたが、図2に示したように、ばらつきが大きく、 $70 (X10^{-6})$ を超える2機関と、 $40 (X10^{-6})$ 以下で誘発が不十分なその他の機関とに二極化していた。

細胞毒性の結果を図3に示した。MMSでは十分な細胞

毒性を示していたが、CPでは機関によって不十分な結果であった。同時に突然変異体頻度も低く両者には相関があった。

D. 考察

文献(Honma et al., Mutat Res, 374, 89-98, 1997)では、TK6細胞ではPEが70~130%、TK自然突然変異体頻度が $3 \sim 10 \times 10^{-6}$ に収まるのが適切であるとされている。今回の平均値は、PEが-S9mixで 92.3 ± 18.8 (%)、+S9mixで 81.9 ± 13.8 (%)、またTK自然突然変異体頻度は、-S9mixで $8.2 \pm 6.0 (X10^{-6})$ 、+S9mixで $6.3 \pm 5.2 (X10^{-6})$ だったことから、おおむね良好な結果と考えられる。

TK自然突然変異体頻度が高い機関は代謝活性化系の有無にかかわらず同じ機関だったので、プロトコルに記載されていない点についての、操作の違いを確認する必要がある。特に、代謝活性化系存在下の結果は、S9mixのロットとの相関があることから、血清のみならず、S9mixのロットの確保も必要と考えられた。

E. 結論

11機関で実施したTK6細胞を用いた遺伝子突然変異試験のプロトコルは、安定した結果を得るために、修正が必要な箇所があると考えられる。

F. 健康危険情報

特筆すべきものは無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし

2) 雑誌

- 1) Wada, K., Kato, Y., Ohnuma-Koyama, A., Takahashi, N., Yamada, M., Matsumoto, K.: 2-Nitroanisole-induced oxidative DNA damage in Salmonella typhimurium and in rat urinary bladder cells, Mutation Research, 816, 18-23, 2017.
- 2) Kimoto, T., Horibata, K., (省略30名), Yamada, M., and Honma, M.: The PIGRET assay, a method for measuring Pig-a gene mutation in reticulocytes, is reliable as a short-term in vivo genotoxicity test:

Summary of the MMS/JEMS-collaborative study across 16 laboratories using 24 chemicals, Mutation Research, 811: 3-15, 2016.

- 3) Sugiyama, K., Yamada, M., Awogi, T., Hakura, A.: The strains recommended for use in the bacterial reverse mutation test (OECD guideline 471) can be certified as non-genetically modified organisms, Genes and Environment, 38: 2, 2016.

2. 学会発表

- 1) 山田雅巳、森田健：遺伝毒性評価における染色体異常試験の要否を問う、日本環境変異原学会第45

回大会 シンポジウム、2016年

- 2) Yamada, M., Matsuda, S., Matsuda, T.: Application of single-molecule real-time (SMRT™) sequencing technology to mutation assay, 45th European Environmental Mutagenesis & Genomics Society, 2016

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

なし

2. 実用新案登録

なし

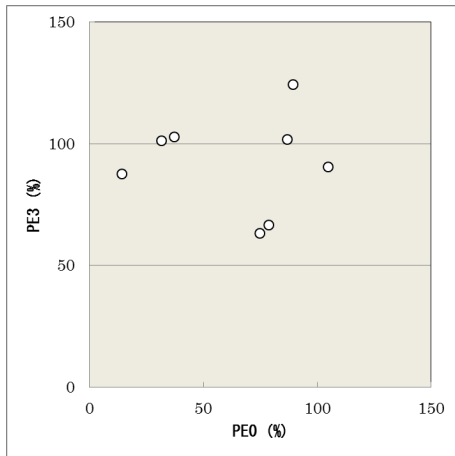
3. その他

なし

表 1 溶媒対照における処理直後 (PE0) と発現 72 時間後 (PE3) の平板効率 (± S9mix 条件)

-S9	B	C	E	K	L	N	O	S	T
PE0	104.8	31.7	74.8	14.3	37.3	363.8	86.7	89.3	78.6
PE3	90.5	101.3	63.1	87.6	102.9	110	101.7	124.3	66.7
+S9	B	C	E	K	L	N	O	S	T
PE0	130.9	50.1	56.1		39.1	388	65.7	70.2	106.5
PE3	108.2	93.1	67.9		81.6	114.3	76.8	80.5	64.9

(a) 代謝活性化系非存在下 (-S9)



(b) 代謝活性化系存在下 (+S9)

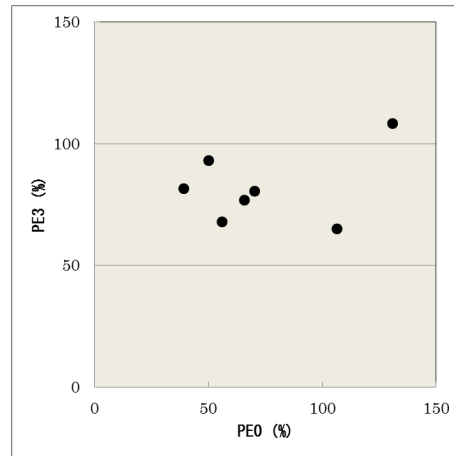


図 1 溶媒対照における処理直後 (PE0) と発現 72 時間後 (PE3) の平板効率の分布

表 2 溶媒対照 (N; 生理食塩水) と陽性対照物質 (MMS/CP) についての突然変異体頻度 (X10⁻⁶)

-S9	B	C	E	K	L	N	O	S	T
N	6.0	18.0	5.8	19.5	8.8	2.6	3.6	6.4	2.8
MMS	30.0	69.4	40.7	41.5	85.5	28.8	23.6	36.3	41.7
+S9	B	C	E	K	L	N	O	S	T
N	3.2	16.9	0		11.2	2.7	2.6	5.0	8.5
CP	-	76.5	7.9		66.8	19.0	7.9	17.3	-

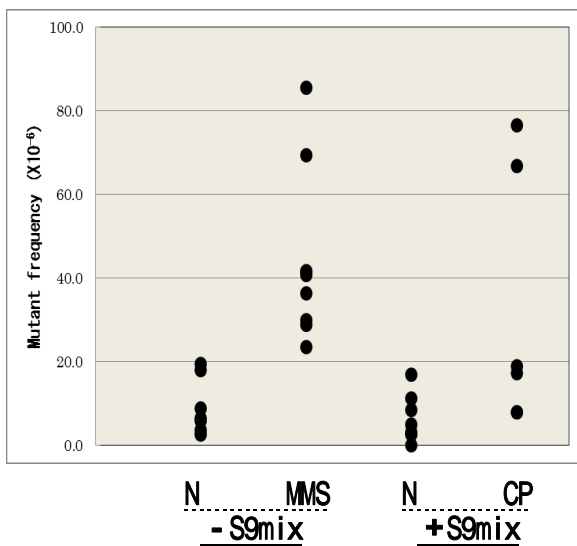


図 2 溶媒対照 (N) と陽性対照物質 (MMS/CP) についての突然変異体頻度
 溶媒は生理食塩水を用いた。MMS、CP はいずれも 5 µg/mL を用いた。

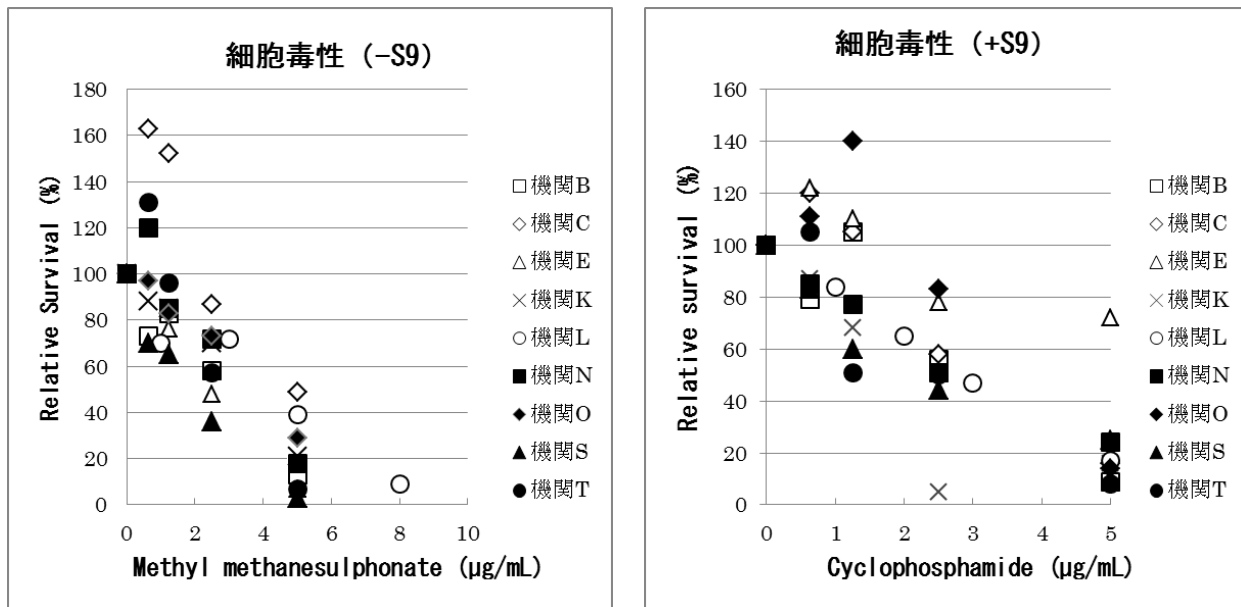


図3 TK6 アッセイにおける細胞毒性 (±S9mix 条件)

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

Bhas42 細胞形質転換試験のプロトコル整備

研究分担者 山影 康次

一般財団法人 食品薬品安全センター 秦野研究所 研究開発部 部長

研究要旨

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は発がん物質の *in vitro* スクリーニング試験である。多くの研究者に利用可能な試験にするため、OECD のガイダンスドキュメントに記載されている 96 ウェルプレート法について吸光度測定による客観的判定法の確立を目指している。

今年度は、メチレンブルー（MB）染色による吸光度法に加え、形質転換巢形成過程における形質転換細胞の増殖に基づく判定基準（カットオフ値）設定を検討した。その結果、主に細胞核を染色する MB 染色による方法が、観察による判定により近似した結果となった。しかしながら、生細胞数測定試薬である WST-8 を用いて培養開始 14 日目と培養終了 21 日目の吸光度の差から細胞増殖率の測定する方法も MB 染色の結果との相関が認められた。このことから、2 つの方法を組み合わせることにより、より正確に形質転換巢を判定できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は発がん物質の *in vitro* スクリーニング試験である。多くの研究者に利用可能な試験にするため、OECD のガイダンスドキュメントに記載されている 96 ウェルプレート法について吸光度測定による客観的判定法の確立を目的としている。

これまで、主に細胞核を染色する MB を抽出し、その吸光度から形質転換巢が形成されているウェルを判定する方法を検討してきた。しかしながら、形質転換巢形成メカニズムに基づく判定法がよりよい判定法であることから、MB 染色以外の科学的根拠に基づく判定法の検討を行った。

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は、細胞の増殖期に化学物質で細胞を処理するイニシエーション試験と細胞がほぼコンフルとなった時期に処理するプロモーション試験からなるが、いずれの方法も細胞増殖が停止している接触障害状態で細胞を維持し、その状態から形質転換した細胞が増殖して形成される形質転換細胞集団（形質転換巢）を検出する試験系である。すな

わち、形質転換細胞の増殖を検出できれば、形質転換巢が形成されたウェルを検出できると考えられる。そこで、細胞毒性が無く、生細胞数を測定可能とされている WST-8 試薬を用いて形質転換細胞の増殖率を測定し、形質転換巢が形成されたウェルを判別する方法を検討した。また、その結果を、これまで実施してきた MB 染色による方法と比較し、その有効性を検討した。

B. 研究方法

96 ウェルプレートの各ウェルに Bhas 42 細胞を播種し、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では陽性対照物質として用いられる 3-methylcholanthrene (MCA) を、プロモーション試験では 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を用いて 96 ウェルプレート法による形質転換試験を実施した。培養終了後、固定した細胞を 0.2% MB 染色し、MB を 0.1 mol/L HCl 水溶液で抽出して吸光度（655 nm）を測定した。また、細胞増殖の測定については、イニシエーション試験およびプロモーション試験ともに、培養開始 14 日目（プロモーション試験の処理終了日）に WST-8 を 5 vol% 添加し、1 時間培養後に吸光度（450

nm) を測定した。その後、各ウェルの培養液または処理液を捨て、細胞を培養液で洗浄して、正常培地で 1 週間培養した。培養開始 21 日目に再度、WST-8 を 5 vol% 添加し、1 時間培養後に吸光度 (450 nm) を測定した (図 1)。吸光度測定終了後、細胞をホルマリン固定し、水洗・乾燥後、0.2% MB 染色し、MB を抽出し、吸光度 (655 nm) を測定した。水洗後、5 vol% ギムザ液 (pH6.8) で染色し、水洗・乾燥後に形質転換巣の形成された陽性ウェルをカウントした。

C. 研究結果

細胞増殖率を測定する前に、播種細胞数と WST-8 による吸光度の相関を調べた。ウェルあたりの播種細胞数を公比 2 で増やし、4 日間培養後に WST-8 試薬を 10 vol% 添加し、1 時間後に吸光度 (450 nm) を測定した。その結果、播種細胞数と吸光度はほぼ直線的相関のあることが確認された (図 2)。

次に、形質転換細胞の増殖率を WST-8 により測定し、形質転換巣が形成されたウェルを判定する方法について検討した。

イニシエーション試験における溶媒 (DMSO) 対照群の培養開始 14 日目、21 日目 (培養終了) の WST-8 の吸光度、および培養開始 21 日目の吸光度から 14 日目の吸光度を引いた吸光度、すなわち、培養終了までの 1 週間の細胞増殖率と陽性ウェルの結果を図 3 に示した。14 日目および 21 日目ともに高い吸光度を示すウェルが必ずしも陽性ウェル (図の赤い棒線、形質転換巣を形成したウェル) ではなかったが、その差をとることにより、WST-8 単独の結果よりも陽性ウェルを吸光度で区別しやすい傾向が認められた。次に、吸光度順に各ウェルを並び替えて、同一プレートの細胞増殖率の結果と MB 染色の結果を比較した (図 4)。その結果、どちらの方法でも陽性ウェルがすべて高い吸光度を示すとは限らなかった。しかしながら、観察による判定では陰性ウェルと判定されたが、ウェル側面に形質転換巣が形成されたウェル (図の白抜き赤い棒線) を陽性ウェルと判断すると、MB の吸光度が高いウェルはほぼ陽性ウェルとなり、これまでの結果と同様に MB の高い吸光

度は形質転換巣を形成していることが確認された。

同様の分析をイニシエーション試験の陽性対照物質である MCA およびプロモーション試験についても行った。MCA については、陽性ウェル数が増えたものの、MB の方がイニシエーション試験の DMSO と同様に陽性ウェル (ウェル側面の陽性ウェルを含む) の半分以上を確実に高い吸光度として検出した (図 5)。一方、プロモーション試験においては、溶媒対照である DMSO 処理群でもイニシエーション試験と同様の傾向を示したが、陽性対照物質である TPA の細胞増殖率は殆どが負の値を示し、明らかに他とは異なる結果となった。MB については、陽性ウェルの吸光度がイニシエーション試験の陽性対照物質である MCA に比べ、ばらつきが大きかったが、傾向としては他とほぼ同じであった (図 6)。

培養途中である培養開始 14 日目に WST-8 を処理した場合と処理しない場合の形質転換率を比較し、WST-8 前処理の影響を調べた (表 1)。その結果、いずれの場合もガイドンスドキュメントの許容基準内の値であったが、WST-8 前処理により形質転換巣の形成された陽性ウェルの数が減少する傾向が認められた。

なお、陰性ウェルと陽性ウェルを区別するために、統計学的手法として判別分析も検討した。すなわち、MB 染色した陰性対照と陽性対照のプレートの既知データ (吸光度とその判定結果) を用いて、陰性ウェルと陽性ウェルを区別する吸光度 (カットオフ値) を統計学的に算出した。この方法は、陰性と陽性のウェルを良好に区別することが可能であったが、吸光度が実験毎にばらつくこの試験に適用することは困難であると考えられた。

D. 考察

現時点では、陰性と陽性ウェルを区別する判定基準の設定方法は、判別分析によるカットオフ値の決定など以外にも様々な方法が考えられるほか、様々な条件設定が必要であり、それらの設定の科学的根拠を求めるとは困難であり、シミュレーションにより決定する必要があると考えられる。

Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験は、接触阻止能を

保有する正常細胞が形質転換し、その細胞が増殖して形成した細胞集落（形質転換巣）を検出する試験である。したがって、増殖停止状態から形質転換して増殖する形質転換細胞の細胞増殖率を測定することにより、形質転換巣を検出できると考えられる。そこで、形質転換細胞が増殖を開始し、実験スケジュールに影響しない方法として、培養開始14日目の培地交換前にWST-8を添加し、その時点での生細胞率を測定し、培養終了21日目の細胞固定前に再度WST-8で生細胞率を測定することにより、7日間の細胞増殖率を測定することを試みた。

イニシエーション試験やプロモーション試験の溶媒対照群では、明らかな形質転換巣を形成したウェルでは7日間の細胞増殖率（21日目の吸光度から14日目の吸光度を差し引いた値）は高い値を示し、期待通りの結果が得られたが、全ての陽性ウェルが必ずしも高い値を示すとは限らず、陰性と陽性のウェルの区別という点ではMBの方が優れていた。また、プロモーション試験の陽性対照群（TPA処理群）では、殆どが負の細胞増殖率を示した。これは、培養開始14日目はプロモーション試験の処理最終日であることから、TPAの作用により細胞の増殖活性が高い状態で生細胞率を測定し、通常培地に交換して細胞活性が低下した7日後にさらに生細胞率を測定したためと考えられる。WST-8は、脱水素酵素により産生されるNADHの酸化還元反応を利用した発色反応であり、今回のWST-8による発色は細胞数に比例した値というよりも、TPA処理による細胞内活性の上昇を反映していると考えられる。また、形質転換誘発はラジカルスカベンジャーによって阻害されることが知られていることから、WST-8処理による形質転換率の低下傾向は、化学物質処理により発生する活性酸素などのラジカルがWST-8と反応したことによる可能性が考えられた。

WST-8前処理による細胞増殖率の測定によって、必ずしも陰性と陽性ウェルの区別はできなかったが、細胞増殖を指標とする方法の有効性やプロモーション試験における被験物質のプロモーション活性への応用も考えられる。

これまでの報告と同様に、MB染色が陰性と陽性ウェルを区別する有力な方法であるが、現時点では、それらを明確に区別できる科学的根拠がない。したがって、この試験の特徴である形質転換細胞の増殖を何らかの方法でとらえ、MB染色と組み合わせることによって、より正確に陽性ウェルを区別できる可能性があると考えられる。

E. 結論

形質転換巣のある陽性ウェルを判定するための基準値（カットオフ値）設定には、MB染色の吸光度利用に加え、この試験系の原理である形質転換細胞の増殖率を加味することで、MB染色単独よりも適切な判定法を設定できる可能性があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

Tsujii S., Ohbayashi T., Yamakage K., Oshimura M., Tada M.: A Cytoplasmic form of Gaussia luciferase provides a highly sensitive test for cytotoxicity, PLoS One. 2016 May 26;11(5):e0156202. doi: 10.1371/journal.pone.0156202. eCollection 2016.

2 学会発表

須藤鎮世、工藤季之、白菊敏之、小枝暁子、小松佳奈、関博、山影康次、山本美佳、若田明裕、松元郷六、森田健：変異原の閾値に関する共同研究：提案と予備試験結果、2016年、第45回日本環境変異原学会

H. 知的所有件の取得状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

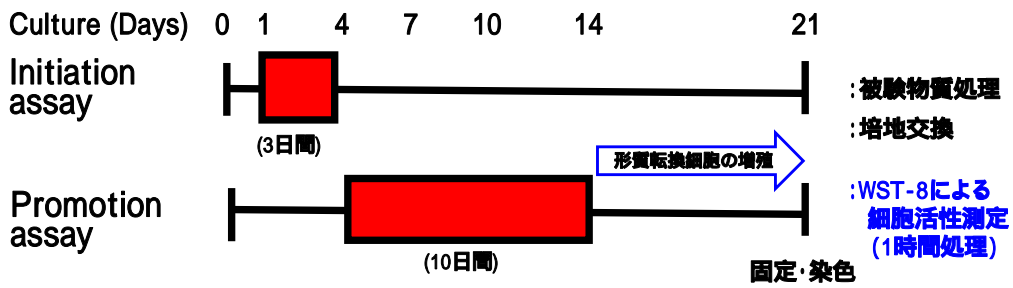
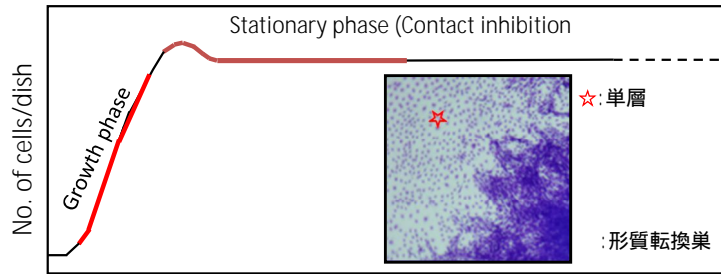


図1 Bhas 42細胞を用いる形質転換試験の細胞増殖に基づく判定法検討実験スケジュール

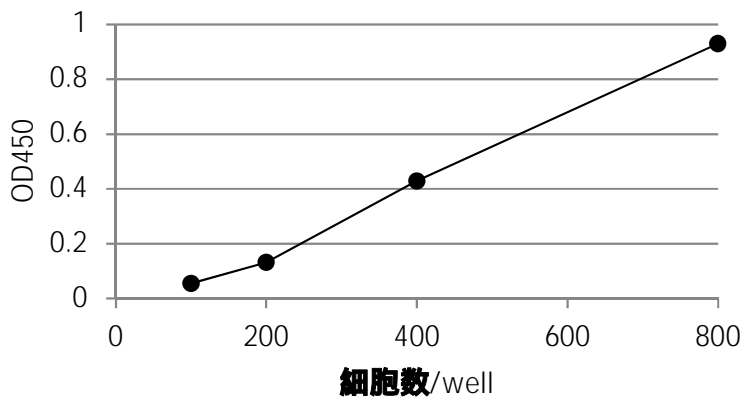


図2 Bhas 42細胞の播種細胞数とWST-8による吸光度の相関性

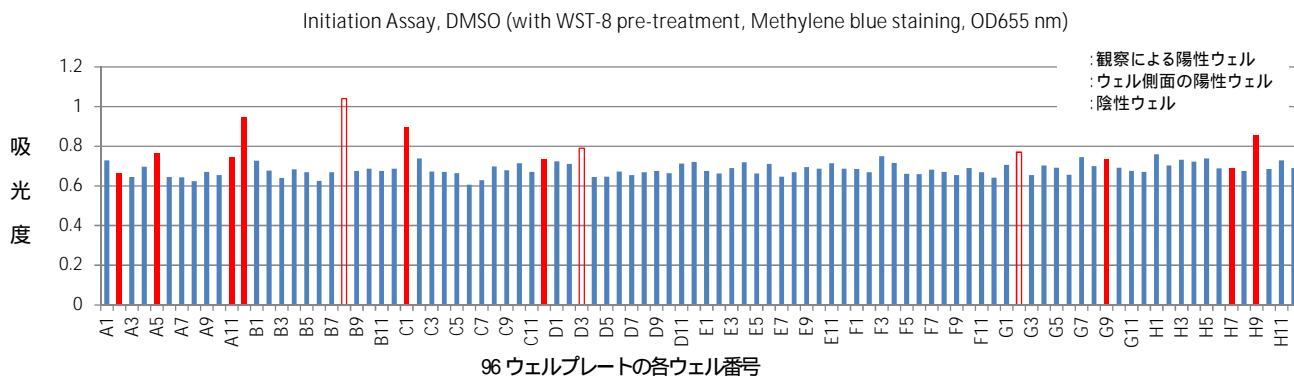
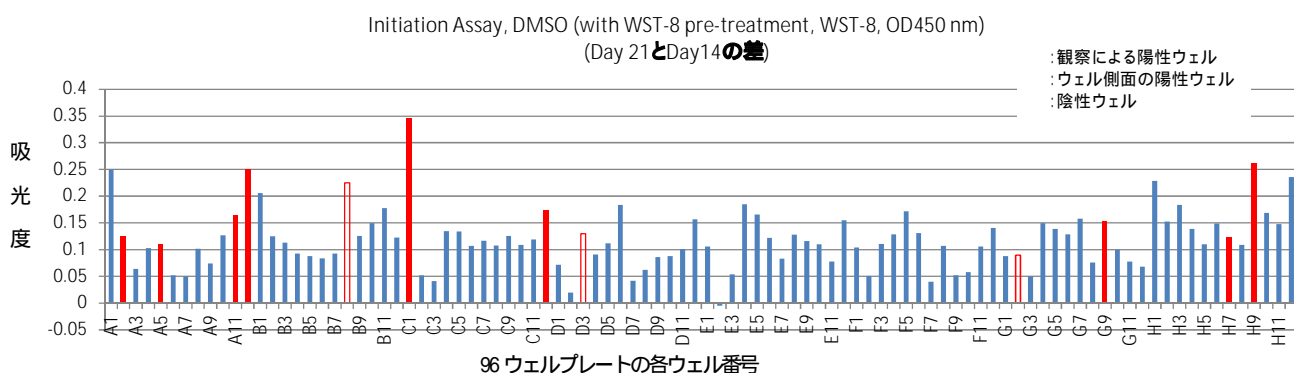
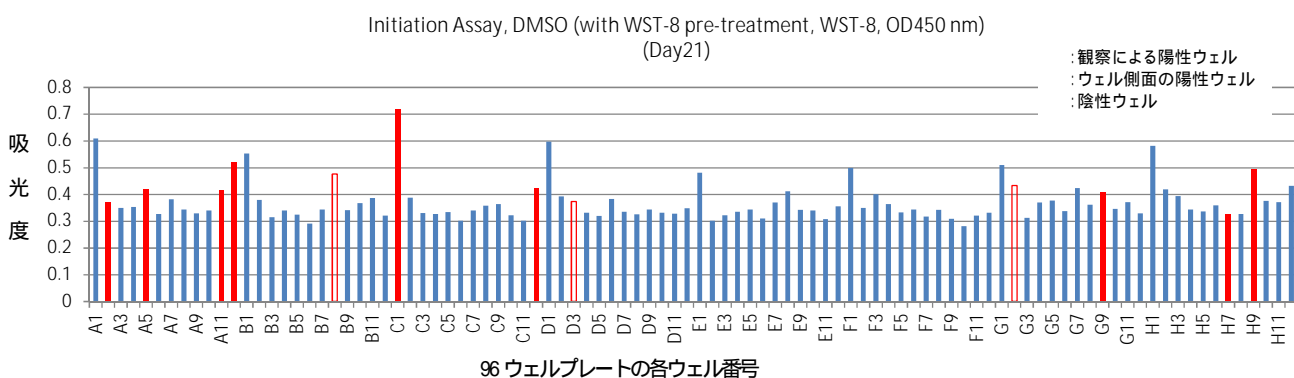
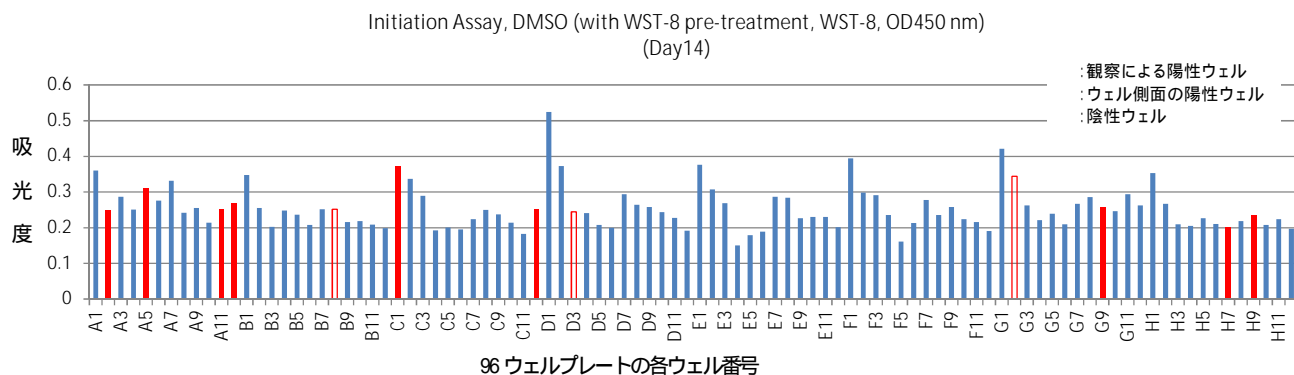


図3 DMSO対照群のイニシエーション試験における培養開始14日後および21日後のWST-8による吸光度(生細胞数)、14日~21日間の吸光度差(細胞増殖率)およびMB染色による吸光度と陽性ウェル(形質転換巢の認められたウェル)の出現パターン

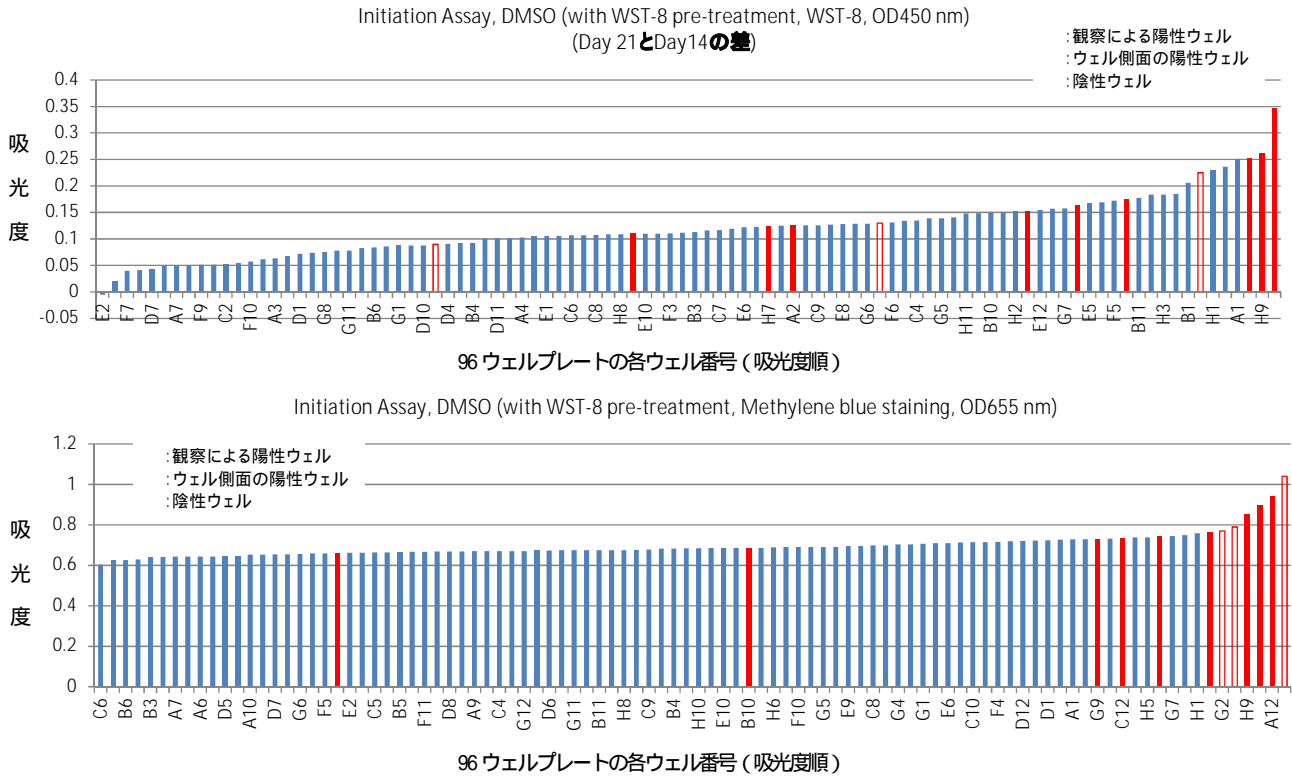


図4 各ウェルの細胞増殖率とMB染色の結果と形質転換薬の形成された陽性ウェルの出現パターン

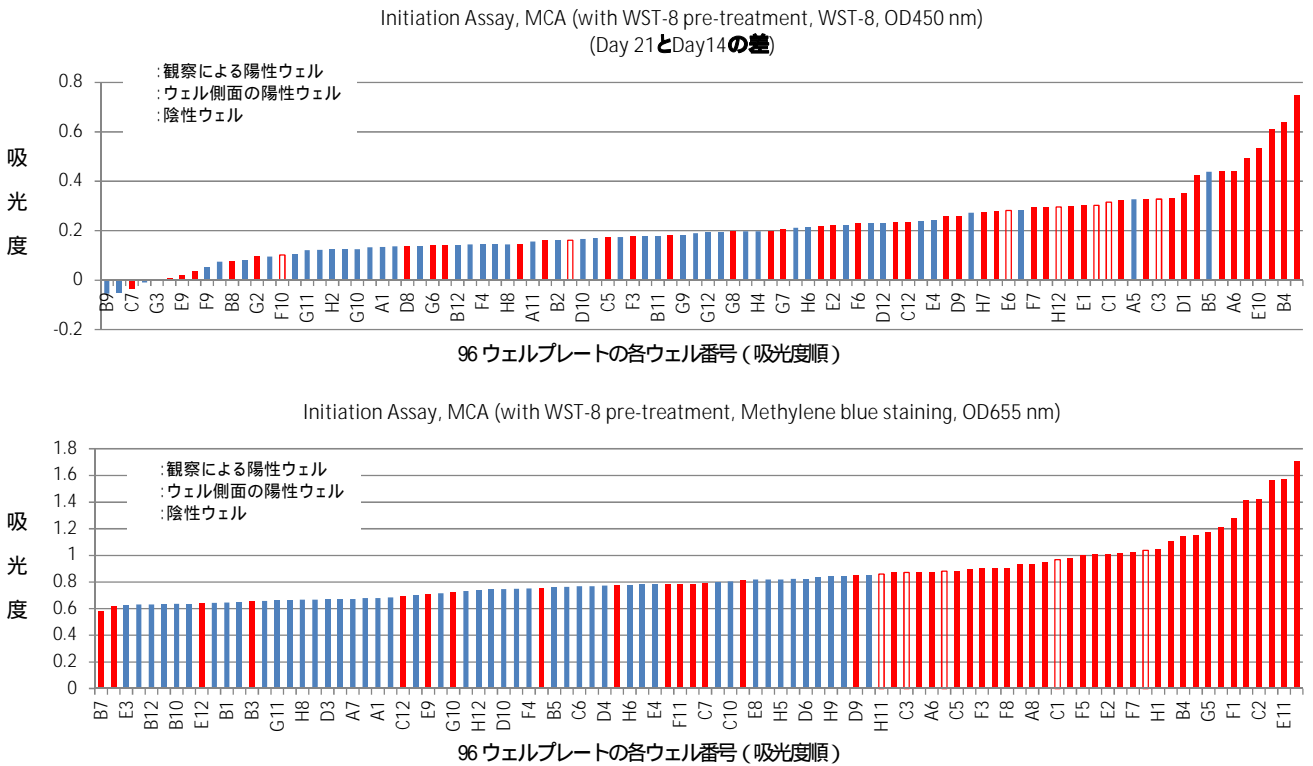


図5 MCAで処理(イニシエーション試験)した場合の細胞増殖率とMB染色の結果と陽性ウェルの出現パターン

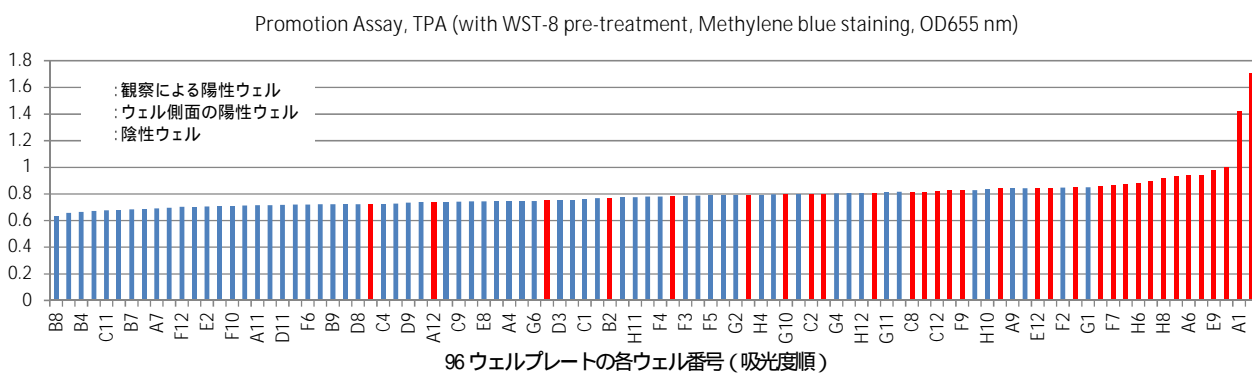
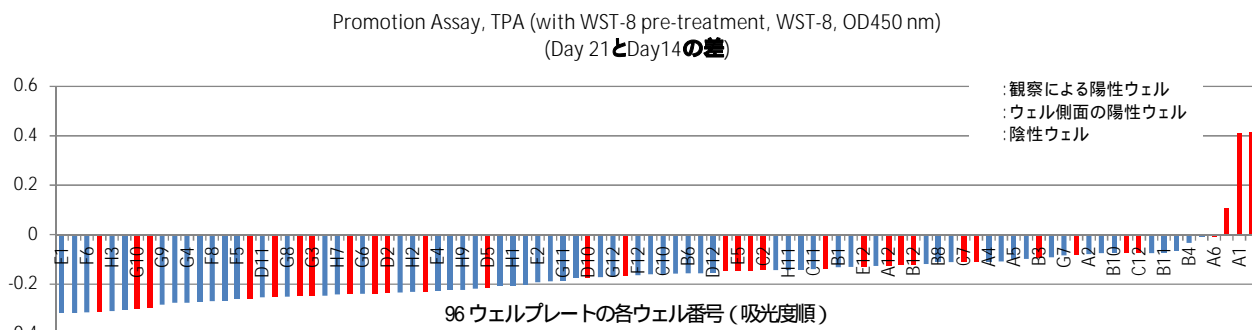
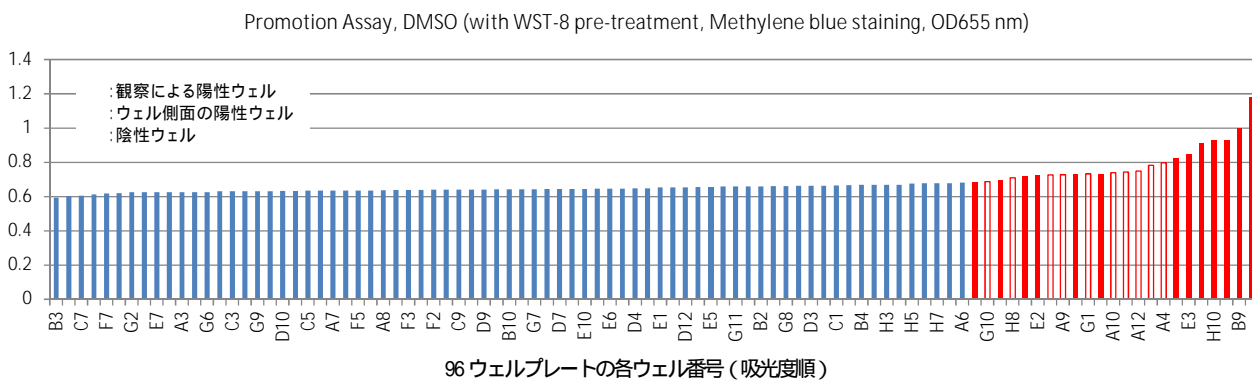
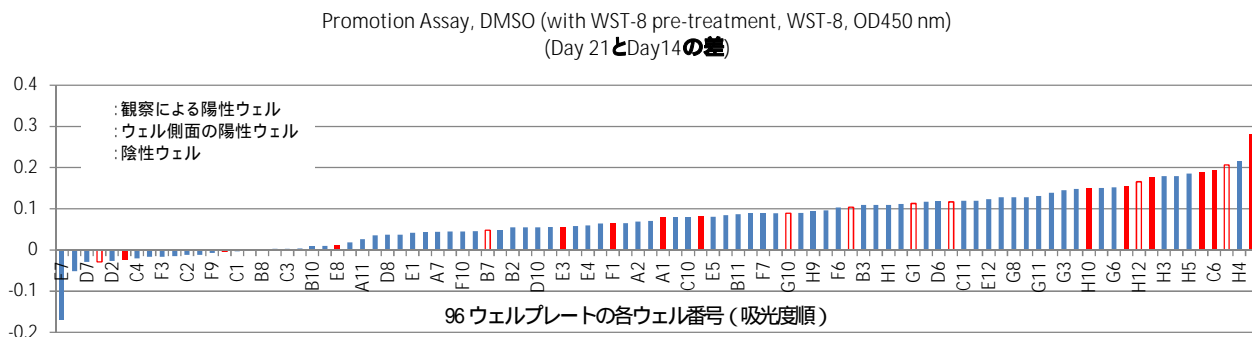


図6 プロモーション試験における細胞増殖率とMB染色の結果と陽性ウェルの出現パターン

表1 形質転換巣誘発に対する WST-8 処理の影響

処理群		陽性ウェル/カウントウェル数	
		WST-8 処理無し	WST-8 処理無し
イニシエーション試験	DMSO	11/96	9/96
	MCA	58/96	43/96
プロモーション試験	DMSO	19/96	12/96
	TPA	57/96	32/96

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) 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 workplan²⁾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¹⁾。

【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¹⁾(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¹⁾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¹⁾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¹⁾。

- 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)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当無し						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hibi D, Yokoo Y, Suzuki Y, Ishii Y, Jin M, Kijima A, Nohmi T, <u>Nishikawa A</u> , Umemura T.	Lack of genotoxic mechanisms in early-stage furan-induced hepatocellular tumorigenesis in gpt delta rats.	J Appl Toxicol.	Feb;37(2)	142-149	2017
Hirata T, Cho YM, Toyoda T, Akagi JI, Suzuki I, <u>Nishikawa A</u> , <u>Ogawa K</u> .	Lack of in vivo mutagenicity of 1,2-dichloropropane and dichloromethane in the livers of gpt delta rats administered singly or in combination.	J Appl Toxicol.			2016

Suzuki, I., Cho, Y-M., Hirata, T., Toyoda, T., Akagi, J., Nakamura, Y., Park, E-Y., Sasaki, A., Nakamura, T., Okamoto, S., Shirota, K., Suetome, N., <u>Nishikawa, A.</u> <u>Ogawa, K.</u>	4-Methylthio-3-butenyl isothiocyanate (<i>Raphasatin</i>) exerts chemopreventive effects against esophageal carcinogenesis in rats	Journal of Toxicologic Pathology	29	237-246	2016
Suzuki, I., Cho, Y-M., Hirata, T., Toyoda, T., Akagi, J., Nakamura, Y., Sasaki, A., Nakamura, T., Okamoto, S., Shirota, K., Suetome, N., <u>Nishikawa, A.</u> <u>Ogawa, K.</u>	Toxic effects of 4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate(<i>Raphasatin</i>) in the rat urinary bladder without genotoxicity	Journal of Applied Toxicology	37	485-494	2017
Matsushita, K., Toyoda, T., Inoue, K., Morikawa, T., Sone, M. and <u>Ogawa, K.</u>	Spontaneous infarcted adenoma of the mammary gland in a Wistar Hannover GALAS rat	Journal of Toxicologic Pathology,	30	57-62	2017
Toyoda, T., Cho, Y-M., Akagi, J., Mizuta, Y., Matsushita, K.,	Altered susceptibility of an obese rat model to 13-week subchronic	Journal of Toxicologic Sciences	42	1-11	2017

<u>Nishikawa, A.</u> , Imaida, K. <u>Ogawa, K.</u>	toxicity induced by 3-monochloropropane- 1,2-diol				
Nonaka, M., Amakasu, K., Saegusa, Y., Naota, M., Nishimura, T., <u>Ogawa, K.</u> <u>Nishikawa, A.</u>	Non-neoplastic lesions found only in the two-year bioassays but not in shorter toxicity studies of rats	Regulatory Toxicology and Pharmacolog y	86	199-204	2017
Cho, Y-M., Hasumura, M., Imai, T., Takami S., <u>Nishikawa A.</u> and <u>Ogawa, K.</u>	Horseradish extract promotes urinary bladder carcinogenesis when administered to F344 rats in drinking water	Journal of Applied Toxicology			In press
<u>小島 肇</u>	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
<u>小島 肇</u>	皮膚毒性評価に関する 最近の話題	評価方法, 第17回日本 毒性学会生 涯教育講習 会テキスト		89-108	2016
Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S, Curren R, Desprez B, Eskes C, Griesinger C,	International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods	Advance in Experimenta l Medicine and Biology	856	343-386	2016

Guo J, Hill E, Roi AJ, <u>Kojima H</u> , Li J, Lim CH, Moura W, <u>Nishikawa A</u> , Park H, Peng S, Presgrave O, Singer T, Sohn SJ, Westmoreland C, Whelan M, Yang X, Yang Y, Zuang V.					
<u>小島 肇</u>	皮膚細胞を用いた最新の in vitro 皮膚安全性評価研究	月刊コスメティックステージ	12	1-4	2016
<u>小島 肇</u> , <u>西川秋佳</u>	日本動物実験代替法評価センター(JaCVAM)平成 27 年度報告書	AATEX- JaCVAM	5(1)	45-56	2016
Yamamoto N, Kato Y, Sato A, Hiramatsu N, Yamashita H, Ohkuma M, Miyachi E, Horiguchi M, Hirano K, <u>Kojima H</u> :	Establishment of a new immortalized human corneal epithelial cell line (iHCE-NY1) for use in evaluating eye irritancy by in vitro test methods	In Vitro Cell. Dev. Biol.- Animal.,	52(7)	742-748	2016
Yamaguchi H, <u>Kojima H</u> , Takezawa T:	Predictive performance of the Vitrigel-eye irritancy test method using 118 chemicals	J Appl Toxicol.	36(8)	1025-1037	2016

小島 肇	皮膚毒性評価に関する最近の話題, 評価方法	第 17 回日本毒性学会生涯教育講習会テキスト		89-108	2016
Uchino T, Kuroda Y, Ishida S, Yamashita K, Miyazaki H, Oshikata A, Shimizu K, <u>Kojima H</u> , Takezawa T, Akiyama T, Ikarashi Y:	Increase of 2-integrin on adhesion of THP-1 cells to collagen vitrigel membrane	Biosci Biotechnol Biochem.	4	1-6	2016
Marx U, Andersson TB, Bahinski A, Beilmann M, Beken S, Cassee FR, Cirit M, Daneshian, Fitzpatrick S, Frey O, Gaertner C, Giese C, Griffith L, Hartung T, Heringa MB, Hoeng J, Jong WH, <u>Kojima H</u> , Kuehnl J, Leist M, Luch A, Maschmeyer I, Sakharov D, Sips AJAM, Steger-Hartmann T, Tagle DA, Tonevitsky A, Tralau T, Tsyb S, Stolpe A, Vandebriel R,	Biology-inspired microphysiological system approaches to solve the prediction dilemma of substance testing	ALTEX.	33(3)	272-321	2016

Vulto P, Wang J, Wiest J, Rodenburg M, Roth A.					
Barroso J, Ahn IY, Caldeira C, Carmichael PL, Casey W, Coecke S, Curren R, Desprez B, Eskes C, Griesinger C, Guo J, Hill E, Roi AJ, <u>Kojima H</u> , Li J, Lim CH, Moura W, <u>Nishikawa A</u> , Park H, Peng S, Presgrave O, Singer T, Sohn SJ, Westmoreland C, Whelan M, Yang X, Yang Y, Zuang V	International Harmonization and Cooperation in the Validation of Alternative Methods	Advance in Experimental Medicine and Biology. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing Springer		343-386	2016
<u>Kojima H</u> .	Safety Assessment of Cosmetic Ingredients	COSMETIC SCIENCE AND TECHNOLOGY: THEORETICAL PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Elsevier		793-803	2017
M. Matsumoto, H. Todo, T. Akiyama, M. Hirata-Koizumi, K. Sugibayashi, Y.	Risk assessment of skin lightening cosmetics containing hydroquinone	Regul Toxicol Pharmacol,	81	128-135	2016

Ikarashi, <u>A. Ono</u> , A. Hirose and K. Yokoyama					
M. Hirata- Koizumi, R. Ise, H. Kato, T. Matsuyama, T. Nishimaki-Mogami, M. Takahashi, <u>A.</u> <u>Ono</u> , 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)benzotri- azole, as possible mechanism of their toxicity and the gender differences	J Toxicol Sci,	41, (5)	693-700	2016
<u>Satomi Onoue</u> , Yoshiki Seto, Hideyuki Sato, Hayato Nishida, Morihiro Hirota, Takao Ashikaga, Anne Marie Api, David Basketter, Yoshiki Tokura:	Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments	Journal of Dermatologi- cal Sciences	85(1)	4-11	2017
Hiroto Ohtake, Yukiko Suzuki, Masashi Kato, Yoshiki Seto, <u>Satomi Onoue</u>	Photosafety testing of dermally-applied chemicals based on photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data	Asian Journal of Pharmaceuti- cal Sciences	11(1)	237-8	2016

Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, <u>Satomi Onoue</u>	Development of fluorometric reactive oxygen species assay for photosafety evaluation	Toxicology in Vitro	34	113-9	2016
Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Sharon Shui Yee Leung, Hak-Kim Chan, <u>Satomi Onoue</u>	Development of an Improved Inhalable Powder Formulation of Pirfenidone by Spray-Drying: In Vitro Characterization and Pharmacokinetic Profiling	Pharmaceutical Research	33(6)	1447-55	2016
<u>Satomi Onoue</u> , Hiroto Ohtake, Gen Suzuki, Yoshiki Seto, Hayato Nishida, Morihiko Hirota, Takao Ashikaga, Hirokazu Kouzuki	Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens	Toxicology in Vitro	33	147-52	2016
Sugiyama K, <u>Yamada M</u> , Awogi T, Hakura A	The strains recommended for use in the bacterial reverse mutation test (OECD guideline 471) can be certified as non-genetically modified organisms	Genes and Environ.	38	2	2016
Wada, K., Kato, Y., Ohnuma-Koyama, A., Takahashi, N.,	2-Nitroanisole-induced oxidative DNA damage in Salmonella	Mutation Research	816	18-23	2017

<u>Yamada, M.</u> , Matsumoto, K.	typhimurium and in rat urinary bladder cells				
Kimoto, T., Horibata, K., (省略 30 名), <u>Yamada, M.</u> , and Honma, M.	The PIGRET assay, a method for measuring Pig-a gene mutation in reticulocytes, is reliable as a short-term in vivo genotoxicity test: Summary of the MMS/JEMS-collaborative study across 16 laboratories using 24 chemicals	Mutation Research,	811	3-15	2016
Tsujii S., Ohbayashi T, <u>Yamakage K.</u> , Oshimura M., Tada M.	A Cytoplasmic form of Gaussia luciferase provides a highly sensitive test for cytotoxicity	PLoS One	May 26;11(5)	e015620 2.	2016