

厚生労働行政推進調査事業費補助金

化学物質リスク研究事業

OECDプロジェクトでの成果物を
厚生労働行政に反映させるための研究
(21KD2003)

令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 平林容子

令和5(2023)年3月

I. 総括研究報告	
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 -----	1
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／平林 容子	
II. 分担研究報告	
1. OECDにおけるAOP, TG及びGDの開発 -----	31
国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部／小島 肇	
2. <i>In vivo</i> と相関性のある <i>in vitro</i> 毒性評価系によるAOP及びTGの実験データ支援 -----	148
東京農業大学 応用生物科学部／美谷島 克宏	
3. 発がん性試験のIATA及びAOP開発 -----	157
国立医薬品食品衛生研究所 病理部／小川 久美子	
4. 発がん性試験におけるAOP及びTGの実験データ支援 -----	167
国立医薬品食品衛生研究所 病理部／豊田 武士	
5. 遺伝毒性のAOP開発 -----	176
国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部／堀端 克良	
6. 免疫毒性のAOP及びTG開発 -----	182
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部／足利 太可雄	
7. Bhas42細胞形質転換試験法のTG開発 -----	187
神奈川県衛生研究所 理化学部／大森 清美	
8. 光毒性のAOP及びIATAの開発 -----	190
静岡県立大学 薬学部／尾上 誠良	
9. 発達神経毒性に起因する行動解析に関する情報収集 -----	205
国立医薬品食品衛生研究所 毒性部／齊藤 洋克	
10. 腎障害・線維化の分子メカニズムに関する研究 -----	210
国立医薬品食品衛生研究所 病理部／松下 幸平	
11. 毒性等情報収集 -----	219
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部／山田 隆志	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	225
IV. 倫理審査等報告書の写し -----	233

別添 3

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）

令和 4 年度総括研究報告書

OECD プロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

研究代表者 平林 容子

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長

研究要旨

本研究は、化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的な合意を推進する経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）の試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）プログラム各国調整官作業グループ（WNT: Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme）において、1) 日本で開発された種々の TG やガイダンス文書（GD: Guidance Document）、有害性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）などの世界各国が必要とする成果物を公定化させること、2) 他国が提案する OECD 大型プロジェクトに関与し、その成果物に日本の主張を反映させること、及び、これらから得られた成果を化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）や毒物及び劇物取締法（毒劇法）などの我が国の厚生労働行政に反映させること、を目的とする。

これまでの先行研究の成果として、我が国で開発された腐食性試験代替法、皮膚感作性試験代替法、光毒性試験代替法、内分泌かく乱性スクリーニング法などに関する TG や免疫毒性の AOP の公定化に寄与し、非遺伝毒性発がんの試験の実施と評価のための戦略的統合方式（IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment）や皮膚感作性試験の確定方式（DASS: Defined Approach for Skin Sensitisation）の開発に関与してきたことが挙げられる。

本研究班では、これらの成果を生かし、本年度、TG に関しては、既存の TG である皮膚感作性試験代替法 ADRA（Amino acid Derivative Reactivity Assay）を含む TG442C の再改定をなすことができた。GD に関しては、*in vitro* 免疫毒性試験の総説（DRP: Detailed Review Paper）が OECD に採択されたが、*in vitro* 生殖毒性試験の総説は論文投稿に留まった。また、OECD で引き続き検討されている DASS や発達神経毒性、非遺伝毒性発がんの IATA に関する大型プロジェクト等に参画して、その成果物に日本の意見や結果を反映させた。この目的を果たすため、TG や AOP それらに必要な補足実験データを取得するとともに、日本から OECD に提出する資料を事前に相互確認し、また、OECD からの意見募集に適切に対応した。

研究分担者

小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所
食品添加物部 特別研究員

美谷島 克宏

東京農業大学 応用生物科学部
食品安全健康学科 教授

小川 久美子

国立医薬品食品衛生研究所
病理部 部長

豊田 武士

国立医薬品食品衛生研究所
病理部 室長

堀端 克良

国立医薬品食品衛生研究所
変異遺伝部 室長

足利 太可雄

国立医薬品食品衛生研究所
安全性予測評価部 室長

大森 清美

神奈川県衛生研究所
理化学部 主任研究員

尾上 誠良

静岡県立大学
薬学部・薬剤学分野 教授

齊藤 洋克

国立医薬品食品衛生研究所
毒性部 研究員

松下 幸平

国立医薬品食品衛生研究所
病理部 主任研究官

山田 隆志

国立医薬品食品衛生研究所
安全性予測評価部 室長

A. 研究目的

本研究は、化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的な合意を推進す

る経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）の試験法ガイドライン（TG : Test Guideline）プログラム各国調整官作業グループ（WNT: Working Group of National Coordinators of the TGs programme）において、1) 日本で開発された種々の TG やガイドラインス文書（GD : Guidance Document）、有害性発現経路（AOP : Adverse Outcome Pathway）や評価のための戦略的統合方式（IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment）などの世界各国が必要とする成果物を公定化させること、2) 他国が提案する OECD 大型プロジェクトに関与し、その成果物に日本の主張を反映させること、及び、これらから得られた成果を化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）や毒物及び劇物取締法（毒劇法）などの我が国の厚生労働行政に反映させること、を目的とする。

B. 研究方法

B-1. AOP の開発

研究分担者の小島は、EAGMST（Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics）で行われている OECD の AOP 開発プロジェクトの進捗に合わせ、班員を支援した。

B-1-1. 免疫毒性の AOP

研究分担者の足利は、日本免疫毒性学会会員をメンバーとする同学会試験法委員会 AOP 検討小委員会に免疫毒性 AOP の開発を委託している（研究分担者も本委員会のメンバー）。文献調査の結果に基づいて、MIE（Molecular Initiating Event）、AO（Adverse Outcome）及びその間に介在する KE（Key Event）を定め、OECD に指定され

た外部（またはscientific）レビュアー及び
コーチの指摘事項に対応することで4つの
AOP開発を進めた。

B-1-2. 発がん性の AOP

研究分担者の小川は、研究協力者西川
とともに、ホルムアルデヒド誘発鼻腔発
がん機序に関する論文に引き続き、各種
化学物質曝露による鼻腔発がん全般の
AOP に関する論文作成を実施した。ラッ
ト、マウス、ハムスターに鼻腔腫瘍を誘
発する化学物質について、PubMed の文献
に加えて、NTP (National Toxicological
Program)、IARC (International Agency for
Research on Cancer)、日本バイオアッセイ
研究センターのデータベースを使用して
情報収集した。誘発された鼻腔腫瘍につ
いて、動物種、投与経路、組織型を分類
し、更には、関連する非腫瘍性病変及び
遺伝毒性のデータについても抽出し、腫
瘍発生経路の推定を取り纏め、投稿した。

B-1-3. 光毒性の AOP

研究分担者の尾上は、開発中の光毒性
AOP を専門家の意見に基づいて改変し、
AOP wiki を更新した。

B-2. TG 及びGD の開発

平林と小島は、OECDのTGの開発プロ
ジェクトWNTの進捗に合わせ、班員を支
援した。

B-2-1. 皮膚感作性試験

小島は、研究協力者の笠原とともに、皮
膚感作性試験代替法 *in chemico* skin
sensitisation、ADRA (Amino acid Derivative
Reactivity Assay) に混合物が評価できる重
量法を加えた TG442C の再改定に向け、尽

力した。また、DPRA (Directive Peptide
Reactivity Assay) の重量法も同 TG に追加
するため、研究協力者の笠原及び小島に加
え、他国の機関 (P&G 及び Givaudan) と
ともに共同研究を主導した。具体的には、
コード化した 10 物質を 4 施設に配布し、合
計 20 物質 (分子量が大きく、バラツキが
生じる可能性の高い感作性物質) を用い、
重量法の施設間再現性を確認するとともに、
既知法であるモル濃度法との比較研究を実
施した。

また、小島は、研究協力者の相場ととも
に、IL-8 Luc assay TG442E の改定案を作成
し、各国からの改定要望に対処した。

小島と足利は、皮膚感作性試験の確定方
式 (DASS: Defined Approach for Skin
Sensitisation) ガイドライン 497 の改定プロ
ジェクトに参加し、他国の専門家と議論し
た。

また、小島と足利は、新たな試験法とし
て、4 月に OECD プログラムに加わった
EpiSensA (Epidermal Sensitization Assay): An
In Vitro Method for Identifying the Skin
Sensitisation Potential of Chemicals の TG 案を
作成した。

B-2-2. 免疫毒性試験

小島は、相場及び国際的な専門家ととも
に、*in vitro* 免疫毒性に関する DRP (Detailed
Review Paper) を作成した。

DRP の承認を待って IL-2 を指標とした免
疫毒性試験 IL-2 Luc assay の TG 案を提出し、
各国からの改定要望に対処した。

足利は、新たな試験法として、4 月に
OECD プログラムに加わった免疫毒性試験
Use of an interleukin-2 luciferase
lymphotoxicity test for identifying the
immunotoxic potential of chemicals that is

caused by anti-proliferative effects : IL-2 Luc LTT assay の TG 採択を目指し、バリデーション報告書の国際 peer review を実施した。免疫毒性の専門家 5 名を reviewer として、本試験法とバリデーション結果を review した。

B-2-3. 生殖毒性試験の DRP

小島は、本分野の国内外の専門家とともに、*in vitro* 生殖毒性に関する総説を作成し、*Current Research Toxicology* に投稿した。

B-2-4. 発達神経毒性に起因する行動解析に関する情報収集

研究分担者の斎藤は、これまでの国内外における発達神経毒性評価の現状について情報収集を行った。発達神経毒性評価の現状についての文献調査には、医学・生物学分野の学術文献検索データベースである PubMed 及び MEDLINE を用いた。また、収集した文献については、記載されている情報の整理を行った。

<文献検索に用いたキーワード>

mice, rats, rodents, neurodevelopmental, developmental, neurotoxicity, test guideline

検索後、タイトル、雑誌情報、アブストラクトを確認し、下記 (1) ~ (3) の内容を含む文献を選択した。

- (1) げっ歯類 (マウス、ラット) を用いた実験報告
- (2) 化学物質曝露による影響評価
- (3) 曝露時期、投与期間、用量等の実験条件や、解析に用いた行動試験の具体的な記載

B-2-5.Bhas42 細胞形質転換試験法の TG 開発

Bhas42 細胞形質転換試験法の TG 開発を目指し、成果論文を *International Journal of Molecular Sciences (IJMS)* に投稿した。

B-3. IATA 開発

B-3-1. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力

OECD では、非遺伝毒性発がん性検出を目的とした IATA 開発が 2016 年から行われている。専門委員会では MoA (mode of action) が議論され、それに基づき IATA 構築の方針が国際合意され、2020 年は専門委員会として総説論文を公表した。MoA を構成する各 KE 及びそれらに対応した 13 の Assay Block において、各種試験法の選出やその利用に関する考え方の作成及び評価を行った。

Step 1 では試験法毎にその利用に関する詳細な情報をとりまとめた考え方を作成し、Step 2 では他のメンバーが試験法の利用に関する考え方の評価案を作成した。Step 2 の評価案をもとに、Assay Block のメンバー全体で協議し、合意したものを Assay Block からの提案試験法とその評価結果としてグループ全体会議に報告した。

小川と西川、大森は、ひきつづき非遺伝毒性発がん性 IATA 開発専門委員会の web 会議に参加し、開発方針に関する議論及び最新の評価方法に関する webinar に参加した。当該 IATA における 13 の Assay Block の内 2 つまたは 3 つをそれぞれ分担し、そのサブグループ会議に参加し、現存の試験法の利用に関する考え方などに関する論文文化について議論した。

B-3-2. 光毒性 IATA

尾上と小島は、OECD 専門家からのコメントに従って、光毒性 IATA 案を改定した。

B-4. AOP 及び TG の実験データ支援

B-4-1. *In vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援

分担研究者の美谷島らは以下に示す研究を実施した。

1) 腸管由来組織における代替法の検討

1-1) *In vivo* モデルにおいて AOP となり得る毒性所見の検討

7 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに DSS (Diocetyl Sodium Sulfosuccinate: MP Biomedicals, MW36,000~50,000 富士フィルム和光純薬(株)) を 1.25、2.5 及び 5.0% の濃度で 7 または 13 日間飲水投与して、投与条件を再検討するとともに、AOP の候補となり得る腸管の炎症病変についての探索を行った。解剖後、小腸及び大腸を採取して、病理組織学的観察並びに遺伝子発現解析を実施した。

1-2) マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

正常 C57BL/6J マウス由来の空腸オルガノイドに TNF- α を培地に添加し、軽度の炎症病変を惹起する実験条件の検討に取り組んだ。添加する TNF- α の濃度は 24-well plate に 15、30 及び 60 ng/mL 濃度になるよう培地に添加した。

Control 群においては PBS のみを添加した。培地容量は、PBS, TNF- α 共に、400 μ L/well とした。それぞれ経時的に 0, 1, 3, 6 及び 24 時間培養した。回収後に遺伝子発現解析と 3 次元的培養の形態的に観察し、オルガノイドにおける炎症病態を検討した。

1-3) 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた平面培養による検討

Caco-2 細胞は、通常培地 (DMEM Low Glu、10% 胎仔ウシ血清 (FBS)、1% 非必須アミノ酸溶液 (NEAA)、1% ペニシリン・ストレプトマイシン) で、12-well plate の各 well に Caco-2 を 4×10^4 cell/mL で播種して 2 日毎に培地交換を行い 2 週間培養した後、DSS をそれぞれの plate の 3well ずつに 1、3 及び 5% で 24 時間曝露した。回収後は遺伝子発現解析に用いた。

さらに、Caco-2 における DSS の影響を観察するため、同条件における蛍光免疫組織学的染色を実施した。Cell culture slide (4-well タイプ) の各 well に Caco-2 を 1.3×10^5 cell/mL で播種した。培地は 400 μ L/well とした。2 日毎に培地交換を行い、2 週間後に DSS を 1、3、5% の濃度で曝露した。DSS 処理後に 3% パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton-X100 で透過処理を行い、更に 1% FBS でブロッキング後、E-Cadherin Rabbit Polyclonal Antibody (ProteinTech) を添加し一晩処理し、Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross Adsorbed Secondary Antibody、Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific) を反応させ、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 添加剤にて封入した。

2) 肝臓における代替法の検討

肝障害、肝線維化の AOP のための実験データを得るため、肝線維化モデル動物における組織学的な基礎データ取得と培養細胞における種々の検討を行った。

肝線維化について、肝線維化モデル動物として、高度な線維化を誘発し得る非アルコール性脂肪性肝炎モデルであるコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸食 (CDAA) を用いた。雄性 F344 ラットな

らび C57BL/6J に、それぞれに適した CDAA を3ヶ月与えて肝線維化を誘導した。病理組織切片を作製し、SOX9 (SRX-box9) 及び CD44 (Cluster of Differentiation 44) に着目して、免疫組織化学染色を行った。また、ヒト培養肝星細胞株 (LX-2) を TGFβ1 10ng/mL 48 時間刺激、あるいはヒト単球細胞株 (THP-1) を LPS 100μg/mL、パルミチン酸 250μM 24 時間刺激を行った際の SOX9 と CD44 の遺伝子発現について検討した。

肝障害について、新鮮ヒト肝細胞 PXB-cell と、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を用い、各種脂肪酸 (パルミチン酸、オレイン酸、エライジン酸、リノール酸、アラキドン酸、EPA、DHA) を 1-1600 μM の濃度で 24 時間曝露し、WST-8 アッセイで細胞毒性を評価した。

B-4-2. 発がん性試験における AOP 及び TG の実験データ支援

分担研究者の豊田は、令和4年度に検索する新規被験物質として、腎毒性/非発がん物質 2 種 : Carboxin (CBX) 及び Fradiomycin sulfate (Neomycin)、腎発がん物質 6 種 : Lead (II) acetate trihydrate (LAT)、1-Amino-2-methylanthraquinone (Disperse orange) 、 3-(4-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (Monuron) 、 Nitrofurantoin (NFT) 、 Phenolphthalein (Phph) 及び Quercetin を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間混餌投与した (各群 5 匹)。腎毒性/非発がん物質の投与濃度は、報告されているがん原性試験及び短期試験における最大耐量として CBX はそれぞれ 0.04% 及び 0.2%、Neomycin は 0.04% 及び 1% に設定した。腎発がん物質については、短期試験における最大耐量として 0.8% LAT、

0.24% Disperse orange、0.2% Monuron、0.25% NFT、5% Phph 及び 4% Quercetin に設定した。

投与期間終了時に解剖し、腎臓及び肝臓の重量を測定した。腎臓の病理組織学的検索を実施するとともに、免疫組織化学的手法による γ-H2AX 形成の定量解析を実施した。右腎横断面において皮質及び髓質外層外帯の特定部位を顕微鏡下 (x400) でそれぞれ4か所撮影し、尿細管上皮細胞の総数ならびに γ-H2AX 陽性細胞をカウントすることで陽性細胞率を測定した。

B-4-3. 遺伝毒性の AOP 開発

分担研究者の堀端は、発がん性の AOP への組み込みを想定し、遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムを構築するため、クロマチン免疫沈降法 (ChIP: Chromatin immunoprecipitation) 及び定量的 PCR を用いた DNA 損傷応答の分子生物学的解析を引き続き実施した。一般的なコーディング DNA 領域と比べて、リボソーム DNA (ribosomal DNA; rDNA) は一細胞あたりヒトでは数百コピーのクラスターを形成しており、また、転写のメカニズムについての知見も豊富であることから、rDNA を ChIP 及び定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答解析の標的領域としている。

紫外線照射による DNA 損傷を誘導した Flp-In 293 細胞を用いて、二本鎖 DNA 切断修復タンパク質として知られる DNA ligase IV (LIG4) を標的とした ChIP を実施し、LIG4 が局在する DNA 画分を調製した。この DNA 画分を鋳型 DNA とし、rDNA unit を転写領域及び非転写領域を含む領域に分けてそれらを標的とした 9 つのプライ

マーセットを用いた定量的 PCR により、DNA 損傷誘導時における LIG4 の rDNA 上での位置的相対量変化を解析することで、DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答の定量・定性的検出を試みた。

B-4-4. 腎障害・線維化の分子メカニズムに関する研究

分担研究者の松下は、昨年度に実施した動物実験により得られた腎臓、血清及び尿サンプルを用いて解析した。その動物実験の概要及び解析方法を以下に示す。

6 週齢の雄性 SD ラットを 3 群に配し (n=5)、媒体である 0.5%メチルセルロースもしくはアロプリノール (APL) を 100 及び 150 mg/kg の用量で 28 日間反復強制経口投与した。最終投与日に全例を代謝ケージに移し、解析用サンプルとして 4 時間採尿した後、さらに 20 時間採尿して尿量を測定した。最終投与 1 日後にイソフルラン深麻酔下において腹大動脈から採血した後、放血により安楽死させて剖検した。得られた血液サンプルを常温下で遠心して血清を分離した。剖検時に腎臓の一部を 10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、残りの組織は液体窒素にて瞬間凍結もしくは OCT コンパウンドにて凍結ブロックを作製して、-80°Cにて保存した。

全群について 10%中性緩衝ホルマリンで固定した腎臓組織を用いて定法に従いパラフィン包埋、薄切 (4 μm) し、HE 染色及び膠原線維を赤色に染色するシリウスレッド染色を施して病理組織学的検索を行った。免疫組織学的解析により CD44、 αSMA ($\alpha\text{-smooth muscle actin}$)、AQP1 (aquaporin1)、N-cadherin、vimentin 及び fibronectin の発現を解析した。また CD44 と各種因子の局在を解析するため二重蛍光

免疫染色を行った。同一宿主の 2 種類の抗体を用いる場合は、チラミッドシグナル増幅法により染色を実施した。さらに fibronectin をコードする *Fnl* の mRNA の局在を *in situ* hybridization 法により解析した。

また対照群及び 30 mg/kg 群の凍結ブロックを薄切 (16 μm) し、on ice で迅速 HE 染色を施した。対照群の正常尿細管及び 30 mg/kg の線維化病変内の尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取した。得られたサンプルから total RNA を抽出して増幅処置を行い、マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析した。正常尿細管と比較して 30 mg/kg 群の線維化病変内の尿細管において発現の変動していた遺伝子群を抽出し、Gene ontology (GO) 解析及び Ingenuity® Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行った。

尿中タンパクを精製及び濃縮した後、ウェスタンブロッティング法により CD44 発現を解析した。また ELISA 法により血清中 CD44 値を測定した。また瞬間凍結した腎臓組織から total RNA を抽出し、total CD44 及び CD44 standard isoform に対するプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、遺伝子発現量を解析した。

統計学的解析として、各データについて一元配置分散分析 (ANOVA) を実施した後に Dunnett 法による多重検定を行った。また 2 つの因子の相関関係を解析するためスピアマンの順位相関係数を求めた。有意水準は 0.05 に設定した。

B-5. OECD に提出する資料の事前確認と OECD からの意見募集への対応

平林は、WNT の Bureau として OECD 活動に協力するとともに、研究班内に文書検討グループを組織し、日本から OECD に提

出する資料を事前に相互確認し、また、OECD からの提案資料への意見募集に適切な意見を返した。また、今秋、日本から提出した SPSF (Standard Project Submission Form) の内容を検討した。

平林と小島は、emerging technologies in the Test Guidelines Programme のワークショップに関与し、今後の TG の在り方について議論した。

B-6. 国際情報調査

平林は、日本化学工業協会 森協力研究者とともに、ヒト健康、生態影響、環境影響の TG の開発状況、並びに GD 及び AOP の開発状況について、調査した。

B-7. 毒性等情報収集調査

分担研究者の山田は、OECD IATA Case Studies Project における事例研究の公開資料^{*1} から、幾つかを題材として、AOP の IATA への活用に関する調査を行った。提出されたケーススタディと、対応する review コメントの内容を対象とした。

^{*1}<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>

2019 年に提出されたケーススタディ「AOP に基づく *in vitro* 試験とリードアクロスによるデグエリンのパーキンソン病リスクの評価」、「ミトコンドリア複合体 III を介したアゾキシストロビンの神経毒性 - 他のストロビルリンによるリードアクロス」、2019-4: 「IATA を用いて p-アルキルフェノールのリードアクロスに情報を提供: 反復投与毒性」、2018 年に提出された「エストロゲン受容体活性物質のスクリーニングのための IATA に関するケース

スタディ」の計 4 件のケーススタディを対象に調査を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物福祉の 3Rs (Replacement、Reduction、Refinement) に配慮して、各施設における動物実験委員会の承認のもとに基本指針を遵守して実施し、動物使用数や動物に与える苦痛は最小限に留めた。

腸管組織における検討においては、マウス回腸由来のオルガノイド培養組織を実施するにあたりマウスを使用した。ただし、その使用は最少匹数に留め、東京農業大学動物実験委員会より承認を受けた申請内容に則り実施した。

国立医薬品食品衛生研究所の実験は、動物の数は最小限にとどめ、実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

ボランティア及びヒト組織は使用しなかった。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 の開発

C-1-1. 免疫毒性の AOP

1) TLR (Toll-like receptor) 7/8 への結合による乾癬様皮膚疾患の増悪: AOP313

樹状細胞に存在する TLR7/8 への結合が、樹状細胞の成熟と IL-23 の産生、Th17 による IL-17 の過剰発現を誘導し、最終的に乾癬様の皮膚疾患を生じさせるという AOP である。本 AOP については、コーチの指摘事項への対応方針 (汎用性向上のために、関連する AOP の KE とネットワークを構築できるよう KE 及び KER (Key Event Relationship) の修正などをコーチに伝えた上で AOPwiki の修正を行った。

2) 免疫細胞に存在する ER (Estrogen Receptor)の活性化による全身性リテマトーデス(SLE)の増悪：AOP314

さまざまなタイプの免疫細胞に存在する ER の活性化が Th2 タイプのサイトカイン (IL-4)の過剰発現を誘導し、自己抗体産生 B 細胞の誘導から最終的に自己免疫疾患である SLE を増悪させるという AOP である。本 AOP については、KER をサポートする実験情報の少なさや、AO の特殊性から AO 及び KE の大幅な見直しを検討したが、コーチからの指摘に対応するための情報が不足していることから、外部 review を経た OECD AOP wiki への掲載を断念し、一般の総説として Toxicology letter 誌の掲載を目指し原稿の作成を行った。

3) JAK3 の阻害による T 細胞依存的抗体産生抑制：AOP315

非受容体型チロシンキナーゼの 1 つである JAK3 の阻害により IL-4 産生が抑制され、最終的に T 細胞依存性抗原 (TDAR) の阻害となるという AOP である。本 AOP については、コーチによる内部 review が終了しており、外部 review の進め方についてコーチを介して OECD に確認したところ、OECD と基本合意を締結したジャーナルかメンバー国等による外部 review のどちらか選択すべきと回答があった。そこで OECD と基本合意を締結した ALTEX (Alternatives to Animal Experimentation) 誌に投稿の意向を伝えたところ、代替法開発につながる AOP かどうか不明という指摘があった。これに対し、TDAR のような免疫抑制を *in vitro* 試験で置き換えるには、IL-2, IL-4 といったサイトカインの産生を指標にする試験法の組み合わせが有効であると OECD の *in vitro* 免疫毒性試験法に関する DRP に記載があり、本 AOP の KE3 が IL-4 の抑制で

あることから将来 IL-4 産生を指標とする *in vitro* 免疫毒性試験法の開発につながることを指摘する予定である。また、外部 review として ALTEX 誌掲載に向け原稿の見直しを行った。

4) IL-1 receptor 結合阻害：AOP277

昨年度より本分担研究に追加されたものであり、IL-1 β のレセプター結合阻害により T cell の活性化が抑制され、最終的に易感染性となるという AOP である。本 AOP はすでに OECD による外部 review (scientific review) に入っており、scientific review report における主な推奨事項は、IL-1R シグナルを阻害するストレスに特異抗体だけでなく化合物/医薬品を加えること、AP-1 など NF- κ B が関与しない経路も考慮すること、T cell のタイプを明確にすること、増加する感染のタイプを明確にすることなどであった。これらの指摘に対し、対応案を作成し、AOP wiki の大幅な修正を行った。特に大きな変更点は、AO を測定可能な指標である TDAR (日本で開発され、すでに OECD で承認された AOP154 の AO と共有) に変更したことである。こうした対応の結果、scientific review は終了の見通しとなった。

C-1-2. 発がん性の AOP

網羅的に情報収集した鼻腔発がん物質のうち 40 種の吸入曝露による発がん物質 (ラット 38 物質、マウス 11 物質、ハムスター 5 物質) 及び 38 種の非吸入曝露による発がん物質 (ラット 36 物質、マウス 5 物質、ハムスター 17 物質) について誘発された鼻腔腫瘍を、国際統一毒性病理用語・診断基準 (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria: INHAND) に基づいて分類した結果、扁平

上乳頭腫、扁平上皮癌、腺腫、腺癌、腺扁平上皮癌、神経上皮癌、未分化癌、非特異的な癌、線維肉腫、血管腫、血管肉腫、粘表皮腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫が報告されていた。最も高頻度の鼻腔腫瘍は扁平上皮癌であり、投与経路に関係なく認められ、その前駆病変として、扁平上皮化生及び/または扁平上皮乳頭腫と呼吸上皮過形成が示唆された。2番目に多いのは腺癌であり、その前駆病変として主に嗅上皮過形成が示唆されたが、腺腫の前駆病変は呼吸上皮病変と考えられた。これらの経路はげっ歯類間で共通していると考えられるが、マウスまたはハムスターのデータは限定的であった。本内容について、論文化を進めた。

C-1-3. 光毒性の AOP

OECD の専門家会議で意見を求め、光刺激性に絞った AOP を作成した。光吸収に伴う化学物質の光反応が光毒性のトリガーであるとのコンセプトに基づき、UV/VIS 吸収を pre-MIE として定義した。またそれに伴う MIE は励起化合物からの ROS 産生とし、次いで cell injury を KE、最終的な Tissue response を inflammation とした。

C-2. TG 及び GD の開発

C-2-1. 皮膚感作性試験

一昨年度から検討を続けてきた *in Chemico* Skin Sensitisation、ADRA の中に混合物が評価できる重量法を加える TG442C の再改定案を作成した。WNT で議論された結果、重量法を加えた TG442C の再改定が 2022 年 9 月に公表された。引き続き、OECD から要請を受け、TG442C に追加する DPRA 重量法に関する共同研究を主導した。その結果、20 物質すべてでモル濃度法

と重量法が一致した結果となることを確認した。

また、IL-8 Luc assay TG442E の改定案を作成し、7 月に OECD に提出し、改定に関する議論を各国の専門家と行った。

一昨年 TG497 として公表された DASS の改定に参画し、日本の方法である ADRA と IL-8 Luc assay をガイドライン 497 に加えるべく、協力した。

新たな試験法として、4 月に OECD プログラムに加わった EpiSensA: An *In Vitro* Method for Identifying the Skin Sensitisation Potential of Chemicals の TG 採択に向け、バリデーション報告書と peer review 報告書を OECD に提出した。

C-2-2. 免疫毒性試験

In vitro 免疫毒性試験の DRP の採択に向けて尽力した結果、本年 9 月に公表された。また、IL-2 を指標とした免疫毒性試験 IL-2 Luc assay の TG 案を OECD に提出し、WNT 意見募集を受けて改定した。

また、足利は、IL-2 Luc LTT assay の国際 peer review については、以下に示す 5 名の免疫毒性の専門家を reviewer に任命し、本試験法及びバリデーション報告書について review report の作成を目指し、評価を行った。

- ✓ Henk van Loveren (Maastricht University),
- ✓ Haley Neff-LaFord (Seattle Genetics, Inc.),
- ✓ Barbara Kaplan (chair, Mississippi State University),
- ✓ Takayuki Yoshimoto (Tokyo Medical University),
- ✓ Chiyomi Kubo (Chugai Pharmaceutical)

その結果、バリデーション報告書の修正が必要とされ、修正案をバリデーション実行委員会に依頼した。

C-2-3. 生殖毒性試験の DRP

国際的な専門家とともに、*in vitro* 生殖毒性に関する DRP の作成をこの一年継続して実施してきた。成果の一つとして論文が、本年 5 月に *Current Research Toxicology* に受理された。ただし、この論文をもとに OECD で DRP を作成することは断念した。

C-2-4. 発達神経毒性に起因する行動解析に関する情報収集

文献検索の過程で、Mundy らの Review (Expanding the test set: Chemicals with potential to disrupt mammalian brain development, *Neurotoxicol. Teratol.*, 2015) をもとに、発達神経毒性に関する文献における行動解析の利用頻度を把握するため、その内容をまとめた。その結果、神経発達への影響を示すデータのある化学物質 (97 物質) において、組織学的な解析、あるいは神経化学的解析とともに、多くの文献では行動解析を採用し、それらの組み合わせにより評価していた。文献によっては行動解析が単独で用いられており、論文数に対する利用頻度は最も多かった。

これまでガイドラインに準拠した化学物質の評価状況については、先行文献より、米国環境保護庁 (EPA) 又は OECD TG 426 に準拠して発達神経毒性 (DNT 試験が実施された農薬のうち、その試験成績が審査当局に提出されたものは、米国における 2008 年段階での承認農薬数は約 1150 有効成分、欧州においては 2020 年段階で 479

有効成分であるという情報を得た (発達神経毒性の欧米での評価状況及び *in vitro* 発達神経毒性試験の検討状況調査 独) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部 2020 より)。

上記情報に加え、発達神経毒性評価に係る毒性情報として昨年度までに収集した文献 (95 報) について、被験物質の種類及び行動解析の項目ごとに論文数の整理を行った。その結果、被験物質については、農薬 (16 報)、医薬品 (25 報)、産業化学物質 (52 報)、その他 (6 報) であった。行動解析の項目については、認知機能 (受動回避試験、モリス水迷路等) を用いた文献が最も多く (71 報)、次いで運動及び感覚機能 (オープンフィールド試験、ロータロッド試験等) を用いたものが多かった (60 報)。上記 2 項目と比較すると数は少ないが、社会性 (超音波発声、ホームケージ、3 チャンバーテスト等) の行動解析を取り入れている文献も存在した (13 報)。また、社会性の評価が可能な試験を取り入れている文献は、主に農薬のぼく露影響を評価したものであった。これら収集した文献については、今年度追加した文献とともに順次情報の整理を行い、ガイドラインの使用実績を含め、最終年度へ向けたリスト化を行っている (計 122 報について実施中)。

また、JaCVAM 発達神経毒性資料編纂委員会のオブザーバーとして委員会に参画するとともに、*in vitro* DNT ガイダンス文書 (Guidance on the Interpretation of Data from DNT *In-Vitro* Testing Assays for Use in IATA) に関しては、OECD 事務局に提出するコメント募集に応じた。昨年度と同様に、神経行動毒性の評価系、特に *in vivo* 試験を行っている立場から、本ガイダンスの改善点・

懸念点として、*in vitro* テストバッテリーにおいて観察された神経細胞の分化や神経突起の伸長への影響の生物学的な意味づけの限界、そして *in vivo* 試験において観察された行動異常との対応の限界について記載する必要性について強調した。

C-2-5. Bhas42 細胞形質転換試験法の TG 開発

Bhas 42 CTA におけるプロモーション試験で陽性対照物質である 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を被験物質とした場合の継時的な網羅的遺伝子発現解析結果を論文“Gene Expression over Time during Cell Transformation Due to Non-Genotoxic Carcinogen Treatment of Bhas 42 Cells”として International Journal of Molecular Sciences (IJMS) に投稿し掲載された。さらに本論文は、OECD への提出資料とされるため、NGTxC・IATA の議長である Dr. Miriam N. Jacobs らによって IJMS の Special Issue である“Advances in Mechanism Based Toxicity and Hazard Assessment of NGTxC Chemicals”に収載された。

C-3. IATA の開発

C-3-1. 非遺伝毒性発がん性 IATA 開発への協力

小川は cell proliferation 及び resistance to apoptotic cell death のサブグループに、西川は cell transformation、indicator of oxidative stress 及び resistance of apoptosis cell death のサブグループに参画している。小川は cell proliferation のサブグループにおいて、細胞増殖の評価に関する論文の *in vivo* 評価法の留意点について分担執筆し、2023年2月17日には、各ブロックの進捗状況につい

て、web 会議にて情報共有を行い、全体の取り纏めが図られた。

また、大森は、Block 3 で既に評価され、全て A 評価を得た 3 種の Cell Transformation Assay (SHE Cell Transformation Assay (SHE CTA)、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA) の NGTxC・IATA への適用として review を共著にて執筆している。

C-3-2. 光毒性 IATA

作成した AOP を基盤として、その枠組みのなかで information sources をマッピングした。光毒性に関与する elements としては、(i) Exposure consideration、(ii) Chemical descriptors、(iii) Skin penetration、(iv) Photoexcitation、(v) oxidative stress、(vi) cell injury を定義し、それらに関わる information sources をリスト化した。この中には *in vitro* 試験、*in vivo* 試験のみならず、*in silico* や QSAR モデルも含めた。また、OECD 専門家会議における有識者の助言に従い、information source に対して詳細な記述を加えることとし、具体的には (1) Regulatory use、(2) Validation & regulatory acceptance status、(3) Potential role in the IATA、(4) Description、(5) Scientific basis including MoA、(6) Protocol available、(7) Strengths and weakness、(8) Applicability domain and limitations、(9) Predictive capacity、(10) Reliability を各種文献情報やガイドラインを交えつつ追記した。また、これらの information sources を組み合わせた包括的光安全性評価に関して decision tree を新たに提案し、IATA にあくまでも一例として記述した。

C-4. AOP 及び TG の実験データ支援

C-4-1. *In vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援

1) 腸管由来組織における代替法の検討

1-1) *In vivo* モデルにおいて AOP となり得る毒性所見の検討

DSS 飲水投与により、2.5%は投与10日目に2匹、1.25%は投与11日目に1匹が顕著な体重減少と全身状態の悪化により切迫解剖した。動物の状態悪化を考慮して1.25及び2.5%は13日間、5%は7日間の投与とした。大腸の病理組織学的観察では、DSS 濃度に依存して、粘膜のびらん・潰瘍、F4/80 陽性マクロファージの増加、炎症性細胞浸潤領域が拡大し、病変が顕著な個体では炎症は筋層にまで及んでいた。病変は DSS がより高濃度で短期に発症に発症し、その程度も強くなることが明らかとなった。さらに、粘膜上皮におけるムチン産生を示唆する PAS 染色陽性像は2.5%以上で増加し、糞便中のムチン量も2.5%で増加傾向を示した。大腸における遺伝子発現解析では、炎症関連因子として、DSS2.5%ないし5%において IL-10、IL-1 β 、HMGB1 の発現増加、5%において細胞接着に関連した TJP-1 の発現増加傾向、ムチン MUC2 の発現減少が見られた。

1-2) マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

各種条件において TNF- α を添加してオルガノイドにおける MIP-2 (IL-8 のマウスホモログ: CXCL2) の遺伝子発現に注目して観察したところ、より短時間の添加において濃度依存的な増加が見られた。さらに、オルガノイドの免疫組織化学的染色において、TNF- α の添加により細胞接着に関連する e-Cadherin、ZO-1 発現が低下した。

1-3) 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた平面培養による検討

Caco-2 細胞を2週間 Pre 培養後、DSS を培地に添加 24h インキュベートした条件において、免疫組織化学的に 1%DSS 以上で細胞間接着への傷害が見られたが、e-Cadherin 発現への明らかな影響は見られなかった。

SOX9 は、ラット・マウス共に、胆管上皮細胞の他、肝線維化に沿って著明な発現増加がみられた。マウス組織において種々の検討を行ったところ、SOX9 は Sirius Red 陽性部位と一致した。SOX9 は、活性化細胞星細胞である α -smooth muscle actin (α SMA) とは部分一致にとどまり、胆管上皮細胞である Cytokeratin 19 (CK19) との一致を認めた。CD44 は、ラット CDAA において著明な遺伝子発現を示し、病理組織においては一部の胆管に陽性を示した。CD44 陽性胆管上皮周囲に、ヒアルロン酸結合タンパクの沈着を認めた。一方、マウスの CDAA モデルにおいて CD44 は、マクロファージ様の細胞に著明な発現増加を認めた。

LX-2 細胞においては、TGF β 1 の刺激でコラーゲン type1 及び type4 の発現増加がみられたが、SOX9 及び CD44 発現に変化はみられなかった。THP-1 細胞において、LPS ならびにパルミチン酸刺激で TNF α の発現増加がみられ、SOX9 と CD44 は、LPS 刺激で発現の増加、パルミチン酸刺激で発現上昇傾向を示した。

肝細胞の脂肪毒性評価において、PXB-cell と Huh7 では、飽和または一価不飽和脂肪酸の脂肪酸曝露による細胞毒性が生じる濃度は同程度であったが、多価不飽和脂肪酸は Clone 9 と比較して HepG2 の低濃度曝露で細胞毒性を示した。

C-4-2. 発がん性試験における AOP 及び TG の実験データ支援

対照群及び各被験物質投与期間終了時点で、Disperse orange、Monuron、NFT 及び Quercetin 投与群において有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量は NFT 投与群で低値の傾向を示した。

0.2% CBX、LAT、Monuron、NFT 及び Quercetin 投与群では腎相対重量の有意な増加が、0.04% CBX 及び 1% Neomycin 投与群では腎相対重量の減少が、Disperse orange 投与群では腎絶対重量の減少が認められた。また、Disperse orange 投与群で肝絶対・相対重量の増加、Monuron、Phph 及び Quercetin 投与群で肝相対重量の増加、NFT 投与群で肝絶対重量の減少、1% Neomycin 投与群では肝絶対及び相対重量の減少が観察された。

CBX 投与群では再生尿細管の形成がみられ、高用量（0.2%）群ではさらに尿細管上皮の変性壊死及び髄質における鉍質沈着が認められた。LAT 投与群では、尿細管上皮細胞における核の大型化が認められた。Neomycin 投与群では、明らかな腎病変は観察されなかった。

CBX、Neomycin 及び LAT 投与群の腎尿細管上皮細胞における γ -H2AX 形成を免疫組織化学的に検討した結果、対照群では陽性細胞は稀であったのに対し、LAT 投与群では皮質・髄質外層外帯ともに γ -H2AX 陽性率の有意な増加が認められた。腎毒性/非発がん物質投与群では、0.2% CBX 投与群の髄質外層外帯において γ -H2AX 形成の有意な増加がみられたのに対し、0.04% CBX 投与群では対照群と同じレベルにとどまった。一方、Neomycin 投与群では 0.04%/1%いずれの用量においても γ -H2AX 形成の誘導は認められなかった。

C-4-3. 遺伝毒性の AOP 開発

遺伝毒性初期応答反応の早期検出システム構築に用いた rDNA unit 上のプライマーセット H1~H42.9 の内、H1~H13 は転写領域、H18~H42.9 は非転写領域を検出できる。DNA 損傷を誘発しない条件において、LIG4 共沈 DNA 中には rDNA unit 全領域の H1~H42.9 がほぼ均一に存在しているが、紫外線 DNA 損傷誘発時の LIG4 共沈 DNA 中には特に H18 及び H27 の DNA 領域が多く存在することが示された。

C-4-4. 腎障害・線維化の分子メカニズムに関する研究

シリウスレッド染色及び α SMA 免疫染色では、それぞれの陽性面積が APL 投与群では対照群と比較して有意に増加していた。HE 染色標本を用いた病理組織学的解析において、APL 投与群における線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮していた。免疫組織学的解析ではこれらの尿細管は CD44 陽性を示し、APL 投与群の CD44 陽性尿細管は対照群と比較して有意に増加していた。また、CD44 陽性尿細管の数はシリウスレッド陽性面積及び α SMA 陽性面積と正の相関を示した。蛍光二重免疫染色では、APL 投与群において CD44 陽性尿細管の周囲に α SMA 陽性反応が確認された。

マイクロアレイでは、正常尿細管と比較して拡張/萎縮尿細管では 1462 遺伝子の発現が上昇しており、1484 遺伝子の発現が低下していた。GO 解析では、拡張/萎縮尿細管において細胞外基質に関連する遺伝子群の発現が上昇しており、トランスポーター及び代謝といった尿細管の分化に関わる遺伝子群の発現が低下していた。パスウェイ解析では、CD44 は fibronectin

の産生に関わる *Fnl* を含む線維化関連遺伝子群の発現を誘導していることが示された。

免疫染色により尿細管の分化マーカーの発現を検索した結果、拡張/萎縮尿細管では AQP1 及び N-cadherin の発現が減弱あるいは消失しており、これらの因子に陽性を示す尿細管の数は APL 投与群において対照群と比較して有意に減少していた。また AQP1 及び N-cadherin に陽性を示す尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と負の相関を示した。蛍光二重免疫染色では、CD44 は AQP1 及び N-cadherin と排他的な発現を示した。間葉系マーカーの検索では、拡張/萎縮尿細管は vimentin 及び α SMA に陽性を示し、これらの因子に陽性を示す尿細管の数は APL 投与群において対照群と比較して有意に増加していた。また vimentin 及び α SMA に陽性を示す尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と正の相関を示した。蛍光二重免疫染色では、CD44 は vimentin 及び α SMA と同一の尿細管において発現していた。

Fibronectin の免疫染色では拡張/萎縮尿細管の周囲間質に陽性反応が認められた。Fibronectin 陽性面積は APL 投与群において対照群と比較して有意に増加しており、CD44 陽性尿細管の数と正の相関を示した。蛍光二重免疫染色では、CD44 陽性尿細管の周囲に fibronectin の陽性反応が認められた。一方 *in situ* hybridization において、*Fnl* mRNA の発現は間質の線維芽細胞に加えて APL 投与群の拡張/萎縮尿細管においても認められた。

ウエスタンブロッティング法による CD44 の発現解析では、腎臓組織中及び尿中に CD44 特異的なバンドが確認された。APL 投与群では対照群と比較して尿量の有

意な増加を認めたことから、尿の濃縮は生じていないと考えられた。また ELISA 法による解析では、血清中 CD44 値が APL 投与群において対照群と比較して有意に増加しており、血清中 CD44 値は腎臓における CD44 陽性尿細管数及びシリウスレッド陽性面積と正の相関を示した。また定量 PCR により APL 投与群では CD44 standard isoform が高発現していることが示された。

C-5. OECD に提出する資料の事前確認と OECD からの意見募集への対応

C-5-1. OECD 文書の公定化

本年度、日本の方法を除き、以下の TG 及び GD が公定化された。これらの採択にあたり、日本の多くの専門家がコメントを寄せ、開発に寄与した。

1) TG の公定化

- Draft New Test Guideline on Defined Approaches for Serious Eye Damage/Eye Irritation and Supporting document (project 4.136 led by France)
- Draft Test Guideline 492B on Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) Test Method for Eye Hazard Identification (project 4.143 Led by France)
- Draft updated Test Guideline 442E with new Annex for GARDTMSkin for skin sensitisation (project 4.106 led by Sweden)
- Draft updated Test Guideline No. 488 on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays (project. 478 led by Canada)
- Draft New Test Guideline on the Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation Assay (project 4.93 led by the United States)

2) GD の公定化

- Draft Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified methods for Reconstructed human Epidermis for Phototoxicity testing (project 4.138 led by the United States)
- Draft revised Guidance Notes on Dermal Absorption Studies (project 4.115 led by EFSA and Germany)
- Draft Detailed Review Paper on the miniaturised versions of the Ames test (project 4.109 led by Belgium/United States/Netherlands)
- Study Report and Preliminary Guidance on the adaptation of the *in vitro* micronucleus testing TG 487 for nanomaterials safety testing (project 4.95 led by the United Kingdom and Germany)

3) Emerging technologies in the Test

Guidelines Programme に関するワークショップ

小島は、Lesson and Learned for a Validation Study という演題で8月31日に講演した。この演題を含め20以上の発表会が数か月に渡り事前に開催され、これらの演題を受けて、平林が12月に開催されたワークショップに参加した。ワークショップでは以下の議題について議論され、今後のTGの在り方について意見交換がなされた。

- ✓ Test method readiness (issue 1)
- ✓ Evolving the concept of Performance Standards (issue 2)
- ✓ Proposal for a new section of Test Guidelines for mechanistically relevant and reliable methods that are not stand-alone (issue 3)
- ✓ Developing guidance in GD 34 on validation for batteries of assays (issue 4)

- ✓ How to incentivise participation in validation studies (issue 5)
- ✓ Better reporting of (Test Guidelines) study results ((issue 6)

C-5.2 SPSF

本年11月に日本から以下のSPSFを提出した。提出にあたり、厚生労働省とも内容を調整した。

- 1) Proposal for α -Sens[®] as FBS-free test system for detecting Key Event 2 (ARE-Nrf2 activation) of skin sensitization
- 2) Proposal for TG 493 (Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) *In Vitro* Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity) performance and acceptability criteria to make it realistic

C-6. 国際情報調査

ヒト健康、生態影響、環境影響のTGの開発状況、並びにガイダンスドキュメント及びAOPの開発状況について、継続した調査を行っている。

C-7. 毒性等情報収集調査

毒性等情報収集では、厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業（公募型）で実施された成果を、IATAのコンセプトに基づいた安全性評価やその基盤となるAOP開発に役立てるため、年次報告書を精査した。令和2年度は最終年度であり、令和元年度からの進展は、試験物質の拡充、分析対象の拡大、確立した評価系による試験データの体系的な入手が中心となっている。

各公募型研究課題の分担課題を、令和2年度報告書をもとにAOPのスキームに

沿ってマッピングした。いずれも毒性がよく知られている化合物（AOP に作用する stressor に相当）を用い、分子レベル、細胞レベル、個体レベルでの解析（KE に相当）がバランスよく配置されていたが、毒性物質と生体分子との相互作用（MIE に相当）の情報が欠失しており、このことが将来 AOP を作成する際の主要なデータギャップとなると予想された。

OECD IATA Case Studies Project の調査では、AOP を活用した事例研究を 4 件取り上げ、それぞれの概要、用いられた AOP、各国からの review コメントの内容を精査し、個々の事例研究の優位性ととも、AOP を用いた IATA の課題などを整理した。

D. 考察

D-1. AOP の開発

免疫毒性の AOP314 については、コーチによる内部 review に対応してきたが、汎用性や確度の高い情報の不足から、外部 review を断念し、一般的な総説として公表することを念頭に検討している。AOP313 は EAGMST 内部 review、AOP315 については、外部 review に進んでおり、AOP277 については、外部 review に対応し、採択が近い。

発がん性の AOP に関しては、wiki に入力するのではなく、論文受理を持って研究終了を見越している。

光毒性の AOP に関しては、既に wiki に入力した AOP 案をさらに推敲し、外部評価に資するものに結実させる。

D-2. TG 及び GD の開発

免疫毒性や生殖毒性試験などの全身毒性に関する *in vitro* TG の開発は前例がなく、これまで以上に時間を要しており、費用も嵩んでいる。即ち、OECD は、こうした前

例のない TG を開発するために、まずは DRP の作成を求めており、数年掛かりで免疫毒性と生殖毒性試験の GD 作成を進めてきた。本年、*in vitro* 免疫毒性試験の DRP を開発できたものの、生殖毒性試験の DRP 開発を断念した。その理由として、DRP の開発は *in vitro* 生殖毒性試験 Hand1-Luc EST の TG 開発を目指したものであったが、開発者の住友化学株式会社がかこれ以上の開発を望まないと表明したことによる。新規試験法の導入は、行政的には慎重であるべきとは思いますが、時間的なロスを解消しない限り、Emerging technologies の導入は難しいと予想している。

発達神経毒性に関しては、*in vitro* DNT ガイダンス文書への対応の参考となるような情報として提供できるよう引き続き、協力していく。

D-3. IATA の開発

非遺伝毒性発がん性の IATA 開発に関しては、この開発で得られた情報をもとに、Bhas42CAT の SPSF に繋げていく予定である。

光毒性 IATA 案はすでに各国からの意見募集期間に入ったので今後はコメントや指摘事項に対応して修正作業を行う予定である。

D-4. AOP 及び TG の実験データ支援

D-4-1. *In vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援
1) 腸管由来組織における代替法の検討

今年度は腸管障害の評価におけるエンドポイントを見出すため、*in vivo* モデルにおける炎症病態誘発の条件検討、*in vitro* 系における軽度の炎症惹起、粘膜保護作用に関わる因子への影響に着目した検討を通し

MIP-2、細胞接着関連因子、ムチン産生などが腸管毒性を評価する際の指標として、新たな AOP の提示にも繋がる可能性があるものと考えられた。

2) ラット及びマウス CDAA モデルの組織学的検討

正常または腫瘍肝細胞における脂肪毒性に対する評価において、前年度と異なる細胞株で実験を実施した本年度も、特に多価不飽和脂肪酸曝露に対する細胞毒性が異なることが明らかとなった。今後、この機序について精査する予定である。

D-4-2. 発がん性試験における AOP 及び TG の実験データ支援

令和3~4年度にかけて、腎発がん物質の早期検出における γ -H2AX 免疫染色の有用性を検証した。令和4年度は、新規被験物質として腎毒性/非発がん物質 2 種及び腎発がん物質 6 種についてラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における病理組織学的検索及び γ -H2AX 形成の免疫組織化学的解析を行った。

現時点で腎毒性/非発がん物質 2 種 (CBX 及び Neomycin) 及び腎発がん物質 1 種 (LAT) の解析が終了しており、LAT は腎尿細管上皮細胞での γ -H2AX 形成を有意に増加させることが明らかとなった。引き続き残る 5 種の腎発がん物質について、 γ -H2AX 陽性細胞の定量解析を実施する予定である。

D-4-3. 遺伝毒性の AOP 開発

LIG4 を標的とした ChIP 及び rDNA unit 領域の定量的 PCR 法は ChIP に用いる抗体をアレンジすることで解析の標的タンパク質を自在に設定できる。今後は化学物質による DNA 損傷誘導時、そしてこれま

での解析対象以外の DNA 損傷応答タンパク質や DNA 修復・複製タンパク質等を標的とした同様の解析により、この試験法の発がん性・遺伝毒性 AOP 開発に対する高い有効性を示すことができる。

D-4-4. 腎障害・線維化の分子メカニズムに関する研究

CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。今後はシクロスポリン A 等の他の剤を用いて腎線維化モデルラットを作製し、同様に CD44 の機能及びバイオマーカーとしての可能性を検証する予定である。

D-5. OECD に提出する資料の事前確認と OECD からの意見募集への対応

OECD で今年から始まった Emerging technologies in the Test Guidelines Programme への対応は、国際的な合意形成が難しい問題である。研究代表者の平林は WNT の Bureau であるとともに、安全性生物試験研究センター長でもあることから、本問題については、厚生労働省の担当者とも連携を図り、引き続き、日本として適切な対応を心掛けていく。

D-6. 毒性等情報収集調査

OECD IATA Case Studies Project では、AOP を全身毒性評価の IATA へ活用した事例が増えつつある。AOP のグラフィカルな表現は、読者の理解に役立つ。AOP を様々な MIE/KE/Adverse Outcome の試験と共に安全性評価で使用する場合、AOP と様々な試験との整合を示す情報を含めることが求められる。

AOP は、リードアクロスなどに毒性機序に基づく類似性仮説の構築に有用であ

ることは、広く認識されている。AOP を構成する KE を測定する *in vitro* 試験は、毒性予測の不確実性を減少させ、信頼性を高める上で有効であると考えられている。とはいえ、OECD で承認された AOP は、現状では数は限られている。OECD で承認されていない AOP の IATA への利用に当たっては、毒性作用のベースにある化学的・生物学的メカニズムがどの程度明確に示されているか。その不確実性を議論することが求められている。また、ヒトを含めて種の保存性の情報も重要である。AOP を IATA に活用していくためには、上記を含む様々な経験を関係者が共有することが有用である。残り期間でさらにいくつかの事例研究の調査を進めつつ、詳細な調査結果をまとめる予定である。

E. 結論

TG に関しては、日本主導で取り組んできた *in Chemico* Skin Sensitisation、ADRA TG442C の再改定が公表された。GD として、*in vitro* 免疫毒性試験の DRP が公表された。引き続き、各国の専門家ともに、TG、GD や IATA 開発を進めていく。

支援研究に関しては、1)腸管並びに肝臓における *in vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系指標を見出した。2) γ -H2AX 免疫染色を用いることで、腎発がん物質の早期検出が可能であることが示唆された。3)CD44 の腎線維化における役割の一端を明らかにすることができ、さらに腎線維化のバイオマーカーとなる可能性を示した。4)ChIP 及び rDNA 領域の定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答の解析手法により DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答を定量・定性的かつ早期に検出で

きた。これらの結果から、実験的に AOP 及び TG の支援に繋がる知見が得られた。

今後も、OECD プロジェクトに日本の意見や結果を反映させ、引き続き厚生労働行政に活用できるよう調査を進めていく所存である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Yuda M, Aizawa S, Tsuboi I, Hirabayashi Y, Harada T, Hino H, Hirai S. Imbalanced M1 and M2 Macrophage Polarization in Bone Marrow Provokes Impairment of the Hematopoietic Microenvironment in a Mouse Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Biol Pharm Bull.* 2022;45:1602-1608.
2. Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Kuwagata M, Ochiya T, Kitajima S, Hirabayashi Y. EV (Extracellular Vesicle)-associated mi RNAs as Biomarkers of Toxicity, In: *Genomic and Epigenomic Biomarkers of Toxicology and Disease* Ed: Sahu S.C. Chichester, *Wiley*, 2022: p37-62.
3. JPMA 課題対応チーム (13 名), ICH S6 対応研究班 (5 名). 核酸医薬品の非臨床安全性評価における疑問と考え方について, *医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス*, 2022;53 (3), 211-218.
4. Kimura Y, Yasuno R, Iwaki T, Fujimura C, Ohmiya Y, Nakajima Y, Omori T, Corsini E, Inoue T, Rogen EL, Kojima H, Aiba S. An international validation study of the interleukin-2 luciferase leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) to evaluate potential immunosuppressive chemicals and its

- performance after use with the interleukin-2 luciferase assay (IL-2 Luc assay), *Toxicol In Vitro*. 2022;88:105535.
5. Imamura M, Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Nakashima N, Kojima H, Ono A, Kasahara T. Applicability of ADRA (4 mM) for the prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods to evaluate key events, *J Appl Toxicol*. 2022;42(7): 1159-1167.
 6. Yamamoto Y, Fujita M, Watanabe S, Yamaga H, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Kojima H, Kasahara T, Ono A. Within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of amino acid derivative reactivity assay (ADRA) using a 0.5 mg/mL test chemical solution: Results of the study for reproducibility confirmation implemented in five participating laboratories, *J Appl Toxicol*. 2022;42(6): 1078-1090.
 7. Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Watanabe S, Yamaga H, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Kojima H, Kasahara T, Ono A. The within- and between-laboratories reproducibility and predictive capacity of Amino acid Derivative Reactivity Assay using 4 mM test chemical solution: Results of ring study implemented at five participating laboratories, *J Appl Toxicol*. 2022;42(2):318-333.
 8. Piersma AH, Baker NC, Daston GP, Flick B, Fujiwara M, Knudsen TB, Spielmann H, Suzuki N, Tsaïoun K, Kojima H. Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity, *Current Research in Toxicology*, 2022;3, 100074.
 9. Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Kojima H, et al. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2022;247(1):1-75.
 10. 小島肇, 渡辺美香. 一般財団法人食品薬品安全センターにおける代替法研究, 秦野研究所年報, 2022;45:8-17.
 11. Uno K, Miyajima K, Toma M, Suzuki-Kemuriyama N, Nakae D. CD44 expression in the bile duct epithelium is related to hepatic fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis rats induced by a choline-deficient, methionine-lowered, L-amino acid diet. *J Toxicol Pathol*. 2022;35(2):149-157.
 12. Toyoda T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals. *J Toxicol Pathol*. 2022; 35: 283-298.
 13. Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from *o*-toluidine and *o*-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci*. 2022; 47: 457-466.
 14. Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci*. 2022; 189: 51-61.
 15. Akane H, Toyoda T, Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa

- K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *J Appl Toxicol.* 2022; 42: 1603-1617.
16. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic homo- and hetero-dimers of *o*-toluidine, *o*-anisidine, and aniline formed by *in vitro* metabolism. *Chem Res Toxicol.* 2022; 35: 1625-1630.
17. Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage. *Nat Commun.* 2022; 13: 5854.
18. Grúz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama KI. Potent mutagenicity of an azide, 3-azido-1,2-propanediol, in human TK6 cells. *Mutation Research*, 2022:876–877, 50347531.
19. Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama KI, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse. *Fundamental Toxicological Sciences*, 2022;9(2), 31-36.
20. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K. Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan. *Toxicology Reports* 9, 2022, 1008-1012.
21. Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes and Environment*, 2022:44, 24
22. Ohtake H, Tokuyoshi Y, Iyama Y, Nukaga T, Nishida H, Ohtake T, Hirota M, Yamada K, Seto Y, Sato H, Kouzuki H, Onoue S. Reactive oxygen species (ROS) assay-based photosafety screening for complex ingredients: Modification of the ROS assay protocol. *J.Toxicol. Sci.*, 2022;47(11): 483-492.
23. Nakamura K, Kambayashi A, Onoue S. Quantitative assessment of disintegration rate is important for predicting the oral absorption of solid dosage forms containing poorly soluble weak base drugs. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022;180: 23-32.
24. Halder S, Mibe Y, Rikimura S, Kuromi K, Sato H, Onoue S. Strategic application of liposomal system to R- α -lipoic acid for the improvement of nutraceutical properties. *Drug Dev Ind Pharm*, 2022;48: 239-246.
25. Sato H, Yamane C, Higuchi K, Shindo T, Shikama H, Yamada K, Onoue S. Development of stabilized fuzapladib solution for injection: forced degradation study and pharmacokinetic evaluation. *Pharm Dev Technol*, 2022;27(5): 565-571.
26. Banik S, Yamada K, Sato H, Onoue S. Development of poly (lipoic acid) nanoparticles with improved oral bioavailability and hepatoprotective effects

- of quercetin. *Molecular Pharmaceutics*, 2022;19(5): 1468-1476.
27. Yamada K, Hayashi Y, Sasaki K, Higuchi K, Shindo T, Shikama H, Sato H, Onoue S. Nanocrystal solid dispersion of fuzapladib free acid with improved oral bioavailability. *Biopharm Drug Dispos*, 2022;43(3): 89-97
28. Yamada S, Niiya R, Ito Y, Kato Y, Onoue S. Comparative characterization of β -adrenoceptors in the bladder, heart, and lungs of rats: Alterations in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Sci.*, 2022;148(1): 51-55.
29. 高橋祐次, 齋藤洋克, 栞形麻樹子, 北嶋聡. 加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, *Jpn J Clin Toxicol*. 2022;35, 255-259.
30. Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kijima A, Nohmi T, Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in *gpt* delta rats. *Food Chem Toxicol*. 2022; 168: 113365.
31. Murayama N, Yamada T, Yamazoe Y. Application of CYP1A2-Template system to understand metabolic processes in the safety assessment. *Food Safety*. 2022;10(4), 129-139.
32. Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Miura M, Ohata H, Katsutani K, Matsumoto M, Hirose A. Formation and evaluation of mechanism-based chemical categories for regulatory read-across assessment of repeated-dose toxicity: a case of hemolytic anemia. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 2022;136, 105275.
33. Yamada T, Katsutani K, Maruyama T, Kawamura T, Yamazaki H, Murayama N, Tong W, Yamazoe Y, Hirose A, Combined risk assessment of food-derived coumarin with *in silico* approaches. *Food Safety*. 2022;10(3), 73-82.
34. 山田隆志 : Cefic LRI/ILSI Europe Joint WorkshopでのCarcinogen Dose Response Database for Threshold of Toxicological Concern (TTC) の概要ならびにTTCに関する近年の国際動向. *イルシー*. 2022;150, 4-12.
35. Murata Y, Umamo T, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Masumura K, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VIII) *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 2022;140, 54-60.
36. Fujita M, Nakashima N, Wanibuchi S, Yamamoto Y, Kojima H, Ono A, Kasahara T. Assessment of commercial polymers with and without reactive groups using amino acid derivative reactivity assay based on both molar concentration approach and gravimetric approach, *J Appl Toxicol*. 2023;43(3);446-457.
37. Uno K, Miyajima K, Ogawa S, Suzuki-Kemuriyama N, Nakae D. Effects of *Siraitia grosvenorii* extract on nonalcoholic steatohepatitis-like lesions in Sprague Dawley rats fed a choline-deficient, methionine-lowered, l-amino acid-defined diet. *J Toxicol Pathol*. 2023;36(1):1-10.
38. Colacci A, Corvi R, Ohmori K, Paparella M, Serra S, Carrico IR, Vasseur P, Jacobs NM, The Cell Transformation Assay: A Historical Assessment of Current Knowledge of Applications in an Integrated Approach to Testing and Assessment for Non-Genotoxic Carcinogens, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023;24(6),

- 5659.
39. Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol*. 2023; 175: 113702.
40. Ghosh A, Banik S, Suzuki Y, Mibe Y, Rikimura S, Komamoto T, Kuromi K, Yamada K, Sato H, Onoue S. Lysophosphatidylcholine-based liposome to improve oral absorption and nephroprotective effects of astaxanthin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023;103(6): 2981-2988 .
41. Saito H, Tanemura K, Furukawa Y, Sasaki T, Kanno J, Kitajima S. Behavioral effects induced by the oral administration of acetaminophen in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci*. 2023;48(4), 203-210.
42. Sasaki T, Saito H, Furukawa Y, Tominaga T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci*. 2023: 48(4), 211-219.
43. Murata Y, Natsume M, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M: In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes and Environment*. 2023;45(1);12.
44. Toyoda T, Sone M, Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. *J Toxicol Sci*. in press
45. Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol*. in press
- G-2. 学会発表**
1. 森川朋美, 豊田武士, 赤根弘敏, 松下幸平, 小川久美子. ラットを用いたオリゴガラクチュロン酸の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験. 日本食品化学学会第28回総会・学術大会 (2022. 5.20, 東京)
 2. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. AKIからCKDへの移行におけるCD44の役割とバイオマーカーとしての応用. 第65回日本腎臓学会学術総会 (2022. 6.1, 神戸)
 3. 安部賀央里, 成田和人, 小林睦, 立花滋博, 村崎亘, 鈴木政晴, 頭金正博, 足利太可雄. 機械学習アプローチを用いた in silico モデルによるヘアカラー原料の皮膚感作性強度予測, 第 47 回日本化粧品学会 (2022.6.10, Virtual)
 4. 桑原菜摘, 袴田雅俊, 浅沼俊倫, 山下里恵, 山田幸平, 佐藤秀行, 尾上誠良. 「白びわ抽出物由来の機能性化粧品素材開発 -カフェ酸誘導体の光保護作用評価-」, 第 47 回日本化粧品学会 (2022.6 .10, 東京)
 5. Kojima H. Approach to New Approach Methods developed by Japan in OECD WNT, ICCA-LRI Workshop 2022 (2022.6.20, 横浜)
 6. 磯貴子, 村田康允, 重田善之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. Evaluation of the in vivo mutagenicity of Carbendazim. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30. 札幌)

7. 村田康允, 磯貴子, 重田義之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. The gene mutation test of styrene using the transgenic mouse. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30. 札幌)
8. 足利太可雄. THP-1細胞の活性化を指標にしたナノマテリアル(NM)の *in vitro* 免疫毒性試験法の開発, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
9. 村崎亘, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 足利太可雄. 機械学習アプローチによる皮膚感作性強度を予測する回帰モデルの開発, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
10. 勝谷成男, 山田隆志, 村山典恵, 山崎浩史, 山添康, 広瀬明彦. 食品中に含まれるクマリンの肝毒性リスク評価についての *in silico* アプローチ, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
11. 飯島一智, 鈴木美穂, 三浦結美, 西田明日香, 大野彰子, 足利太可雄. 未分化および分化 THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの免疫毒性評価, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
12. 宇野 絹子, 美谷島 克宏, 当摩 茉莉花, グエンハンニユン, 煙山 紀子, 中江 大. 胆管上皮細胞におけるCD44発現のNASH肝線維化への寄与, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
13. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子. 甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較. 第49回日本毒性学会学術年会 (2022. 7.1, 札幌)
14. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いたCD44の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証. 第49回日本毒性学会学術年会 (2022. 7.1, 札幌)
15. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ナノサイズ酸化チタン (IV) の毒性研究. 第49回日本毒性学会学術年会 (2022. 7.1, 札幌)
16. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX を指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
17. 齊藤洋克, 種村健太郎, 菅野純, 北嶋聡. アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析-化学物質曝露影響から考える神経発達障害-, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
18. 五十嵐智女, 松村万里, 小川いづみ, 矢川千織, 早川孝彦, 越智美代子, 齊藤洋克, 栗形麻樹子, 北嶋聡. 「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較、第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
19. 山田隆志, 勝谷成男, 丸山多恵子, 村山典恵, 山崎浩史, 山添康, 広瀬明彦. ピロリジジナルカロイドの肝毒性評価へのNew Approach Method (NAM) の適用, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
20. 大久保 佑亮, 菅野 聖世, 北嶋 聡, 平林 容子, 福田 淳二: ヒトiPS細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発、第49回日本毒性学会

- 学術年会 (2022.7.1, 札幌)
21. 小島肇. 3Rs を取り巻く国際動向と課題, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
 22. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 広瀬明彦, 足利太可雄. THP-1 細胞への活性化に及ぼす二酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性因子, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
 23. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX を指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
 24. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之. 細胞毒性を有する *o*-Toluidine と *o*-anisidine の尿中代謝物はラット膀胱上皮で ALDH1A1 を誘導する. 第 29 回日本がん予防学会総会 (2022.7.2, 京都)
 25. 山田隆志. ヒト用医薬品の環境リスク評価を支援する生態毒性データベースと予測の不確実性を考慮した *in silico* アプローチの開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
 26. 山本直樹, 平松範子, 加藤由布, 西川千恵子, 横井友香, 足利太可雄, 小島肇. 医薬品の生殖毒性試験代替法に有用なヒト由来 iPS 細胞レポーター細胞株の作製と評価に関する研究, 日本組織培養学会第 94 回大会 (2022.7.7, 豊中, 大阪)
 27. 小島肇. 医薬品等の薬効及び安全性評価を支える *in vitro* 試験の未来, 日本組織培養学会第 94 回大会 (2022.7.8 豊中, 大阪)
 28. 志村岳流, 福田一徹, 大森清美, 白川真一, 福田 淳二, 内田和歌奈, 小沼泰子, 紀伊宏明, 宮本健司, Deep Learning による Bhas42 細胞形質転換試験法の画像判定, 日本動物細胞工学会 2022 年度大会 (2022.7.26, 東京)
 29. 横田理, 齊藤洋克, 若山友彦, 北嶋聡. ビタミン A 過剰マウス精上皮周期に着目した精巣毒性評価法の開発, 第 62 回日本先天異常学会学術集会 (2022.7.29, 金沢)
 30. 平林容子. 核酸医薬品の非臨床安全性評価における ICH S6 対応研究班の取組, 日本核酸医薬学会 第 7 回年会 (2022.8.3, 東京)
 31. 平林容子. 安全性評価の課題と展望, 令和 4 年度 国立医薬品食品衛生研究所シンポジウム (2022.8.9, 川崎)
 32. 尾上誠良. 薬剤性光線過敏症のリスク回避に向けた国際ガイドラインの作成, 第 8 回日本医薬品安全性学会学術大会 (2022.8.20-9.4, On line)
 33. Ohno A, Nishida A, Iijima K, Hirose A, Ashikaga T. *in silico* elucidation of physicochemical properties factor on activation of THP-1 cells of TiO₂ NP, 264th ACS National Meeting & Exposition (2022.8.22, Chicago)
 34. 小島肇. 代替法に関する国内外の状況について代替法全般の最新動向, 日本動物実験代替法学会企画委員会主催講習会 (2022.8.25, On line)
 35. 平林容子. JaCVAM における New Approach Methods への取組, 2022 年度日化協 LRI 研究報告会 (2022.8.26, On line)
 36. 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男,

- 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022. 8.26, 東京)
37. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022. 8.26, 東京)
38. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 皮膚感作性の *in vitro* 試験法である KeratinoSens™ の結果を予測する機械学習モデルの構築, 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26, 東京)
39. 齊藤洋克, 菅康佑, 横田理, 阿部裕, 片岡洋平, 六鹿元雄, 種村健太郎, 北嶋聡. キシレンの吸入曝露によるマウス行動影響解析, 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26, 東京)
40. Kobayashi T, Toyoda T, Yoshioka Y, Murai N, Kishimoto S, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic metabolites of *o*-toluidine and *o*-anisidine induce ALDH1A1 in rat bladder epithelium. 13th International Conference on Environmental Mutagens (2022.8.30, Ottawa, Canada)
41. Horibata K, Sugiyama KI. Detection of Genotoxic Reactions Through Directly Analyzing DNA Damage Responses on Chromatin Fraction. 13th International Conference on Environmental Mutagens and 53rd Annual Meeting of The Environmental Mutagenesis and Genomics Society (2022.8.27, Ottawa, Canada)
42. 平林容子: 核酸医薬品の非臨床安全性試験ガイドラインについて, 第 12 回レギュラトリーサイエンス学会学術大会 (2022.9.10, 東京)
43. 足利太可雄, 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智. 皮膚感作性物質あるいは発熱性物質とナノシリカの混合曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究, 第 29 回日本免疫毒性学会学術年会 (2022.9.12, 札幌)
44. 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出. 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022.9.29, 横浜)
45. 赤木純一, 豊田武士, 小川久美子. γ -H2AX との組み合わせによる肝発癌物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM およびアミノペプチダーゼ N の有用性. 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022.9.29, 横浜)
46. 増田寛喜, 豊田武士, 宮下知治, 吉田寛, 瀬戸泰之, 野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対する MEK インヒビターの治療効果の検討. 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022.9.29, 横浜)
47. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子. 化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程における γ -H2AX の役割. 第 81 回日本癌学会学術総会 (2022.9.29, 横浜)
48. Yamada T, Read-across case studies for repeated-dose toxicity of chemicals: Lessons learned from the OECD IATA

- Case Studies Project. The 9th European Food Safety Authority (EFSA) Read-across Work Group Meeting. (2022.9.28, Parma-Online Hybrid)
49. 平林容子. 稀少疾患への核酸医薬品適用における安全性評価の考え方、BioJapan2022 (2022.10.12, 横浜)
 50. 山田隆志. ヒト健康影響に関連したQSARとリードアクロス. 令和4年度QSAR/リードアクロス講習会, 独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター主催, 環境省 大臣官房環境保健部後援 (2022.10.17, On line)
 51. Hirabayashi Y. Initiatives for Safety Assessment of Nanomaterials at Center for Biological Safety and Research, National Institute of Health Sciences, the 12th Global Summit on Regulatory Science (GSRS) 2022 Conference (2022.10.19, Singapore)
 52. Yamada T, Tsujii S, Miura M, Saito A, Kawamura T, Maruyama T, Katsutani N, Hirose A. *In silico* approach that supports neurotoxicity assessment of chemical substances by IATA: Refining categories by using substructures and physicochemical and biochemical parameters related to neurotoxicity, 11th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (2022.10.20, Chapel Hill, USA)
 53. Gruz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama KI. Potent mutagenicity of azidoglycerol in human TK6 cells. 7th Asian Conference on Environmental Mutagens and the 19th Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2022.11.5. Qingdao, China & On line)
 54. 増田寛喜, 豊田武士, 宮下知治, 吉田寛, 瀬戸泰之, 野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対する MEK インヒビターの治療効果の検討. 第33回日本消化器癌発生学会総会 (2022.11.11, 東京)
 55. 堀端克良, 木本崇文. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第81回定例会 (2022.11.14. 広島)
 56. 堀端克良, 杉山圭一. クロマチン分画上のDNA損傷応答解析による遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会 (2022.11.15. 広島)
 57. グルーズピーター, 清水雅富, 台蔵彩子, 川田憲一, 山田雅巳, 本間正充, 堀端克良, 杉山圭一. Dietary lipids as a source of etheno-DNA damage. 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会 (2022.11.15. 広島)
 58. Yamada T, Maruyama-Komoda T, Furuhama A. QSAR evaluation trial based on the checklist -Case study on prediction of Ames mutagenicity using two QSAR models-, OECD Meeting of the QSAR Assessment Framework Working Group (2022.11.15, Paris)
 59. 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価. 第44回日本バイオマテリアル学会 (2022.11.21, 東京)
 60. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ナノサイズ二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性. 第59回全国衛生化学技術協議会年会 (2022.11.1, 川崎)
 61. Onoue S. Establishment and International

- Harmonization of Photosafety Testing Strategy (国際シンポジウム), 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.18, 静岡)
62. 山田幸平, 上林敦, 佐藤秀行, 尾上誠良. *In silico* modeling & simulation による吸入毒性試験効率化を目指して, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 63. 竹内和也, 神谷孝平, 渡辺真一, 山鹿宏彰, 若林晃次, 田原宥, 堀江宣行, 藤本恵一, 河上強志, 小島幸一, 寒水孝司, 小島肇, 山本裕介, 藤田正晴, 笠原利彦, 小野敦. *in chemico* 皮膚感作性試験 ADRA 法のガイドライン改訂に向けたリング試験, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 64. 中嶋菜都美, 山本裕介, 鰐淵彩花, 小島肇, 小野敦, 松本一彦, 藤田正晴, 笠原利彦. OECD の DASS 化合物セットを対象とした複数の感作性代替法を組み合わせた皮膚感作予測における ADRA の適用性について, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 65. 鰐淵彩花, 藤田正晴, 中嶋菜都美, 山本裕介, 小島肇, 小野敦, 笠原利彦. ADRA による反応性基を有するポリマーの感作性評価, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 66. 小島肇. OECD テストガイダンス作成の経験から見たツールガイダンス整備の課題, 日本学術会議公開シンポジウム (2022.11.19, 東京)
 67. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. ヒト気管支上皮細胞 /THP-1 細胞共培養系によるナノマテリアルの吸入毒性評価法の開発, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 68. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 化学構造情報からヒトの皮膚感作性を予測する機械学習モデルの開発, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 69. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. h-CLAT を用いたナノマテリアルのアジュバント効果の評価とメカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 70. 飯島一智, 鈴尾美穂, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄. THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能評価における新規指標の探索, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 71. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 皮膚感作性評価における *in vitro* 試験法の効率化を目指した機械学習モデルの開発, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 72. 山城真輝, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. THP-1 細胞を用いた二酸化セリウムおよび酸化亜鉛ナノ粒子の免疫毒性の評価, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 73. 山田隆志, 辻井伸治, 三浦稔, 齊藤亮子, 川村智子, 丸山多恵子, 勝谷成男, 広瀬明彦. IATA による化学物質の神経毒性評価を補完する *in silico* アプローチ: 神経毒性に関連する部分構造と物理化学的および生化学的パラメータを用いたカテゴリーの精緻化, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)
 74. 山田隆志. 次世代リスクアセスメント (NGRA) のケーススタディの開発と

- 行政受入へ向けた考慮事項, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.20, 静岡)
75. 小島肇, Computational Toxicology の利用の実際と将来展望, 第 96 回日本薬理学会年会 (2022.11.30, 横浜)
76. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 薬剤性腎障害の慢性化病変におけるCD44陽性尿細管の病態生理学的意義. 第5回医薬品毒性機序研究会 (2022.12.8 東京)
77. 小川久美子, 長野嘉介, 小島肇, 福島昭治, 西川秋佳. 鼻腔発がんの機序について -AOP的考え方. 第5回医薬品毒性機序研究会 (2022.12.9, 東京)
78. 山田隆志. ヒト健康影響に係る化学物質安全性データベースの開発および情報科学技術の導入によるリスク評価の迅速化へ向けた課題. 化学物質の安全管理に関するシンポジウム - Society 5.0 実現に向けた化学物質管理に係るデータ利活用の推進 -, 化学物質の安全管理に関するシンポジウム実行委員会主催, 内閣府等共催 (2022.12.21, On line)
79. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2023.1.25, 東京)
80. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ナノサイズ酸化チタンの90日間反復経口投与による毒性研究. 第39回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
81. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割とCD44との関連. 第39回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
82. 水田保子, 赤木純一, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. デキストラン硫酸ナトリウム誘発ラット腸炎モデルにおけるナノポリスチレンの28日間反復経口投与毒性試験. 第39回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
83. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第39回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
84. 小川久美子. 「OECD テストガイドライン」と「バイオアッセイ」. 安全性評価技術“Bhas42CTA”の「医薬品、化学物質、電磁場への社会実装」神奈川県・横浜国立大学 共同研究講座シンポジウム (2023.2.17, 横浜)
85. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 渡邊正悟, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之. 単環芳香族アミンの新規尿中代謝物はラット膀胱上皮における ALDH1A1 の発現を誘導する. 日本農芸化学会 2023 年度大会 (2023.3.16, On line)
86. Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors and promoters of thyroid hormone metabolism. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2023.3.20, Nashville, USA)

87. Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2023.3.21, Nashville, USA)
88. Reinke EN, Corsini E, Ono A, Fukuyama T, Ashikaga T, Gerberick GF. Peer Review Report of the EpiSensa Skin Sensitization Assay, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.21, Nashville, USA)
89. Yamada T, Meiseki Y, Watanabe-Matsumoto S, Yamamoto S, Katsutani N, Yoshida K, Constructing a database of parameters for physiologically based kinetic modeling to predict toxicokinetics of inhalation exposure to industrial chemicals, Society of Toxicology 62nd Annual Meeting (2023.3.21, Nashville, USA)
90. Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2023.3.22, Nashville, USA)
91. Ashikaga T, Ohno A, Nishida A, Iijima K. Development of toxicity evaluation method for nanomaterials using activation of THP-1 cell as an index, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.22, Nashville, USA)
92. 松下幸平. 薬剤性腎障害の可逆性を予測する新規バイオマーカーの探索. 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.26, 札幌)
93. 孫雨晨, 齋藤公亮, 牛木淳人, 安部光洋, 齋藤好信, 柏田建, 堀益靖, 弦間昭彦, 巽浩一郎, 服部登, 津島健司, 荒川憲昭, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, 佐藤元信, 高松一彦, 森和彦, 西矢剛淑, 泉高司, 大野泰雄, 齋藤嘉朗, 花岡正幸. 新規薬剤性間質性肺疾患バイオマーカーとしてのキヌレニン及びキノリン酸の同定並びに検証. 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.27, 札幌)
94. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. 結晶子径 6 nm の超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性. 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.27, 札幌)
95. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 足利太可雄. 様々なナノマテリアルを用いた THP-1 細胞の活性化に伴う指標
96. の有効性評価, 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.27, 札幌)

G-3.OECD 成果物

1. OECD TG 442C, *in chemico* skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins
2. OECD Series on Testing and Assessment No. 360, Detailed Review Paper on *In Vitro* Test Addressing Immunotoxicity With a Focus on Immunosuppression

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

OECDにおける AOP, TG 及び GD の開発

研究分担者 小島肇

国立医薬品食品衛生研究所 食品添加物部

研究要旨

本研究は、化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的な合意を推進する経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）の試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）プログラム各国調整官作業グループ（WNT: Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme）において、日本で開発された種々の TG やガイダンス文書（GD: Guidance Document）、有害性発現経路（AOP : Adverse Outcome Pathway）などの世界各国が必要とする成果物を公定化させることを目的とする。

これまでの先行研究の成果として、我が国で開発された腐食性試験代替法、皮膚感作性試験代替法、光毒性試験代替法、内分泌かく乱性スクリーニング法などに関する TG や免疫毒性の AOP の公定化に寄与し、皮膚感作性試験の確定方式（DASS: Defined Approach for Skin Sensitisation）ガイドライン 497 の開発に関与してきた。

本年度は、これらの成果を生かし、TG に関しては、既存の TG である皮膚感作性試験代替法 ADRA（Amino acid Derivative Reactivity Assay）を含む TG442C の再改定をなすことができた。GD として、*In vitro* 免疫毒性試験の総説（DRP: Detailed Review Paper）が OECD に採択されたが、*in vitro* 生殖毒性試験の総説は論文投稿に留まった。

研究協力者

相場節也

元東北大学医学部大学院大学

笠原利彦

富士フィルム株式会社

小島幸一

一般財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所

A. 研究目的

本研究は、化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的な合意を推進する経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）の試験法ガイドライン（TG : Test Guideline）プログラム各国調整官作業グループ（WNT: Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme）において、1) 日本で開発された種々の TG やガイダンス文書（GD : Guidance Document）、有害性発現経路（AOP : Adverse Outcome

Pathway) や評価のための戦略的統合方式 (IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment) などの世界各国が必要とする成果物を公定化させることを目的とする。

B. 研究方法

B-1. AOP の開発

EAGMST (Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics) で行われているOECDのAOP開発プロジェクトの進捗に合わせ、班員を支援した。

B-2. TG、DRP 及びIATA の開発

OECDのTGの開発プロジェクトWNTの進捗に合わせ、班員を支援した。

B-2-1. 皮膚感作性試験

研究協力者の笠原とともに、皮膚感作性試験代替法 *In Chemico* Skin Sensitisation、ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay) に混合物が評価できる重量法を加えた TG442C の再改定に向け、尽力した。また、DPRA (Directive Peptide Reactivity Assay) の重量法も同 TG に追加するため、研究協力者の笠原及び小島に加え、他国の機関 (P&G 及び Givaudan) とともに共同研究を主導した。具体的には、コード化した 10 物質を 4 施設に配布し、合計 20 物質 (分子量が大きく、バラツキが生じる可能性の高い感作性物質) を用い、重量法の施設間再現性を確認するとともに、既知法であるモル濃度法との比較研究を実施した。

また、研究協力者の相場とともに、IL-8 Luc assay TG442E の改定案を作成し、各国からの改定要望に対処した。

さらに、研究分担者の足利とともに、皮膚感作性試験の確定方式 (Defined Approach for Skin Sensitisation : DASS) ガイ

ドライン 497 の改定プロジェクトに参加し、他国の専門家と議論した。

B-2-2. 免疫毒性試験

相場及び国際的な専門家とともに、*in vitro* 免疫毒性に関する DRP (Detailed Review Paper) を作成した。

DRP の承認を待って IL-2 を指標とした免疫毒性試験 IL-2 Luc assay の TG 案を提出し、各国からの改定要望に対処した。

B-2-3. 生殖毒性試験の DRP

本分野の国内外の専門家とともに、*in vitro* 生殖毒性に関する総説を作成し、*Current Research Toxicology* に投稿した。

B-3. 光毒性 IATA 開発

研究分担者の尾上とともに OECD expert group からのコメントに従って光毒性 IATA 案を修正した。

B-4. OECD に提出する資料の事前確認と OECD からの意見募集への対応

B-4-1. SPSF

昨秋、日本から提出した SPSF (Standard Project Submission Form) の内容を検討した。

B-4-2. Emerging technologies in the Test Guidelines Programme に関するワークショップ

代表研究者の平林とともに、emerging technologies in the Test Guidelines Programme のワークショップに関与し、今後の TG の在り方について議論した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

C-1. AOP の開発

免疫毒性、発がん性および光毒性のAOP 成立に向け、EAGMSTのメンバー及び開発者の代理として、OECD事務局と交渉した。

「IL-1 receptor結合阻害：AOP277」の採択に向け、足利研究分担者を支援した。

C-2. TG 及びDRP の開発

C-2-1. 皮膚感作性試験

一昨年度から検討を続けてきた *in Chemico* Skin Sensitisation、ADRA の中に混合物が評価できる重量法を加える TG442C の再改定案を作成し、WNT で議論された結果、重量法を加えた TG442C の再改定が 2022 年 9 月に公表された（添付資料 1）。引き続き、OECD から要請を受け、TG442C に追加する DPRA 重量法に関する共同研究を主導した。その結果、表 1 に示すように、20 物質すべてでモル濃度法と重量法が一致した結果となることを確認した。

また、IL-8 Luc assay TG442E の改定案を作成し、7 月に OECD に提出し、改定に関する議論を各国の専門家と行った。

一昨年 TG497 として公表された DASS の改定に引き続き参画し、日本の方法である ADRA と IL-8 Luc assay をガイドライン 497 に加えるべく、協力した。

C-2-2. 免疫毒性試験

In vitro 免疫毒性試験の DRP の採択に向けて尽力した結果、本年 9 月に公表された（添付資料 2）。また、IL-2 を指標とした免疫毒性試験 IL-2 Luc assay の TG 案を OECD に提出し、WNT 意見募集を受けて改定した。

C-2-3. 生殖毒性試験の DRP

国際的な専門家とともに、*in vitro* 生殖毒性に関する DRP の作成を継続して

実施してきた。成果の一つとして論文が、本年 5 月に *Current Research Toxicology* に受理された。ただし、この論文をもとに OECD で DRP を作成することは断念した。

C-3. 光毒性 IATA の開発

作成した AOP を基盤として、その枠組みのなかで information sources をマッピングした。光毒性に関与する elements としては、(i) Exposure consideration、(ii) Chemical descriptors、(iii) Skin penetration、(iv) Photoexcitation、(v) Oxidative stress、(vi) Cell injury を定義し、それらに関わる information sources をリスト化した。この中には *in vitro* 試験、*in vivo* 試験のみならず、*in silico* や QSAR モデルも含めた。また、OECD 専門家会議における有識者の助言に従い、information source に対して詳細な記述を加えることとし、具体的には (1) Regulatory use、(2) Validation & regulatory acceptance status、(3) Potential role in the IATA、(4) Description、(5) Scientific basis including MoA、(6) Protocol available、(7) Strengths and weakness、(8) Applicability domain and limitations、(9) Predictive capacity、(10) Reliability を各種文献情報やガイドラインを交えつつ追記した。また、これらの information sources を組み合わせた包括的光安全性評価に関して decision tree を新たに提案し、IATA にあくまでも一例として記述した。

アップデートした IATA 案はすでに各国からの意見募集期間に入ったので今後はコメントや指摘事項に対応して修正作業を行った。

C-4. OECD に提出する資料の事前確認と OECD からの意見募集への対応

C-4-1. SPSF

昨年 11 月に日本から以下の SPSF を提出した。提出にあたり、厚生労働省とも内容を調整した。

- 1) Proposal for α -Sens[®] as FBS-free test system for detecting Key Event 2 (ARE-Nrf2 activation) of skin sensitization
- 2) Proposal for TG 493 ((Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) *In Vitro* Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity) performance and acceptability criteria to make it realistic

C-4-2. Emerging technologies in the Test Guidelines Programme に関するワークショップ

Lesson and Learned for a Validation Study という演題で 8 月 31 日に講演した。発表内容を添付資料 3 に示した。この演題を含め 20 以上の発表会が数か月に渡り事前に開催された。

D. 考察

免疫毒性や生殖毒性試験などの全身毒性に関する *in vitro* TG の開発は前例がなく、これまで以上に時間を要しており、費用も嵩んでいる。OECD は、こうした前例のない TG を開発するために、まずは DRP の作成を求めており、数年掛かりで免疫毒性と生殖毒性試験の GD 作成を進めてきた。本年、*in vitro* 免疫毒性試験の DRP を開発できたものの、生殖毒性試験の DRP 開発を断念した。その理由として、DRP の開発は *in vitro* 生殖毒性試験 Hand1-Luc EST の TG 開発を目指したものであったが、開発者の住友化学株式会社がこれ以上の開発を望ま

ないと表明したことによる。新規試験法の導入は、行政的には慎重であるべきとは思いますが、時間的なロスを解消しない限り、Emerging technologies の導入は難しいと予想している。

一方、OECD で今年から始まった Emerging technologies in the Test Guidelines Programme への対応は、まさしく日本が直面している問題を解決するプロジェクトである。研究代表者の平林および厚生労働省の担当者とも連携を図り、引き続き、日本として適切な対応を心掛けていく。

E. 結論

TG に関しては、日本主導で取り組んできた *in Chemico* Skin Sensitisation、ADRA TG442C の再改定が公表された。GD に関しては、*in vitro* 免疫毒性試験の DRP が公表された。引き続き、各国の専門家とともに、TG、GD や IATA 開発を進めていく。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Kimura Y, Yasuno R, Iwaki T, Fujimura C, Ohmiya Y, Nakajima Y, Omori T, Corsini E, Inoue T, Rogen EL, Kojima H, Aiba S. An international validation study of the interleukin-2 luciferase leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) to evaluate potential immunosuppressive chemicals and its performance after use with the interleukin-2 luciferase assay (IL-2 Luc assay), *Toxicol In Vitro*. 2022;88:105535.
2. Imamura M, Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Nakashima N, Kojima H, Ono A, Kasahara T. Applicability of ADRA (4 mM) for the prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods to

- evaluate key events, *J Appl Toxicol.*2022;42(7): 1159-1167.
3. Yamamoto Y, Fujita M, Watanabe S, Yamaga H, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Kojima H, Kasahara T, Ono A. Within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of amino acid derivative reactivity assay (ADRA) using a 0.5 mg/mL test chemical solution: Results of the study for reproducibility confirmation implemented in five participating laboratories, *J Appl Toxicol.*2022;42(6): 1078-1090.
 4. Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Watanabe S, Yamaga H, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Kojima H, Kasahara T, Ono A. The within- and between-laboratories reproducibility and predictive capacity of Amino acid Derivative Reactivity Assay using 4 mM test chemical solution: Results of ring study implemented at five participating laboratories, *J Appl Toxicol.* 2022;42(2):318-333.
 5. Fujita M, Nakashima N, Wanibuchi S, Yamamoto Y, Kojima H, Ono A, Kasahara T. Assessment of commercial polymers with and without reactive groups using amino acid derivative reactivity assay based on both molar concentration approach and gravimetric approach, *J Appl Toxicol.* 2023;43(3);446-457.
 6. Piersma AH, Baker NC, Daston GP, Flick B, Fujiwara M, Knudsen TB, Spielmann H, Suzuki N, Tsaioun K, Kojima H. Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity, *Current Research in Toxicology*, 2022;3, 100074.
 7. Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Kojima H, et al. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2022;247(1):1-75.
 8. 小島肇, 渡辺美香. 一般財団法人食品薬品安全センターにおける代替法研究, *秦野研究所年報*, 2022;45:8-17.
- ## F-2. 学会発表
1. Kojima H. Approach to New Approach Methods developed by Japan in OECD WNT, ICCA-LRI Workshop 2022 (2022.6.20-21, 横浜)
 2. 小島肇. 3Rs を取り巻く国際動向と課題, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
 3. 小島肇. 医薬品等の薬効及び安全性評価を支える in vitro 試験の未来, 日本組織培養学会第 94 回大会 (2022.7.8 豊中,大阪)
 4. 小島肇. 代替法に関する国内外の状況について代替法全般の最新動向, 日本動物実験代替法学会企画委員会主催講習会 (2022.8.25, Virtual)
 5. 竹内和也, 神谷孝平, 渡辺真一, 山鹿宏彰, 若林晃次, 田原宥, 堀江宣行, 藤本恵一, 河上強志, 小島幸一, 寒水孝司, 小島肇, 山本裕介, 藤田正晴, 笠原利彦, 小野敦. *in chemico* 皮膚感作性試験 ADRA 法のガイドライン改訂に向けたリング試験, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
 6. 中嶋菜都美, 山本裕介, 鰐淵彩花, 小島肇, 小野敦, 松本一彦, 藤田正晴, 笠原利彦. OECD の DASS 化合物セットを対象とした複数の感作性代替法を組み合わせた皮膚感作予測における ADRA の適用

性について, 日本動物実験代替法学会 第35回大会(2022.11.19, 静岡)

7. 鰐淵彩花, 藤田正晴, 中嶋菜都美, 山本裕介, 小島肇, 小野敦, 笠原利彦. ADRA による反応性基を有するポリマーの感作性評価, 日本動物実験代替法学会 第35回大会(2022.11.19, 静岡)
8. 小島肇. OECD テストガイダンス作成の経験から見たツールガイダンス整備の課題, 日本学術会議公開シンポジウム(2022.11.19, 東京)
9. 小島肇. Computational Toxicology の利用の実際と将来展望, 第96回日本薬理学会年会(2022.11.30, 横浜)

F-3. OECD 成果物

1. OECD TG 442C, in chemico skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins
2. OECD Series on Testing and Assessment No. 360, Detailed Review Paper on In Vitro Test Addressing Immunotoxicity With a Focus on Immunosuppression
3. Emerging technologies in the Test Guidelines Programme に関するワークショップにおける小島発表資料

表 1. DRPA モル濃度法および重量法の比較結果要約

No.	Curated.name	CASRN	Supplier	MW	Purity	Approach	DRPA prediction	DRPA prediction	LLNA call
							Lab 1	Lab2	
1	Bis-GMA	1565-94-2	Sigma-Aldrich	512.6	<=100%	Molar approach	Positive	Positive	1B
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
2	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Sigma-Aldrich	388.3	<=100%	Molar approach	Positive	Positive	1B
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
3	Tetrachlorosalicylanilide	1154-59-2	ThermoFisher Scientific (ACROS)	351	<100%	Molar approach	Positive	Positive	1A
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
4	BADGE	1675-54-3	TCI	340.4	<=100%	Molar approach	Positive	Positive	1A
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
5	Lauryl gallate	1166-52-5	TCI	338.4	>98%	Molar approach	Negative	Negative	1A
						Gravimetric approach	Negative	Negative	
6	Abietic acid	514-10-3	TCI	302.5	>80%	Molar approach	Positive	Positive	1B
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
7	Dibenzoyl peroxide	94-36-0	Kanto Chemical	302.5	>80%	Molar approach	n.a	n.a	1A
						Gravimetric approach	n.a	n.a	
8	Iodocarb	55406-53-6	TCI	281.09	>97.0%	Molar approach	Positive	Positive	1A
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
9	Isopropyl myristate	110-27-0	Fujifilm Wako	270.5	95%	Molar approach	Negative	Negative	1B
						Gravimetric approach	Negative	Negative	
10	Bromothalonil	35691-65-7	TCI	265.9	>98%	Molar approach	Positive	Positive	1A
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
11	Benzyl cinnamate	103-41-3	Fujifilm Wako	238.3	98%	Molar approach	Negative	Negative	1B
						Gravimetric approach	Negative	Negative	
12	Benzyl salicylate	118-58-1	TCI	228.3	>99%	Molar approach	Negative	Negative	1B
						Gravimetric approach	Negative	Negative	
13	Farnesal	19317-11-4	Sigma-Aldrich	220.4	<=100%	Molar approach	Positive	Positive	1B
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
14	Oxazolone	15646-46-5	Sigma-Aldrich	217.2	<=100%	Molar approach	Positive	Positive	1A
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
15	4-Nitrobenzyl bromide	100-11-8	Sigma-Aldrich	216	<=100%	Molar approach	Positive	Positive	1A
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
16	Propyl gallate	121-79-9	Sigma-Aldrich	212.2	<=100%	Molar approach	Positive	Positive	1A
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
17	α-iso-Methylionone	127-51-5	TCI	206.3	>70%	Molar approach	Positive	Positive	1B
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
18	Diphenylcyclopropanone	886-38-4	Sigma-Aldrich	206.2	<=100%	Molar approach	Positive	Positive	1A
						Gravimetric approach	Positive	Positive	
19	N,N-Dibutylaniline	613-29-6	Fujifilm Wako	205.3	98%	Molar approach	Negative	Negative	1B
						Gravimetric approach	Negative	Negative	
20	Lilial	80-54-6	TCI	204.3	>96%	Molar approach	Negative	Negative	1B
						Gravimetric approach	Negative	Negative	



Section 4
Health effects

Test Guideline No. 442C
In Chemico Skin Sensitisation

*Assays addressing the Adverse Outcome
Pathway key event on covalent binding to
proteins*

30 June 2022

**OECD Guidelines for the
Testing of Chemicals**



*OECD KEY EVENT BASED GUIDELINE FOR THE TESTING OF
CHEMICALS*

In chemico skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event
on Covalent Binding to Proteins

INTRODUCTION

Covalent binding to proteins Key Event based Test Guideline.

1. A skin sensitiser refers to a substance that will lead to an allergic response following repeated skin contact as defined by the United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS) (1). There is general agreement on the key biological events underlying skin sensitisation. The current knowledge of the chemical and biological mechanisms associated with skin sensitisation has been summarised as an Adverse Outcome Pathway (AOP) (2) starting with a molecular initiating event through intermediate events to the adverse effect, namely allergic contact dermatitis. This AOP focuses on chemicals that react with amino-acid residues (i.e. cysteine or lysine) such as organic chemicals. In this instance, the molecular initiating event (i.e. the first key event), is the covalent binding of electrophilic substances to nucleophilic centres in skin proteins. The second key event in this AOP takes place in the keratinocytes and includes inflammatory responses as well as changes in gene expression associated with specific cell signalling pathways such as the antioxidant/electrophile response element (ARE)-dependent pathways. The third key event is the activation of dendritic cells, typically assessed by expression of specific cell surface markers, chemokines and cytokines. The fourth key event is T-cell proliferation.
2. The assessment of skin sensitisation has typically involved the use of laboratory animals. The classical methods that use guinea-pigs, the Guinea Pig Maximisation Test (GPMT) of Magnusson and Kligman and the Buehler Test (OECD TG 406) (11) assess both the induction and elicitation phases of skin sensitisation. The murine tests, such as the LLNA (OECD TG 429) (12) and its three non-radioactive modifications — LLNA:DA (OECD TG 442A) (13), LLNA:BrdU-ELISA, and BrdU-FCM (OECD TG 442B) (14) — all assess the induction response exclusively and have gained acceptance, since they provide an

advantage over the guinea pig tests in terms of animal welfare together with an objective measurement of the induction phase of skin sensitisation.

3. Mechanistically-based *in chemico* and *in vitro* test methods addressing the first three key events of the skin sensitisation AOP have been adopted for contributing to the evaluation of the skin sensitisation hazard potential of chemicals: the present Test Guideline assesses covalent binding to proteins, addressing the first key event; the OECD TG 442D assesses keratinocyte activation (15), the second key event and the OECD TG 442E addresses the activation of dendritic cells (16), the third key event of the skin sensitisation AOP. Finally, the fourth key event representing T-cell proliferation is indirectly assessed in the murine Local Lymph Node Assay (LLNA) (12).

Background and principles of the test methods included in the Key Event based Test Guideline

4. This Test Guideline (TG) describes *in chemico* assays that address mechanisms described under the first key event of the AOP for skin sensitisation, namely covalent binding to proteins (2). The test methods currently included in this Test Guideline are:
 - The Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) (Appendix I),
 - The Amino Acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) (Appendix II), and
 - The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) (Appendix III).
5. The test methods are based on *in chemico* covalent binding to proteins and are considered to be scientifically valid. The DPRA has been evaluated in a European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM)-lead validation study and subsequent independent peer review by the EURL ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) (3) (4) (5). The ADRA underwent a validation study coordinated by the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) (6) (7) (8) (9) followed by an independent peer-review (10). The kDPRA underwent an industry-coordinated validation study followed by an independent peer-review (17).
6. The test methods included in this Test Guideline might differ with regard to the procedures used to generate the data but can each be used to address countries' requirements for test results on protein reactivity, while benefiting from the Mutual Acceptance of Data.
7. The correlation of protein reactivity with skin sensitisation potential is well established (18) (19) (20). Nevertheless, since protein reactivity represents only one key event of the skin sensitisation AOP (2) (21), information generated with test methods developed to address this specific key event may not be sufficient as stand-alone methods to conclude on the presence or absence of skin sensitisation potential of chemicals. Therefore, data generated with the test methods described in this Test Guideline are proposed to be used within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), together with other relevant complementary information from *in vitro* assays addressing other key events of the skin sensitisation AOP as well as non-testing methods, including *in silico* modelling and read-across from chemical analogues (21). Examples on the use of data generated with these methods within Defined Approaches (DAs), i.e. approaches standardised both in relation to the set of information sources used and in the procedure applied to derive predictions, have been published (21) and are implemented in an OECD TG on defined approaches for skin sensitisation (22).
8. The DPRA and ADRA described in Appendixes I and II to this Test Guideline, respectively, support the discrimination of skin sensitisers (Category 1) from non-sensitisers. Depending on the regulatory framework, positive results generated with these methods may be used on their own to classify a chemical into UN GHS Category 1. However, these test methods do not allow on their own, the sub-categorisation of skin sensitisers into subcategories 1A

and 1B (23), as defined by UN GHS (1) for authorities implementing these two optional subcategories, or potency prediction for safety assessment decisions.

9. In contrast, the kDPRA described in Appendix III of this Test Guideline, allows discrimination of UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory 1A) i.e., subcategory 1B or no category (1) but does not allow to distinguish sensitisers (Category 1) from non-sensitisers. Depending on the regulatory framework, positive results generated with the kDPRA may be used on their own to classify a chemical into UN GHS subcategory 1A.
10. Definitions are provided in the Annex. Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation DPRA and ADRA test methods have been developed (24).

Literature for introduction

- (1) United Nations (UN) (2021), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2021. Available at: [https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9E_0.pdf]
- (2) OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence, Series on Testing and Assessment No. 168, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)10/PART1&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2012)10/PART1&docLanguage=En)
- (3) GF Gerberick, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, Lepoittevin JP (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicol Sci.* 81, 332-343.
- (4) GF Gerberick, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, Lepoittevin JP (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: a classification tree model approach. *Toxicol Sci.* 97, 417-427. .
- (5) EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for the skin sensitisation testing Available at: https://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendaion-on-the-directpeptide-reactivity-assay-dpra.
- (6) M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 70, 94-105.
- (7) Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T, Fujita M.(2015) A novel *in chemico* method to detect skin sensitisers in highly diluted reaction conditions. *J Appl Toxicol.* 35, 1348-1360.
- (8) M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *J. Appl. Toxicology*, Feb;39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707).
- (9) OECD (2019), Validation study report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA), Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (10) OECD (2019), Report of the Peer Review Panel on the Validation of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA), Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (11) OECD (2021), Test No. 406: Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070660-en>.
- (12) OECD (2010), Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071100-en>.
- (13) OECD (2010), Test No. 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090972-en>.
- (14) OECD (2018), Test No. 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264090996-en>.
- (15) OECD (2018), Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method, OECD

Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264229822-en>.

- (16) OECD (2018), Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264359-en>.
- (17) Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A. (2020), 'The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial', ALTEX, preprint, DOI: 10.14573/altex.2004291.
- (18) Landsteiner and Jacobs (1936), Studies on the sensitisation of animals with simple chemical compounds. *Journal of Experimental Medicine* 64:625-639.
- (19) Dupuis and Benezra (1982), Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.
- (20) JP Lepoittevin, Basketter DA, Goossens A, Karlberg AT (1998), Allergic contact dermatitis: the molecular basis, Springer, Berlin (doi: 10.1007/978-3-642-80331-4).
- (21) OECD (2016), 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, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29, Series on Testing & Assessment No. 256, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [[Series on Testing and Assessment: publications by number - OECD](#)].
- (22) OECD (2021), Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/b92879a4-en>.
- (23) B Wareing, Urbisch D, Kolle SN, Honarvar N, Sauer UG, Mehling A, Landsiedel R(2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data, *Toxicol In Vitro* Dec;45(Pt 1):134-145 (doi: 10.1016/j.tiv.2017.08.015).
- (24) OECD (2022), Draft Updated Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation DPRA and ADRA test methods, Series on Testing & Assessment No. 303, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

Annex 1.A. DEFINITIONS

Accuracy: The closeness of agreement between test method results and accepted reference values. It is a measure of test method performance and one aspect of relevance. The term is often used interchangeably with concordance to mean the proportion of correct outcomes of a test method (1). The formula used to derive accuracy is shown under “Calculation” of predictive capacity.

ADRA: Amino acid Derivative Reactivity Assay.

AOP (Adverse Outcome Pathway): sequence of events from the chemical structure of a target chemical or group of similar chemicals through the molecular initiating event to an *in vivo* outcome of interest (2).

Balanced accuracy: The average of sensitivity and specificity. This metric is particularly useful when a different number of *in vivo* positive and *in vivo* negative chemicals were tested. It is an important consideration in assessing the relevance of a test method. The formula used to derive balanced accuracy is shown under “Calculation” of predictive capacity.

Calculation

Calculating predictive capacity

Sensitivity, specificity, accuracy, and balanced accuracy are calculated based on the true positive (TP), true negative (TN), false negative (FN), and false positive (FP) values as follows:

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{Number of true positives (TP)}}{\text{Number of all positive chemicals (TP+FN)}} \times 100$$

$$\text{Specificity} = \frac{\text{Number of true negatives (TN)}}{\text{Number of all negative chemicals (TN+FP)}} \times 100$$

$$\text{Accuracy} = \frac{\text{Number of correct predictions (TP+TN)}}{\text{Number of all chemicals (TP+FN+TN+FP)}} \times 100$$

$$\text{Balanced accuracy} = \frac{\text{Sensitivity} + \text{Specificity}}{2}$$

Calibration curve: The relationship between the experimental response value and the analytical concentration (also called standard curve) of a known substance.

Coefficient of variation: a measure of variability that is calculated for a group of replicate data by dividing the standard deviation by the mean. It can be multiplied by 100 for expression as a percentage.

Defined Approach (DA): a DA consists of a fixed data interpretation procedure (e.g. statistical, mathematical models) applied to data (e.g. *in silico* predictions, *in chemico*, *in vitro* data) generated with a defined set of information sources to derive a prediction.

DPRA: Direct Peptide Reactivity Assay.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

EURL ECVAM: the European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing.

Hazard: Inherent property of an agent or situation having the potential to cause adverse effects when an organism, system or (sub) population is exposed to that agent.

IATA (Integrated Approach to Testing and Assessment): A structured approach used for hazard identification (potential), hazard characterisation (potency), and/or safety assessment (potential/potency and exposure) of a chemical or group of chemicals, which strategically integrates and weights all relevant data to inform regulatory decision regarding potential hazards, risks, and the need for further targeted and therefore minimal testing.

JaCVAM: Japanese Center for the Validation of Alternative Methods.

kDPRA: kinetic Direct Peptide Reactivity Assay.

k_{max}: is the maximum rate constant (in s⁻¹M⁻¹) determined from the reaction kinetics for a tested substance in the kDPRA (see Appendix III, paragraph 24).

LLNA: murine Local Lymph Node Assay issued as OECD TG 429 in 2010.

Molecular Initiating Event: Chemical-induced perturbation of a biological system at the molecular level identified to be the starting event in the adverse outcome pathway.

Mixture: A solid or liquid comprising two or more substances which do not react chemically (3).

Mono-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which one main constituent comprises at least 80% (w/w) of the whole.

Multi-constituent substance: A substance, defined by its quantitative composition, in which two or more main constituents are present in concentrations ≥ 10% (w/w) and < 80% (w/w). Multi-constituent substances are the result of a manufacturing process. The difference between a mixture and a multi-constituent substance is that a mixture comprises two or more substances which do not react chemically, whereas a multi-constituent substance comprises two or more substances that do react chemically.

NAC: N-(2-(1-naphthyl) acetyl)-L-cysteine (4) (5) (6).

NAL: α-N-(2-(1-naphthyl) acetyl)-L-lysine (4) (5) (6).

Positive control: A replicate containing all components of a test system and treated with a substance known to induce a positive response. To ensure that variability in the positive control response across time can be assessed, the magnitude of the positive response should not be excessive.

Pre-haptens: chemicals which become sensitisers through abiotic transformation.

Pro-haptens: chemicals requiring enzymatic activation to exert skin sensitisation potential.

Reference control: An untreated sample containing all components of a test system, including the solvent or vehicle that is processed with the test chemical treated and other control samples to establish the baseline response for the samples treated with the test chemical dissolved in the same solvent or vehicle. When tested with a concurrent negative control, this sample also demonstrates whether the solvent or vehicle interacts with the test system.

Relevance: Description of relationship of the test to the effect of interest and whether it is meaningful and useful for a particular purpose. It is the extent to which the test correctly measures or predicts the biological effect of interest. Relevance incorporates consideration of the accuracy (concordance) of a test method (1).

Reliability: Measures of the extent that a test method can be performed reproducibly within and between laboratories over time, when performed using the same protocol. It is assessed by calculating intra- and inter-laboratory reproducibility and intra-laboratory repeatability (1).

Reproducibility: The concordance of results obtained from testing the same substance using the same test protocol (see reliability). (1)

Sensitivity: The proportion of all positive/active chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (1). The formula used to derive sensitivity is shown under "Calculation" of predictive capacity.

Specificity: The proportion of all negative/inactive chemicals that are correctly classified by the test method. It is a measure of accuracy for a test method that produces categorical results and is an important consideration in assessing the relevance of a test method (1). The formula used to derive specificity is shown under "Calculation" of predictive capacity.

Substance: Chemical elements and their compounds in the natural state or resulting from a manufacturing process, including any additive necessary to preserve the stability of the product and any impurities deriving from the process, but excluding solvents that may be separated without affecting the stability of the substance or changing its composition (3).

System suitability: Determination of instrument performance (e.g., sensitivity) by analysis of reference standards prior to running the analytical run (7).

Test chemical: The term test chemical is used to refer to the substance being tested.

TFA: Trifluoroacetic acid.

United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UN GHS): A system proposing the classification of chemicals (substances and mixtures) according to standardised types and levels of physical, health and environmental hazards, and addressing corresponding communication elements, such as pictograms, signal words, hazard statements, precautionary statements and safety data sheets, so that to convey information on their adverse effects with a view to protect people (including employers, workers, transporters, consumers and emergency responders) and the environment (3).

UVCB: substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials.

Valid test method: A test method considered to have sufficient relevance and reliability for a specific purpose and which is based on scientifically sound principles. A test method is never valid in an absolute sense, but only in relation to a defined purpose (1).

Literature for definitions

- (1) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (2) OECD (2012), The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.
- (3) United Nations (UN) (2021), Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Fifth revised edition, UN New York and Geneva, 2021. Available at: https://unece.org/sites/default/files/2021-09/GHS_Rev9E_0.pdf
- (4) M Fujita, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y and Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, Journal of pharmacological and toxicological methods, 70:94-105.
- (5) Y Yamamoto, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel *in chemico* method to detect skin sensitisers in highly diluted reaction conditions, Journal of Applied Toxicology, 35(11):1348-60, (doi: 10.1002/jat.3139).
- (6) M Fujita, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, J. Appl. Toxicology, Feb;39(2):191-208 (doi: 10.1002/jat.3707).
- (7) FDA (Food and Drug Administration) (2018), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 41 pp. Accessible at: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>

APPENDIX I

In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA)

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

1. The DPRA is proposed to address the molecular initiating event of the skin sensitisation AOP, namely protein reactivity, by quantifying the reactivity of test chemicals towards model synthetic peptides containing either lysine or cysteine (1). Cysteine and lysine percent peptide depletion values are then used to categorise a substance in one of four classes of reactivity for supporting the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers (2).

2. The DPRA test method proved to be transferable to laboratories experienced in high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis. The level of reproducibility in predictions that can be expected from the test method is in the order of 85% within laboratories and 80% between laboratories (3). Results generated in the validation study (4) and published studies (5) overall indicate that the accuracy of the DPRA in discriminating sensitisers (i.e. UN GHS Category 1) from non-sensitisers is 80% (N=157) with a sensitivity of 80% (88/109) and specificity of 77% (37/48) when compared to LLNA results. The DPRA is more likely to under predict chemicals showing a low to moderate skin sensitisation potency (i.e. UN GHS subcategory 1B) than chemicals showing a high skin sensitisation potency (i.e. UN GHS subcategory 1A) (4) (5). However, the accuracy values given here for the DPRA as a stand-alone test method are only indicative since the test method should be considered in combination with other sources of information in the context of an IATA or a DA and in accordance with the provisions of paragraphs 7 and 8 in the General introduction. Furthermore when evaluating non-animal methods for skin sensitisation, it should be kept in mind that the LLNA test as well as other animal tests may not fully reflect the situation in the species of interest, i.e. humans. On the basis of the overall data available, the DPRA was shown to be applicable to test chemicals covering a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potency (as determined in *in vivo* studies) and physico-chemical properties (1) (2) (3) (5). Taken together, this information indicates the usefulness of the DPRA to contribute to the identification of skin sensitisation hazard.

3. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is being tested¹ and is not related to the applicability of the DPRA to the testing of substances and/or mixtures (see a summary of the known limitations of the DPRA in Annex 1 of this Appendix). This test method is not applicable for the testing of metal compounds since they are known to react with proteins with mechanisms other than covalent binding. A test chemical should be soluble in an appropriate solvent at a final concentration of 100 mM (see paragraph 10).

¹ In June 2013, the Joint Meeting agreed that where possible, a more consistent use of the term "test chemical" describing what is being tested should now be applied in new and updated Test Guidelines.

However, test chemicals that are not soluble at this concentration may still be tested at lower soluble concentrations. In such a case, a positive result could still be used to support the identification of the test chemical as a skin sensitiser but no firm conclusion on the lack of reactivity should be drawn from a negative result. Limited information is currently available on the applicability of the DPRA to mixtures of known composition (4) (5). The DPRA is nevertheless considered to be technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures of known composition (see paragraph 4 and 10). When considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Appendix of the Test Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are meaningful scientifically. The current prediction model cannot be used for complex mixtures of unknown composition or for substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials (i.e. UVCB substances) due to the defined molar ratio of test chemical and peptide. For this purpose a new prediction model based on a gravimetric approach will need to be developed. In cases where evidence can be demonstrated on the non-applicability of the test method to other specific categories of chemicals, the test method should not be used for those specific categories of chemicals.

4. The test method described in this Appendix of the Test Guideline is an *in chemico* method that does not encompass a metabolic system. Chemicals that require enzymatic bioactivation to exert their skin sensitisation potential (i.e. pro-haptens) cannot be detected by the test method. Chemicals that become sensitisers after abiotic transformation (i.e. pre-haptens) are reported to be in most cases correctly detected by the test method (4) (9) (10). In the light of the above, negative results obtained with the test method should be interpreted in the context of the stated limitations and in the connection with other information sources within the framework of an IATA or a DA. Test chemicals that do not covalently bind to the peptide but promote its oxidation (i.e. cysteine dimerisation) could lead to a potential over estimation of peptide depletion, resulting in possible false positive predictions and/or assignment to a higher reactivity class (see paragraphs 21 and 22).

5. As described, the DPRA assay supports the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers. However, it may also potentially contribute to the assessment of sensitising potency (6) (11) when used in integrated approaches such as IATA or DA (12). However further work, preferably based on human data, is required to determine how DPRA results may possibly inform potency assessment.

PRINCIPLE OF THE TEST

6. The DPRA is an *in chemico* method which quantifies the remaining concentration of cysteine- or lysine-containing peptide following 24 hours incubation with the test chemical at 22.5-30°C. The synthetic peptides contain phenylalanine to aid in the detection. Relative peptide concentration is measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with gradient elution and UV detection at 220 nm. Cysteine- and lysine peptide percent depletion values are then calculated and used in a prediction model (see paragraph 21) which allows assigning the test chemical to one of four reactivity classes used to support the discrimination between sensitisers and non-sensitisers.

7. Prior to routine use of the method described in this Appendix, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the ten proficiency substances listed in Annex 2.

PROCEDURE

8. This test method is based on the DPRA DB-ALM protocol n° 154 (7) which represents the protocol used for the EURL ECVAM-coordinated validation study. It is recommended that this protocol is used when implementing and using the method in the laboratory. The following is a description of the main components and procedures for the DPRA. If an alternative HPLC set-up is used, its equivalence to the validated set-up described in the DB-ALM protocol should be demonstrated (e.g. by testing the proficiency substances in Annex 2).

Preparation of the cysteine or lysine-containing peptides

9. Stock solutions of cysteine (Ac-RFAACAA-COOH) and lysine (Ac-RFAAKAA-COOH) containing synthetic peptides of purity higher than 85% and preferably > 90%, should be freshly prepared just before their incubation with the test chemical. The final concentration of the cysteine peptide should be 0.667 mM in pH 7.5 phosphate buffer whereas the final concentration of the lysine peptide should be 0.667 mM in pH 10.2 ammonium acetate buffer. The HPLC run sequence should be set up in order to keep the HPLC analysis time less than 30 hours. For the HPLC set up used in the validation study and described in this test method, up to 26 analysis samples (which include the test chemical, the positive control and the appropriate number of solvent controls based on the number of individual solvents used in the test, each tested in triplicate), can be accommodated in a single HPLC run. All of the replicates analysed in the same run should use the identical cysteine and lysine peptide stock solutions. It is recommended to prove individual peptide batches for proper solubility prior to their use.

Preparation of the test chemical

10. Solubility of the test chemical in an appropriate solvent should be assessed before performing the assay following the solubilisation procedure described in the DPRA DB-ALM protocol (7). An appropriate solvent will dissolve the test chemical completely. Since in the DPRA the test chemical is incubated in large excess with either the cysteine or the lysine peptides, visual inspection of the forming of a clear solution is considered sufficient to ascertain that the test chemical (and all of its components in the case of testing a multi-constituent substance or a mixture) is dissolved. Suitable solvents are, acetonitrile, water, 1:1 mixture water:acetonitrile, isopropanol, acetone or 1:1 mixture acetone:acetonitrile. Other solvents can be used as long as they do not have an impact on the stability of the peptide as monitored with reference controls C (i.e. samples constituted by the peptide alone dissolved in the appropriate solvent; see Annex 3). If the test chemical is not soluble in any of the solvents mentioned above, DMSO can be used as a last resort and in minimal amounts. It is important to note that DMSO may lead to peptide dimerisation and as a result, it may be more difficult to meet the acceptance criteria. If DMSO is chosen, attempts should be made to first solubilise the test chemical in 300 µL of DMSO and dilute the resulting solution with 2700 µL of acetonitrile. If the test chemical is not soluble in this mixture, attempts should be made to solubilise the same amount of test chemicals in 1500 µL of DMSO and dilute the resulting solution with 1500 µL of acetonitrile. The test chemical should be pre-weighed into glass vials and dissolved immediately before testing in an appropriate solvent to prepare a 100 mM solution. For mixtures and multi-constituent substances of known composition, a single purity should be determined by the sum of the proportion of its constituents (excluding water), and a single apparent molecular weight should be determined by considering the individual molecular weights of each component in the mixture (excluding water) and their individual proportions. The resulting purity and apparent molecular weight should then be used to calculate the weight of test chemical necessary to prepare a 100 mM solution. For polymers for which a predominant molecular weight cannot be determined, the molecular weight of the monomer (or the apparent molecular weight of the various monomers constituting the polymer) may be considered to

prepare a 100 mM solution. However, when testing mixtures, multi-constituent substances or polymers of known composition, it should be considered to also test the neat chemical. For liquids, the neat chemical should be tested as such without any prior dilution by incubating it at 1:10 and 1:50 ratio with the cysteine and lysine peptides, respectively. For solids, the test chemical should be dissolved to its maximum soluble concentration in the same solvent used to prepare the apparent 100 mM solution. It should then be tested as such without any further dilution by incubating it at 1:10 and 1:50 ratio with the cysteine and lysine peptides, respectively. Concordant results (reactive or non-reactive) between the apparent 100 mM solution and the neat chemical should allow for a firm conclusion on the result.

Preparation of the positive control, reference controls and coelution controls

11. Cinnamic aldehyde (CAS 104-55-2; $\geq 95\%$ food-grade purity) should be used as positive control (PC) at a concentration of 100 mM in acetonitrile. Other suitable positive controls providing mid-range depletion values may be used if historical data are available to derive comparable run acceptance criteria. In addition reference controls (i.e. samples containing only the peptide dissolved in the appropriate solvent) should also be included in the HPLC run sequence and these are used to verify the HPLC system suitability prior to the analysis (reference controls A), the stability of the reference controls over time (reference control B) and to verify that the solvent used to dissolve the test chemical does not impact the percent peptide depletion (reference control C) (see Annex 3). The appropriate reference control for each substance is used to calculate the percent peptide depletion for that substance (see paragraph 18). In addition, a co-elution control constituted by the test chemical alone for each of the test chemicals analysed should be included in the run sequence to detect possible co-elution of the test chemical with either the lysine or the cysteine peptide.

Incubation of the test chemical with the cysteine and lysine peptide solutions

12. Cysteine and lysine peptide solutions should be incubated in glass autosampler vials with the test chemical at 1:10 and 1:50 ratio respectively. If a precipitate is observed immediately upon addition of the test chemical solution to the peptide solution, due to low aqueous solubility of the test chemical, one cannot be sure how much test chemical remained in the solution to react with the peptide. Therefore, in such a case, a positive result could still be used, but a negative result is uncertain and should be interpreted with due care (see also provisions in paragraph 10 for the testing of chemicals not soluble up to a concentration of 100 mM). The reaction solution should be left in the dark at 22.5-30°C for 24 \pm 2 hours before running the HPLC analysis. Each test chemical should be analysed in triplicate for both peptides. Samples have to be visually inspected prior to HPLC analysis. If a precipitate or phase separation is observed, samples may be centrifuged at low speed (100-400xg) to force precipitate to the bottom of the vial as a precaution since large amounts of precipitate may clog the HPLC tubing or columns. If a precipitation or phase separation is observed after the incubation period, peptide depletion may be underestimated and a conclusion on the lack of reactivity cannot be drawn with sufficient confidence in case of a negative result.

Preparation of the HPLC standard calibration curve

13. A standard calibration curve should be generated for both the cysteine and the lysine peptides. Peptide standards should be prepared in a solution of 20% or 25% acetonitrile:buffer using phosphate buffer (pH 7.5) for the cysteine peptide and ammonium acetate buffer (pH 10.2) for the lysine peptide. Using serial dilution standards of the peptide stock solution (0.667 mM), 6 calibration solutions should be prepared to cover the range from 0.534 to 0.0167 mM. A blank of the dilution buffer should also be included in the standard calibration curve. Suitable calibration curves should have an $r^2 > 0.99$.

HPLC preparation and analysis

14. The suitability of the HPLC system should be verified before conducting the analysis. Peptide depletion is monitored by HPLC coupled with an UV detector (photodiode array detector or fixed wavelength absorbance detector with 220 nm signal). The appropriate column is installed in the HPLC system. The HPLC set-up described in the validated protocol uses a Zorbax SB-C-18 2.1 mm x 100 mm x 3.5 micron as preferred column. With this reversed-phase HPLC column, the entire system should be equilibrated at 30°C with 50% phase A (0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water) and 50% phase B (0.085% (v/v) trifluoroacetic acid in acetonitrile) for at least 2 hours before running. The HPLC analysis should be performed using a flow rate of 0.35 mL/min and a linear gradient from 10% to 25% acetonitrile over 10 minutes, followed by a rapid increase to 90% acetonitrile to remove other materials. Equal volumes of each standard, sample and control should be injected. The column should be re-equilibrated under initial conditions for 7 minutes between injections. If a different reversed-phase HPLC column is used, the set-up parameters described above may need to be adjusted to guarantee an appropriate elution and integration of the cysteine and lysine peptides, including the injection volume, which may vary according to the system used (typically in the range from 3-10 µL). Importantly, if an alternative HPLC set-up is used, its equivalence to the validated set-up described above should be demonstrated (e.g. by testing the proficiency substances in Annex 2). Absorbance is monitored at 220 nm. If a photodiode array detector is used, absorbance at 258 nm should also be recorded. It should be noted that some supplies of acetonitrile could have a negative impact on peptide stability and this has to be assessed when a new batch of acetonitrile is used. The ratio of the 220 peak area and the 258 peak area can be used as an indicator of co-elution. For each sample a ratio in the range of 90% < mean² area ratio of control samples < 100% would give a good indication that co-elution has not occurred.

15. There may be test chemicals which could promote the oxidation of the cysteine peptide. The peak of the dimerised cysteine peptide may be visually monitored. If dimerisation appears to have occurred, this should be noted as percent peptide depletion may be over-estimated leading to false positive predictions and/or assignment to a higher reactivity class (see paragraphs 21 and 22).

16. The HPLC analysis should be timed to assure that the injection of the first sample starts 22 to 26 hours after the test chemical was mixed with the peptide solution. The HPLC run sequence should be set up in order to keep the HPLC analysis time less than 30 hours. For the HPLC set up used in the validation study and described in this test method, up to 26 analysis samples can be accommodated in a single HPLC run (see also paragraph 9). An example of HPLC analysis sequence is provided in Annex 3.

DATA AND REPORTING**Data evaluation**

17. The concentration of cysteine or lysine peptide is photometrically determined at 220 nm in each sample by measuring the peak area (area under the curve, AUC) of the appropriate peaks and by calculating the concentration of peptide using the linear calibration curve derived from the standards.

18. The percent peptide depletion is determined in each sample by measuring the peak area and dividing it by the mean peak area of the relevant reference controls C (see Annex 3) according to the formula described below.

² For mean it is meant arithmetic mean throughout the document.

$$\text{Percent peptide depletion} = \left[1 - \left(\frac{\text{Peptide peak area in replicate injection}}{\text{Mean peptide peak area in reference controls } C} \right) \right] \times 100$$

Acceptance criteria

19. The following criteria should be met for a run to be considered valid:

- a) the standard calibration curve should have an $r^2 > 0.99$,
- b) the mean percent peptide depletion value of the three replicates for the positive control cinnamic aldehyde should be between 60.8% and 100% for the cysteine peptide and between 40.2% and 69.0% for the lysine peptide (for other positive controls a reference range needs to be established) and the maximum standard deviation (SD) for the positive control replicates should be <14.9% for the percent cysteine depletion and <11.6% for the percent lysine depletion and
- c) the mean peptide concentration of reference controls A should be 0.50 ± 0.05 mM and the coefficient of variation (CV) of peptide peak areas for the nine reference controls B and C in acetonitrile should be <15.0%.

If one or more of these criteria is not met the run should be repeated.

20. The following criteria should be met for a test chemical's results to be considered valid:

- a) the maximum standard deviation for the test chemical replicates should be <14.9% for the percent cysteine depletion and <11.6% for the percent lysine depletion,
- b) the mean peptide concentration of the three reference controls C in the appropriate solvent should be 0.50 ± 0.05 mM.

If these criteria are not met the data should be rejected and the run should be repeated for that specific test chemical.

Prediction model

21. The mean percent cysteine and percent lysine depletion value is calculated for each test chemical. Negative depletion is considered as "0" when calculating the mean. By using the cysteine 1:10/lysine 1:50 prediction model shown in Table 1, the threshold of 6.38% average peptide depletion should be used to support the discrimination between skin sensitizers and non-sensitizers in the framework of an IATA or DA. Application of the prediction model for assigning a test chemical to a reactivity class (i.e. low, moderate and high reactivity) may perhaps prove useful to inform potency assessment within the framework of an IATA or DA.

Table 1: Cysteine 1:10/lysine 1:50 prediction model¹

Mean of cysteine and lysine % depletion	Reactivity Class	DPRA Prediction ²
$0\% \leq \text{mean \% depletion} \leq 6.38\%$	No or minimal reactivity	Negative
$6.38\% < \text{mean \% depletion} \leq 22.62\%$	Low reactivity	Positive
$22.62\% < \text{mean \% depletion} \leq 42.47\%$	Moderate reactivity	
$42.47\% < \text{mean \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity	

¹ The numbers refer to statistically generated threshold values and are not related to the precision of the measurement (2).

² A DPRA prediction should be considered in the framework of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 2 and 4.

22. There might be cases where the test chemical (the substance or one or several of the components of a multi-constituent substance or a mixture) absorbs significantly at 220 nm and has the same retention time of the peptide (co-elution). Co-elution may be resolved by slightly adjusting the HPLC set-up in order to further separate the elution time of the test chemical and the peptide. If an alternative HPLC set-up is used to try to resolve co-elution, its equivalence to the validated set-up should be demonstrated (e.g. by testing the proficiency substances in Annex 2). When co-elution occurs the peak of the peptide cannot be integrated and the calculation of the percent peptide depletion is not possible. If co-elution of such test chemicals occurs with both the cysteine and the lysine peptides, or with the cysteine peptide only, then the analysis should be reported as “inconclusive”. In cases where co-elution occurs only with the lysine peptide, then the cysteine 1:10 prediction model reported in Table 2 can be used.

Table 2: Cysteine 1:10 prediction model¹

Cysteine (Cys) % depletion	Reactivity class	DPRA prediction ²
$0\% \leq \text{Cys \% depletion} \leq 13.89\%$	No or minimal reactivity	Negative
$13.89\% < \text{Cys \% depletion} \leq 23.09\%$	Low reactivity	Positive
$23.09\% < \text{Cys \% depletion} \leq 98.24\%$	Moderate reactivity	
$98.24\% < \text{Cys \% depletion} \leq 100\%$	High reactivity	

¹ The numbers refer to statistically generated threshold values and are not related to the precision of the measurement.

² A DPRA prediction should be considered in the framework of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 2 and 4.

23. There might be other cases where the overlap in retention time between the test chemical and either of the peptides is incomplete. In such cases percent peptide depletion values can be estimated and used in the cysteine 1:10/lysine 1:50 prediction model, however assignment of the test chemical to a reactivity class cannot be made with accuracy.

24. A single HPLC analysis for both the cysteine and the lysine peptide should be sufficient for a test chemical when the result is unequivocal. However, in cases of results

close to the threshold used to discriminate between positive and negative results (i.e. mean percent depletion falls in the range of 3% to 10% for the cysteine 1:10/lysine 1:50 prediction model or cysteine percent depletion falls in the range of 9% to 17% for the cysteine 1:10 prediction model), additional testing is recommended. In particular, in case of negative results in these ranges (i.e. 3% to 6.38% for the cysteine 1:10/lysine 1:50 prediction model or 9% to 13.89% for the cysteine 1:10 prediction model), a second run should be conducted, as well as a third one in case of discordant results between the first two runs.

Test report

25. The test report should include the following information

Test chemical and Controls (positive control and solvent/vehicle)

- Mono-constituent substance (test and control chemicals)
 - Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;
 - Physicochemical properties such as physical state, appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available.
- Multi-constituent substance, UVCB and mixture:
 - Characterisation as far as possible by e.g. chemical identity (see above), purity, quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available;
 - Physical appearance, water solubility and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;
 - Molecular weight or apparent molecular weight in case of mixtures/polymers of known compositions or other information relevant for the conduct of the study;
 - Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);
 - Concentration(s) tested;
 - Storage conditions and stability to the extent available.
- Additional information for positive control
 - Reference to historical positive control results demonstrating suitable run acceptance criteria, if applicable.
- Additional information for solvent/vehicle control
 - Solvent/vehicle used and ratio of its constituents, if applicable;
 - Justification for choice of solvent for each test chemical;
 - For acetonitrile, results of test of impact on peptide stability.

Peptides

- Supplier, lot, purity

HPLC instrument setting and analysis

- Type of HPLC instrument, HPLC and guard columns, detector, autosampler;
- Parameters relevant for the HPLC analysis such as column temperature, injection volumes, flow rate and gradient.

System suitability

- Peptide peak area at 220 nm of each standard and reference control A replicate;
- Linear calibration curve graphically represented and the r^2 reported;
- Peptide concentration of each reference control A replicate;
- Mean peptide concentration (mM) of the three reference controls A, SD and CV;
- Peptide concentration of reference controls A and C.

Analysis sequence

- For reference controls:
 - Peptide peak area at 220 nm of each B and C replicate;
 - Mean peptide peak area at 220 nm of the nine reference controls B and C in acetonitrile, SD and CV (for stability of reference controls over analysis time);
 - For each solvent used, the mean peptide peak area at 220 nm of the three appropriate reference controls C (for the calculation of percent peptide depletion);
 - For each solvent used, the peptide concentration (mM) of the three appropriate reference controls C;
 - For each solvent used, the mean peptide concentration (mM) of the three appropriate reference controls C, SD and CV.
- For positive control:
 - Peptide peak area at 220 nm of each replicate;
 - Percent peptide depletion of each replicate;
 - Mean percent peptide depletion of the three replicates, SD and CV.
- For each test chemical:
 - Appearance of precipitate in the reaction mixture at the end of the incubation time, if observed. If precipitate was re-solubilised or centrifuged;
 - Presence of co-elution;
 - Description of any other relevant observations, if applicable;
 - Peptide peak area at 220 nm of each replicate;
 - Percent peptide depletion of each replicate;
 - Mean of percent peptide depletion of the three replicates, SD and CV;
 - Mean of percent cysteine and percent lysine depletion values;
 - Prediction model used and DPRA prediction.

Proficiency testing

- Statement that the testing facility has demonstrated proficiency in the use of the test method before routine use by testing of the proficiency chemicals.

Discussion of the results

- Description of any unintended modifications to the test procedure.
- Discussion of the results obtained with the DPRA test method and if it is within the ranges described in paragraph 24.

Conclusion

LITERATURE FOR APPENDIX I

- (1) Gerberick *et al.* (2004), Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81:332-343.
- (2) Gerberick *et al.* (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97:417-427.
- (3) EC EURL-ECVAM (2013), Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra.
- (4) EC EURL ECVAM (2012), Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra
- (5) Natsch *et al.* (2013), A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.
- (6) Jaworska *et al.* (2013), Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice *Journal of Applied Toxicology*, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.
- (7) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>
- (8) ECETOC (2003), Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (9) Urbisch *et al.* (2016), Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization, *Chem Res Toxicol.* 29(5):901-13 doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00055
- (10) Pattlewicz *et al.* (2016), Can currently available non-animal methods detect pre and pro-haptens relevant for skin sensitization? *Regul Toxicol Pharmacol.*; 82:147-155. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.08.007
- (11) Jaworska *et al.* (2015), *Arch Toxicol.* 2015 Dec;89(12):2355-83. doi: 10.1007/s00204-015-1634-2)
- (12) OECD (2016). Series on Testing & Assessment 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, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. Available at: [<https://community.oecd.org/community/iatass>].

KNOWN LIMITATIONS OF THE DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY

The table below provides a summary of the known limitations of the DPRA.

Substance class / interference	Reason for potential underprediction or interference	Data interpretation	Example substance
Metals and inorganic compounds	Known to react with proteins via mechanisms other than covalent binding	Should not be tested	Nickel sulphate; 7786-81-4
Pro-haptens	Test Chemicals that require enzymatic bioactivation to exert their skin sensitisation potential; cannot be detected by the test method unless activation is caused by auto-oxidation to a similar degree as in vivo /in humans. It will however normally not be known whether this will be the case	May lead to false negatives. Negative results obtained with the test method should be interpreted in the context of the stated limitations and in the connection with other information sources within the framework of an IATA or a DA	Diethylenetriamine; 111-40-0 (1A chez l'homme, LLNA n/a)
Pre-haptens	Chemicals that become sensitisers after abiotic transformation are reported to be in most cases correctly detected by the test method		Linalool: 78-70-6
Test chemicals absorbing significantly at 220 nm and having the same retention time of the peptides (co-elution)	When co-elution occurs the peak of the peptide cannot be integrated and the calculation of the percent peptide depletion is not possible	If co-elution of such test chemicals occurs with both the cysteine and the lysine peptides, or with the cysteine peptide only, then the analysis should be reported as "inconclusive" and alternative HPLC set up should be considered (see paragraph 22). In cases where co-elution occurs only with the lysine peptide, then the cysteine 1:10 prediction model reported in Table 2 can be used.	Salicylic acid: 69-72-7
Complex mixtures of unknown composition, substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials	This is due to the need for defined molar ratio of test chemical and peptide	n/a	UVCBs, chemical emissions, products or formulations with variable or not fully known composition
Test chemicals which cannot be dissolved in an appropriate solvent at a final concentration of 100 mM	Not sure if sufficient exposure can be achieved	Test chemicals that are not soluble at this concentration may still be tested at lower soluble concentrations. In such a case, a positive result could be used to support the identification of the test chemical as a skin sensitiser but no firm conclusion on the lack of reactivity should be drawn from a negative result.	n/a
Chemicals which precipitate in reaction solution	Not sure if sufficient exposure can be achieved	A conclusion on the lack of reactivity cannot be drawn with sufficient confidence in case of a negative result	Isopropyl myristate CAS: 110-27-0
Test chemicals that do not covalently bind to the cysteine-peptide but promote	Could lead to a potential over-estimation of cysteine-peptide depletion, resulting in possible false positive predictions.		DMSO Oxidant

its oxidation (i.e. cysteine dimerisation)

Test chemicals that are only soluble in DMSO	DMSO causes excessive peptide depletion due to cysteine dimerization resulting in high background cysteine depletion.	May lead to false negative results	n/a
--	---	------------------------------------	-----

PROFICIENCY SUBSTANCES

In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay

Prior to routine use of the test method described in this test method, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly obtaining the expected DPRA prediction for the 10 proficiency substances recommended in Table 1 and by obtaining cysteine and lysine depletion values that fall within the respective reference range for 8 out of the 10 proficiency substances for each peptide. These proficiency substances were selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazards. Other selection criteria were that they are commercially available, that high quality *in vivo* reference data and high quality *in vitro* data generated with the DPRA are available, and that they were used in the EURL ECVAM-coordinated validation study to demonstrate successful implementation of the test method in the laboratories participating in the study.

Table 1: Recommended proficiency substances for demonstrating technical proficiency with the Direct Peptide Reactivity Assay

Proficiency substances	CASRN	Physical state	<i>In vivo</i> prediction ¹	DPRA prediction ²	Range ³ of % cysteine peptide depletion	Range ³ of % lysine peptide depletion
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Sensitiser (extreme)	Positive	90-100	15-45
Oxazolone	15646-46-5	Solid	Sensitiser (extreme)	Positive	60-80	10-55
Formaldehyde	50-00-0	Liquid	Sensitiser (strong)	Positive	30-60	≤ 24
Benzylideneacetone	122-57-6	Solid	Sensitiser (moderate)	Positive	80-100	≤ 7
Farnesal	19317-11-4	Liquid	Sensitiser (weak)	Positive	15-55	≤ 25
2,3-Butanedione	431-03-8	Liquid	Sensitiser (weak)	Positive	60-100	10-45
1-Butanol	71-36-3	Liquid	Non-sensitiser	Negative	≤ 7	≤ 5.5
6-Methylcoumarin	92-48-8	Solid	Non-sensitiser	Negative	≤ 7	≤ 5.5
Lactic Acid	50-21-5	Liquid	Non-sensitiser	Negative	≤ 7	≤ 5.5
4-Methoxyacetophenone	100-06-1	Solid	Non-sensitiser	Negative	≤ 7	≤ 5.5

¹The *in vivo* hazard and (potency) predictions are based on LLNA data (5). The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (8).

² A DPRA prediction should be considered in the framework of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 2 and 4.

³ Ranges determined on the basis of at least 10 depletion values generated by 6 independent laboratories.

EXAMPLES OF ANALYSIS SEQUENCE

Calibration standards and reference controls	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Dilution buffer Reference control A, rep 1 Reference control A, rep 2 Reference control A, rep 3
Co-elution controls	Co-elution control 1 for test chemical 1 Co-elution control 2 for test chemical 2
Reference controls	Reference control B, rep 1 Reference control B, rep 2 Reference control B, rep 3
First set of replicates	Reference control C, rep 1 Cinnamic aldehyde, rep 1 Sample 1, rep 1 Sample 2, rep 1
Second set of replicates	Reference control C, rep 2 Cinnamic aldehyde, rep 2 Sample 1, rep 2 Sample 2, rep 2
Third set of replicates	Reference control C, rep 3 Cinnamic aldehyde, rep 3 Sample 1, rep 3 Sample 2, rep 3
Reference controls	Reference control B, rep 4 Reference control B, rep 5 Reference control B, rep 6

Three sets of reference controls (i.e. samples constituted only by the peptide dissolved in the appropriate solvent) should be included in the analysis sequence:

Reference control A: used to verify the suitability of the HPLC system.

Reference control B: included at the beginning and at the end of the analysis sequence to verify stability of reference controls over the analysis time.

Reference control C: included in the analysis sequence to verify that the solvent used to dissolve the test chemical does not impact the percent peptide depletion.

APPENDIX II

In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

1. The ADRA is proposed to address the molecular initiating event of the skin sensitisation AOP - namely, protein reactivity - by quantifying the reactivity of test chemicals towards model synthetic amino acid derivatives containing either lysine or cysteine (1) (2) (3). Depletion values of the cysteine derivative N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (CAS. 32668-00-1), which is known as NAC, and the lysine derivative α -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (CAS. 397841-92-8), known as NAL are then used to support the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers (1) (2) (3).

2. The reproducibility and transferability of the ADRA protocol were confirmed using validation studies coordinated by the Japanese Center for validation of alternative methods (JaCVAM) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). There are two detection types of ADRA: ultraviolet (UV) detection and fluorescence (FL) detection (11) (12). Within-laboratory reproducibility (WLR) and between-laboratory reproducibility (BLR) of ADRA were 100% each determined using both the UV detection and fluorescence detection (9) (10). Prediction of skin sensitisation potential based on local lymph node assay (LLNA) data indicated that ADRA with UV-detection identified sensitisers and non-sensitisers with an accuracy of 76 % (104/136), a sensitivity of 76% (74/98), a specificity of 79% (30/38) and a balanced accuracy of 77% (8). In addition, the prediction of the skin sensitisation potential based on human data indicated that ADRA with UV detection has an accuracy of 84% (67/80), a sensitivity of 83% (48/58), a specificity of 86% (19/22) and a balanced accuracy of 84% (8). However, the accuracy values given here for ADRA as a stand-alone test method are for reference only, since it is recommended that the test method be used in combination with other sources of information in the context of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 7 and 8 in the General Introduction. Furthermore, when evaluating non-animal methods for skin sensitisation, it should be kept in mind that the LLNA as well as other animal tests may not fully reflect the situation in humans. On the basis of the overall data available, ADRA's applicability domain was shown to include a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potencies (as determined in *in vivo* studies), and physicochemical properties (1) (2) (3) (4). Following an independent peer review, the ADRA validation studies were considered to demonstrate that this method should be acceptable as part of an integrated testing strategy for the predictive identification of skin sensitisation hazard (6) (13) (14).

3. Co-elution occurs when the test chemical (the substance or one or several of the constituents of a multi-constituent substance or a mixture) was detected significantly at an OD of 281 nm (UV detector) or Ex/Em 284/333 nm (FL detector) and has the same retention time as NAC or NAL (15). Co-elution of UV absorbing-compounds using with the nucleophiles NAC and NAL can lead to inconclusive results when using conventional ultraviolet (UV) detection (11) (12). This problem can be prevented by an alternative or parallel measurement using a fluorescence (FL) detector; thus, the depletion values

obtained by simultaneous measurement using both detectors were also collected in the validation studies (9) (10) and equivalent results to those obtained with UV-detection were obtained, indicating that both detection methods are valid, but FL-detection may lead to fewer inconclusive results. Known limitations of the ADRA are tabulated in Appendix II, Annex 1.

4. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is being tested³. This test method is not applicable to the testing of metal compounds, which are known to react with proteins via mechanisms other than covalent binding. The test method described in this Appendix of the Test Guideline is an *in chemico* method that does not encompass a metabolic system. Chemicals that require enzymatic bioactivation to exert their skin sensitisation potential (i.e., pro-haptens) cannot be detected by the test method. Chemicals that become sensitisers after abiotic transformation (i.e., pre-haptens) are reported to be in some cases correctly detected by the test method (1) (2) (3) (4) (7) (8). In the light of the above, negative results obtained with the test method should be interpreted in the context of the stated limitations and in the connection with other information sources within the framework of an IATA. Test chemicals that promote the oxidation of the N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC) reagent (i.e. cysteine dimerisation) could lead to a potential over-estimation of NAC depletion, resulting in possible false positive predictions (see paragraph 22 and Appendix II, Annex 1); it may be possible to detect and quantify any NAC dimer formed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a UV detector, thus confirming or ruling out that the NAC reagent has been depleted via oxidative dimerisation as opposed to reaction and covalent bonding to the test item substance(s).

5. The ADRA test method allows testing of poorly soluble chemicals (16). To be tested, a test chemical should be soluble in an appropriate solvent at a final concentration of 4 mM (see paragraph 14). Test chemicals that are not soluble at this concentration may still be tested at lower concentrations. In such cases, a positive result could still be used to support identification of the test chemical as a skin sensitiser but no firm conclusion on the lack of reactivity should be drawn from a negative result.

6. The nucleophilic reagents used in ADRA are quantified at 281 nm (1) (2). In the case of co-elution of the nucleophilic reagent and the UV-absorbing test chemical, this might result in inconclusive predictions. However, substances that absorb UV in this range of the spectrum are generally limited to those having conjugated double bonds, which significantly lowers the potential for inconclusive results due to co-elution of UV-absorbing components (15). Furthermore, NAC and NAL are fluorescent and thus, they can be detected using a FL detector (11) (12). Since test chemicals rarely have fluorescence at the specific excitation/emission wavelengths, it is possible to further reduce frequency of inconclusive results by using a FL detector. This is particularly useful in the case of multi-constituent substances with UV absorbance.

7. When assessing the sensitisation potential of a test chemical by using ADRA, there are two options for the preparation of the stock solution (see Figure 1 and paragraphs 15-16): a) If the test chemical is a mono-constituent substance with a known molecular weight or a mixture or multi-constituent substance of known composition, ADRA should be performed using a stock solution prepared at a concentration of 4 mM (8); b) If the test chemical is a mono-constituent substance of unknown molecular weight or a mixture and there is no defined molecular weight (mixtures of unknown or variable composition, complex reaction products, or biological materials (UVCB)), ADRA should be performed using a gravimetric approach based on a stock solution prepared at 0.5 mg/mL. In addition, the gravimetric approach with ADRA (0.5 mg/mL) can also be used for polymers. Assessment of the predictive capacity of ADRA conducted with this gravimetric approach indicated that ADRA (0.5 mg/mL) identified sensitisers and non-sensitisers with an accuracy of 76 % (103/136), a sensitivity of 74% (73/98), a specificity of 79% (30/38) and

³ In June 2013, the Joint Meeting agreed that where possible, a more consistent use of the term "test chemical" describing what is being tested should now be applied in new and updated Test Guidelines.

a balanced accuracy of 77% when compared to LLNA data (8). In addition, the predictive capacity for human data indicated that the gravimetric ADRA (0.5 mg/mL) has an accuracy of 83% (66/80), a sensitivity of 81% (47/58), and a specificity of 86% (19/22) (8). The molecular weight range of the test chemicals used in the validation study of ADRA (0.5 mg/mL) was 60.10 - 388.29, and the ratio of nucleophilic reagent to test chemical in the reaction solution at that time was 1:416 - 1:64 (9).

8. ADRA can be used to support the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers. Further work, preferably based on human data, is necessary to determine whether ADRA results can contribute to potency assessment when considered in combination with other information sources (13) (14).

PRINCIPLE OF THE TEST

9. ADRA is an in chemico test method that quantifies residual concentrations of the NAC and NAL, following a 24±1 hour incubation at 25±1°C in the presence of a test chemical. Both these derivatives include a naphthalene ring that is introduced to their N-terminal in order to facilitate UV detection and FL detection. The relative concentrations of NAC and NAL are measured by HPLC using UV detection (optical density, 281 nm), optionally in combination with FL detection (excitation/emission [Ex/Em], 284/333 nm) and with gradient elution (see paragraph 19). To ultimately support the discrimination between skin sensitisers and non-sensitisers, percent depletion values are then calculated for both NAC and NAL and compared to a prediction model (see paragraph 27).

10. Prior to routine use of the method described in this test method, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the ten proficiency substances listed in Appendix II, Annex 2.

PROCEDURE

11. This test method is based on the protocol (17) used for the JaCVAM-coordinated ADRA validation study and is recommended for use when implementing ADRA at a laboratory. The main components and procedures for the ADRA are described below. Before using an alternative HPLC set-up, its equivalence to the validated set-up described in the protocol should be demonstrated, preferably by testing the proficiency substances in Appendix II, Annex 2.

Quality of NAC and NAL

12. The Nucleophilic Reagents can be obtained as an ADRA Kit for Skin Sensitisation Test, from FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Catalogue No. 296-80901. The use of NAC/NAL as reagent for detecting sensitisation is patented in Japan only, by Fujifilm Corporation. Therefore, in other countries, NAC/NAL can be used without permission. In case other manufacturer's NAC/NAL are used, these should satisfy three quality criteria described below. Quality checks can be obviated and ADRA testing can be performed without delay by purchasing NAC and NAL that have been manufactured specifically to satisfy these quality criteria.

Quality required for NAC and NAL:

- 1) Purity: Both NAC and NAL are to be at least 98% pure.

2) Stability: Using NAC and NAL stock solution, prepare a reference control free of any test chemical and quantify the residual levels of NAC and NAL both immediately after preparation (0 hours) and after a 24 hour incubation. The residual level of NAC and NAL is calculated as follows:

$$\text{Residual levels of NAC} = \frac{\text{Peak area of NAC}}{\text{Total peak area of NAC and NAC dimer}} \times 100$$

$$\text{Residual levels of NAL} = \frac{\text{Peak area of NAL at 24 hour}}{\text{Peak area of NAL at 0 hour}} \times 100$$

The main cause of NAC stability degradation is dimerisation, which may affect reactivity with the test chemical and test reproducibility (3). Therefore, the residual level of NAC should be calculated with respect to the total amount of NAC and dimer. Since the dimers may be formed over time or may have already been formed during the preparation of the stock solution, residual level of NAC is calculated at the time of stock solution preparation and after 24 hours. Residual levels of NAC (both of 0 hour and 24 hour) and NAL (24 hour) should be a minimum of 90% in either case (17).

3) Reactivity: NAC and NAL are to be evaluated for reactivity with the ten proficiency substances given in Appendix II, Annex 2 and should satisfy the requirement given therein.

Preparation of the NAC and NAL stock solution

13. The solubility of individual NAC and NAL batches should be verified prior to use. NAC stock solution should be prepared to a concentration of 2 mM in 100 mM of pH 8.0 phosphate buffer, including 0.333 μM of EDTA, as well as NAL stock solution to a concentration of 2 mM in 100 mM of pH 10.2 phosphate buffer. These two stock solutions are then diluted in buffer to prepare 6.667 μM stock solutions. Both NAC and NAL stock solutions should be used as soon as possible after preparation (3). In the event that they are to be stored, these stock solutions may be frozen and stored for up to twelve months time at less than -75°C prior to use. The final concentration of the NAC in the incubation mixture is 5 μM in pH 8.0 phosphate buffer, and the final concentration of the NAL in the incubation mixture is 5 μM in pH 10.2 phosphate buffer.

Preparation of the test chemical solution

14. Solubility of the test chemical in an appropriate solvent should be assessed before performing the assay in accordance with the solubilisation procedure described in the ADRA JaCVAM protocol (17). An appropriate solvent should dissolve the test chemical completely. Since the ADRA protocol stipulates that either NAC or NAL are incubated in an excess volume of the test chemical, visual inspection of the clear test chemical solution is considered sufficient to confirm that the test chemical (and all its constituents, if testing a multi-constituent substance or a mixture) is dissolved (17). Suitable solvents are distilled water, acetonitrile and acetone. If the test chemical is not soluble in any of the solvents mentioned above, DMSO can be used as a last resort and in minimal amounts (19). It is important to note that DMSO may lead to dimerisation of the nucleophilic reagent NAC (18) (19) and as a result, it may be more difficult to meet the acceptance criteria. If a DMSO-acetonitrile solvent is chosen (5% DMSO in acetonitrile), the test chemical should be dissolved at 80 mM in DMSO, and then this solution should be diluted 20-fold with

acetonitrile to prepare a 4 mM test chemical solution. In case the use of DMSO leads to increased dimerisation of the NAC reagent, this can be checked analytically as the NAC dimer can be detected by HPLC. If a solvent other than those already considered appropriate for the ADRA is used for the test chemical, it is necessary to confirm that the solvent itself does not lead to NAC or NAL depletion (e.g., dimerisation, oxidation) and does not degrade or disrupt the integrity of the test substances or mixture components. The test chemical should be pre-weighed into a disposable polypropylene tube and dissolved immediately before testing in an appropriate solvent to prepare a 4 mM stock solution (See paragraph 5).

15. This molecular weight approach should apply if the test chemical is a mono-constituent substance with a known molecular weight or a mixture or multi-constituent substance of known composition (See Figure 1). For mixtures and multi-constituent substances of known composition, a single aggregated purity value should be determined by the sum of the proportion of its constituents (excluding water), and a single aggregated molecular weight should be determined by considering the individual molecular weights of each component in the mixture (excluding water) and their individual proportions. The resulting purity and aggregated molecular weight should then be used to calculate the weight of test chemical necessary to prepare a 4 mM solution.

16. Mono-constituent substances of unknown molecular weight should be tested based on a test chemical stock solution at a concentration of 0.5 mg/mL rather than 4 mM (7) (See Figure 1 and paragraph 7). Polymers can also be tested at a concentration of 0.5 mg/mL. For mixtures and multi-constituent substances of unknown composition (i.e. UVCB substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials), the test solution can be prepared with a gravimetric approach. The substance should then be dissolved in the stock solution at 0.5 mg/mL on the basis of the weight of the total components (excluding solvent) in an appropriate solvent (See paragraph 14 and Figure 1). This 0.5 mg/mL of test chemical concentration corresponds to a molecular weight of 125 g/mol when ADRA (4 mM) is performed. The ADRA gravimetric approach with ADRA (0.5 mg/mL) has been shown to be almost as accurate in prediction as ADRA (4 mM) for 136 chemicals in a wide molecular weight range (30.03 - 512.60) (8) (see paragraph 7). This assessment of the predictive capacity of the gravimetric approach is based on testing chemicals with defined molecular weight and not based on the testing of mixtures, as no reference data for mixtures are available. Therefore, if the mixture to be investigated is known to contain a chemical class with a typical molecular weight which is significantly higher, this default molecular weight and the test solution concentration should be adjusted accordingly [see e.g. approach for agrochemical formulations in (24)]. The gravimetric approach should only be applied as a last resort if no aggregated molecular weight can be calculated. As for any testing with mixtures, as much as possible, information should be gathered on the sensitization potential and reactivity of individual constituents.

Preparation of the positive control, reference controls and co-elution controls

17. Either phenylacetaldehyde (CAS 122-78-1, purity \geq 90%) or squaric acid diethyl ester (CAS 5231-87-8, purity $>$ 95%) should be used as the positive control (PC) at a concentration of 4 mM in acetonitrile (10). Phenylacetaldehyde is prone to oxidation and polymerisation and integrity of the sample has to be assured by proper storage or by using fresh samples. Squaric acid diethyl ester should be stored protected from high temperature or humidity, since it is prone to hydrolysis. Other suitable positive controls that provide mid-range depletion values may be used if historical data are available to derive comparable run acceptance criteria. In addition, reference controls comprising only NAC or only NAL dissolved in the appropriate solvent should also be included in the HPLC run sequence, and these are used to verify the HPLC system suitability prior to analysis (Reference Control A), the stability of the reference controls over time (Reference Control B), and any effects of the solvent used on depletion of NAC or NAL (Reference Control C) (See Appendix II, Annex 3). The percent NAC and NAL depletion for a test chemical is calculated using an appropriate reference control for that test chemical (see paragraph 23). Also, a

co-elution control comprising only the test chemical should be included in the run sequence to detect possible co-elution of the test chemical with either the NAC or NAL.

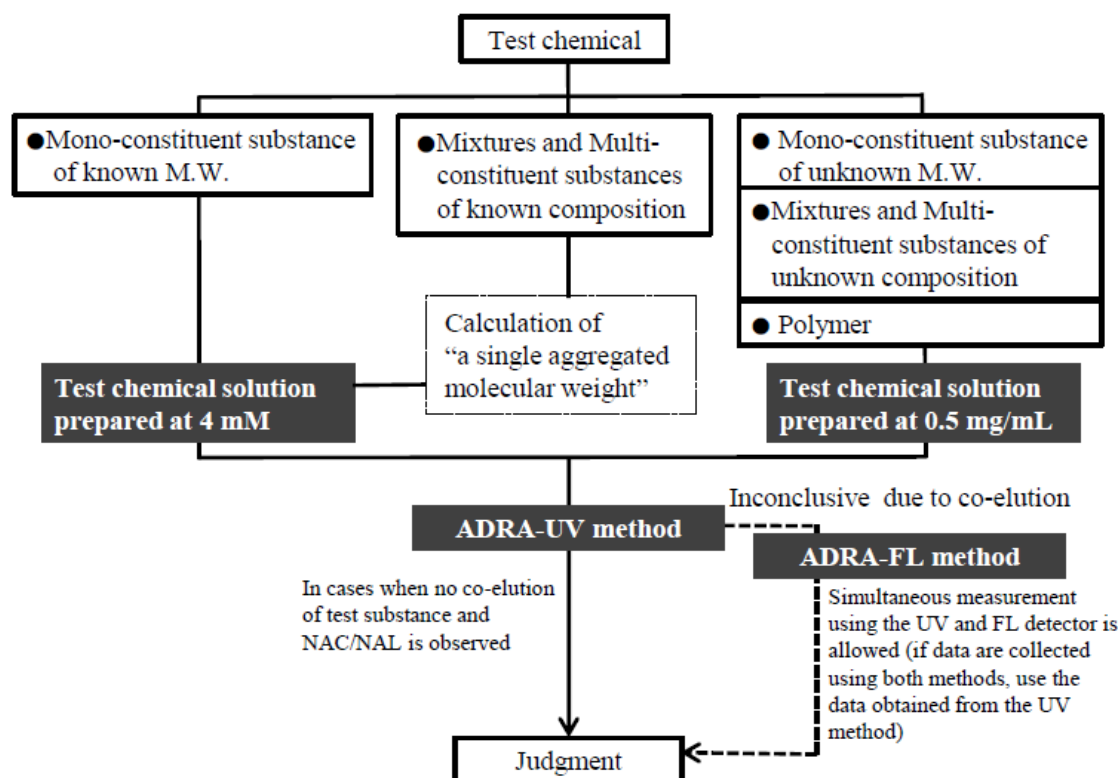
Incubation of the test chemical with the NAC and NAL solutions

18. Both the NAC and the NAL stock solutions are incubated with the test chemical stock solution in a 3:1 ratio in a 96-well microplate. For the 4 mM test chemical stock solution this gives a final concentration of 1 mM test chemical and 5 μ M NAC/NAL (17). For the 0.5 mg/ml test chemical stock solution, the final level of the test chemical is 0.125 mg/ml. The observation of precipitate immediately upon addition of the test chemical solution to the NAC and the NAL solutions is an indication of poor solubility, which means that there is no way to know exactly how much test chemical is contained in the solution. Thus, although positive results can be used with confidence, negative results are uncertain and no firm conclusion on the lack of reactivity should be drawn from a negative result (see also paragraph 5 regarding the testing of chemicals not soluble at concentrations as high as 4 mM). The reaction solution should be incubated in the dark at $25\pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 1 hours before performing HPLC analysis. After incubation, trifluoroacetic acid (TFA) ($\geq 98\%$) should be added to reaction solution as a fixing solution to stop the reaction (3). 2.5% (v/v) TFA aqueous solution is added to the reaction solution in a 1:4 ratio. Thus, final concentration of NAC/NAL and TFA are 4 μ M and 0.5%, respectively.

HPLC preparation and analysis

19. NAC/NAL depletion is monitored by HPLC coupled with an UV-detector. In case of co-elution of NAC/NAL with an UV-absorbing component in the test chemical solution, a fluorescence detector is used (11) (12). There are two options for NAC/NAL detection: Successive measurement should be started with UV-detection and fluorescent detection is used only if inconclusive results due to co-elution are obtained. Alternatively, simultaneous measurement is performed by connecting both the UV and FL detector to the HPLC system for parallel detection. If no co-elution of UV-absorbing components is observed, only the UV data are used. If inconclusive results due to co-elution are observed, FL data will be used (see Figure 1). In the unlikely event that a co-elution also appears in ADRA-FL, the operation should be performed according to paragraph 28. Each test chemical should be analysed in triplicate to determine percent depletion for both NAC and NAL. Although adding the fixing solution does stop the reaction, measurement of the reaction solution is to be performed as soon as possible and in any case within three days after adding the fixing solution. For example, when HPLC analysis of NAC and NAL are performed separately using two 96-well microplates, up to 34 samples may be analysed at one time, including the test chemical, the positive control, and the appropriate number of solvent controls based on the number of individual solvents used in the test, each in triplicate. All of the replicates analysed in a single run should use identical batches of NAC and NAL stock solution. Test chemical and control solutions are to be visually inspected prior to HPLC analysis and may be centrifuged at low speed ($100\text{--}400 \times g$) to force any precipitate to the bottom of the vial as a precaution against large amounts of precipitate clogging the HPLC tubing or columns. Observation of precipitation or phase separation after the incubation period is an indication that NAC and NAL depletion could be misleading, and negative results in that case are uncertain and should be interpreted with due care, as well as for any precipitate observed at the beginning of the incubation period (see above).

Figure 1: Procedure to assess NAC/NAL depletion in ADRA including a gravimetric approach for mixtures and alternative fluorescent detection in case of co-elution with UV-absorbing components.



MW, molecular weight; ADRA, amino acid derivative reactivity assay; UV, ultraviolet; FL, fluorescence

20. A standard calibration curve should be generated for both NAC and NAL. Standard solutions of both NAC and NAL should be prepared in 20% acetonitrile in buffer and containing 0.5% trifluoroacetic acid. For NAC, a phosphate buffer at pH 8.0, and for NAL, a phosphate buffer at pH 10.2 should be used. Using the NAC and NAL stock solutions (6.667 μM), six calibration solutions should be prepared in concentrations from 5.0 to 0.156 μM . A blank of the dilution buffer should also be included in the standard calibration curve. Suitable calibration curves should have an $R^2 > 0.990$.

21. The suitability of the HPLC system should be verified before conducting the analysis. Both NAC and NAL depletion is monitored by HPLC coupled with an UV-detector (photodiode array detector or fixed wavelength absorbance detector with 281 nm signal) and a FL detector (Ex, 284 nm and Em, 333 nm) (see paragraph 19). The appropriate column is installed in the HPLC system. The recommended HPLC set-up described in the validated protocol uses a column with the following specifications. Base particle: core-shell type silica gel, Particle size: 2.5~2.7 μm , column size: 3.0 \times 150 mm as preferred column. With this reversed-phase HPLC column, the entire system should be equilibrated for at least 30 minutes at 40°C with 50% phase A (0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water), 50% phase B (0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in acetonitrile) before use. Then, the column is conditioned by running the gradient at least twice before actual use. The HPLC analysis should be performed using a flow rate of 0.30 mL/min and a linear gradient from 30% to 55% acetonitrile for NAC and from 25% to 45% acetonitrile for NAL within 10 minutes, followed by a rapid increase to 100% acetonitrile to remove other materials. Equal volumes of the standard solutions, test chemical solutions, and control solutions should be injected. The column should be re-equilibrated under initial conditions for 6.5 minutes between

injections. If a different reversed-phase HPLC column is used, the set-up parameters described above may need to be adjusted to guarantee an appropriate elution and integration of the NAC and NAL, including the injection volume, which may vary according to the system used (typically in the range from 10–20 µL). Importantly, if an alternative HPLC set-up is used, its equivalence to the validated set-up described above should be demonstrated, preferably by testing the proficiency substances in Appendix II, Annex 2. Using the UV detection method, absorbance is monitored at 281 nm. If a photodiode array detector is used, absorbance at 291 nm should also be recorded. It should be noted that some batches of acetonitrile could have a negative impact on NAC and NAL stability and this has to be assessed when a new batch of acetonitrile is used. The ratio of the 281 nm peak area and the 291 nm peak area can be used as an indicator of co-elution. For each sample a ratio in the range of 90% < mean area ratio of control samples < 100% would give a good indication that co-elution has not occurred. An example of HPLC analysis sequence is provided in Appendix II, Annex 3.

22. There are some test chemicals that could potentially promote oxidation of NAC. The peak of the dimerised NAC may be monitored visually in the case of ADRA-UV. However, since the NAC dimer does not exhibit fluorescence, it cannot be detected in the fluorescent detection mode. Any apparent dimerisation should be noted, since overestimation of NAC depletion could result in false-positive predictions (See paragraphs 4, 14 and Appendix II, Annex 1).

DATA AND REPORTING

Data evaluation

23. The concentration of both NAC and NAL is photometrically determined at 281 nm (UV detector) and if needed by fluorescence detection with Ex/Em, 284/333 nm (FL detector) (see paragraph 21) in each sample by measuring the peak area (area under the curve, AUC) of the appropriate peaks and by calculating the concentration of both NAC and NAL using the linear calibration curve derived from the standards.

24. The percent depletion for both NAC and NAL is determined in each sample by measuring the peak area and dividing it by the mean peak area of the relevant Reference Controls C (See Appendix II, Annex 3) according to the formula described below.

$$\text{Percent NAC or NAL depletion} = \left[1 - \left[\frac{\text{NAC or NAL peak area in replicate injection}}{\text{Mean NAC or NAL peak area in reference controls C}} \right] \right] \times 100$$

Acceptance criteria

25. The following criteria should be met for a run to be considered valid:

- a) the standard calibration curve should have an $R^2 > 0.990$,
- b) the mean percent NAC and NAL depletion value and the maximum standard deviation (SD) of the three replicates for the positive control (phenylacetaldehyde or squaric acid diethyl ester) should meet the following criteria:

- NAC depletion:

Phenylacetaldehyde: 30 - 80%; Squaric acid diethyl ester: 30 - 80 %

- NAL depletion:

Phenylacetaldehyde: 70 - 100%; Squaric acid diethyl ester: 70 - 100 %

- Maximum standard deviation (SD) for NAC and NAL depletion for both phenylacetaldehyde and squaric acid diethyl ester: < 10%,

c) the mean NAC and NAL concentration of both Reference Controls A and C should be 3.2–4.4 μM and the coefficient of variation (CV) of NAC and NAL peak areas for the nine Reference Controls B and C in acetonitrile should be < 10%.

If one or more of these criteria is not satisfied, the data should be rejected and the run should be repeated for that specific test chemical.

26. The following criteria should be satisfied for a test chemical's results to be accepted as valid:

a) the maximum standard deviation for the test chemical replicates should be < 10% for the percent depletion of both NAC and NAL,

b) the mean NAC and NAL concentration of the three Reference Controls C in the appropriate solvent should be 3.2–4.4 μM . The permissible range of the mean NAC concentration of Reference Control C when 5% DMSO in acetonitrile is used as a solvent is 2.8 to 4.0 μM (19).

If one or more of these criteria is not satisfied, the data should be rejected and the run should be repeated for that specific test chemical.

Prediction model

27. The mean percent depletion of NAC and NAL is calculated for each test chemical. Negative depletion is considered to be "0" when calculating the mean. By using the NAC/NAL prediction model shown in Table 1, the threshold of 4.9% mean depletion should be used to support the discrimination between skin sensitizers and non-sensitizer in the framework of an IATA or a DA. The 4.9% of cut-off value for the mean percent depletion of NAC and NAL was set by using 2 class classification model so that the sensitizer and non-sensitizer could be predicted most appropriately.

Table 1: NAC/NAL prediction model¹

Mean NAC and NAL percent depletion	ADRA prediction ²
Less than 4.9%	Negative
4.9% or higher	Positive

¹ The numbers refer to statistically generated threshold values and are not related to the precision of the measurement.

² An ADRA prediction should be considered in the framework of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 13 and 14.

28. If co-elution is observed using either the UV or the FL detector, the depletion value measured using the detector in which co-elution is not observed should be used (See Figure 1). If co-elution is observed with both detectors, co-elution may be resolved by slightly adjusting the HPLC set-up in order to further separate the elution time of the test chemical and NAC or NAL. If an alternative HPLC set-up is used to try to resolve co-elution, its equivalence to the validated set-up should be demonstrated, preferably by testing the proficiency substances in Appendix II, Annex 2. When co-elution occurs, it is not possible to integrate the peak of the NAC or NAL, thereby preventing calculation of the percent depletion of NAC or NAL. If co-elution of test chemicals occurs with both the NAC and NAL and separation of elution time is not feasible, then the analysis should be reported to be inconclusive. In cases where co-elution occurs only with NAL and separation of elution time is not feasible, the NAC-only prediction model (See Table 2) can be used to make a prediction. In this case, the NAC data of ADRA-UV should still be preferentially adopted

than that of ADRA-FL. The 5.6% cut-off value for the percent depletion of NAC was set by using 2 class classification model so that the sensitizer and non-sensitizer could be predicted most appropriately.

Table 2: NAC-only prediction model¹

Mean NAC percent depletion	ADRA prediction ²
Less than 5.6%	Negative
5.6% or higher	Positive

¹ The numbers refer to statistically generated threshold values and are not related to the precision of the measurement.

² An ADRA prediction should be considered in the framework of an IATA (13) (14).

29. When a result is unequivocal, a single HPLC analysis for both NAC and NAL should be sufficient for a test chemical. However, in case of results close to the threshold used to discriminate between positive and negative results (i.e. in the range of 3% to 10% for NAC/NAL prediction model or NAC percent depletion falls in the range of 4% to 11% for NAC-only prediction model), additional testing is recommended. In particular, in case of negative results in these ranges (i.e. 3% to 4.9% for NAC/NAL prediction model or 4% to 5.6% for NAC-only prediction model), a second run should be conducted, as well as a third one in case of discordant results between the first two runs. In the above cases, the majority of the three test results is adopted.

Test report

30. The test report should include the following information:

Test chemical and Controls (positive control and solvent/vehicle)

- For all mono-constituent substance (test and control chemicals)
 - Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers
 - Physicochemical properties such as physical state, appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available
 - Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc.
 - Treatment prior to testing, if applicable (warming, grinding)
 - Concentration(s) tested
 - Storage conditions and stability to the extent available
- Multi-constituent substance, UVCB, and mixtures
 - Characterisation by chemical identity (see above), purity, quantitative occurrence and relevant physicochemical properties (see above) of the constituents, to the extent available
 - Physical appearance, water solubility, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available
 - Molecular weight (or apparent molecular weight) for mixtures or polymers of known composition, or other information relevant to the study
 - Treatment prior to testing, if applicable (warming, grinding)
 - Concentration(s) tested

- Storage conditions and stability, to the extent available.
- Additional information for positive control
 - Reference to historical positive control results demonstrating suitable run acceptance criteria, if applicable.
- Additional information for solvent/vehicle control
 - Solvent used and ratio of its constituents, if applicable
 - Justification for choice of solvent for each test chemical
 - Impact on NAC and NAL stability when using acetonitrile

Preparation of NAC and NAL, positive control and test chemical solution

- Characterisation of NAC and NAL solutions (supplier, lot, exact weight of NAC and NAL, volume added for the stock solution)
- Characterisation of positive control solutions (exact weight of positive control reagent, volume added for the control solution)
- Characterisation of test chemical solutions (exact weight of test chemical, volume added for the test chemical solution)

HPLC instrument setting and analysis

- Type of HPLC instrument, HPLC and guard columns, UV or FL detector, autosampler
- Parameters relevant for the HPLC analysis such as column temperature, injection volumes, flow rate and gradient

System suitability

- NAC and NAL peak area at OD 281 nm (UV detector) or Ex/Em 284/333 nm (FL detector) of each standard and reference control A replicate
- Linear calibration curve graphically represented and the R² reported
- NAC and NAL concentration of each Reference Control A replicate
- Mean NAC and NAL concentration (µM) of the three reference controls A, SD and CV
- NAC and NAL concentration of Reference Controls A and C.

Analysis sequence

- For Reference Controls
 - NAC and NAL peak area at an OD of 281 nm (UV detector) or an Ex/Em of 284/333 nm (FL detector) of each replicate of Reference Controls B and C
 - Mean NAC and NAL peak area at an OD of 281 nm (UV detector) or an Ex/Em of 284/333 nm (FL detector) of the nine Reference Controls B and C in acetonitrile, SD and CV (for stability of reference controls over analysis time)
 - For each solvent used, the mean NAC and NAL peak area at an OD of 281 nm (UV detector) or an Ex/Em of 284/333 nm (FL detector) of the three appropriate Reference Controls C (for the calculation of percent NAC and NAL depletion)
 - For each solvent used, the NAC and NAL concentration (µM) of the three appropriate Reference Controls C

- For each solvent used, the mean NAC and NAL concentration (μM) of the three appropriate Reference Controls C, SD and CV.
- For positive controls
 - NAC and NAL peak area at an OD of 281 nm (UV detector) or an Ex/Em of 284/333 nm (FL detector) of each replicate
 - Percent NAC and NAL depletion of each replicate
 - Mean percent NAC and NAL depletion of the three replicates, SD and CV.
- For each test chemical
 - Appearance of precipitate in the reaction mixture at the end of the incubation time, if observed. If precipitate was re-solubilised or centrifuged;
 - Presence of co-elution
 - Description of any other relevant observations, if applicable
 - NAC and NAL peak area at an OD of 281 nm (UV detector) or an Ex/Em of 284/333 nm (FL detector) of each replicate
 - Percent NAC and NAL depletion of each replicate
 - Mean of percent NAC and NAL depletion of the three replicate, SD and CV
 - Mean of percent NAC and percent NAL depletion values
 - Prediction model used and ADRA prediction

Proficiency testing

- Statement that the testing facility has demonstrated proficiency in the use of the test method before routine use by testing of the proficiency chemicals

Discussion of the results

- Description of any unintended modifications to the test procedure.
- Discussion of the results obtained with the ADRA test method and if it is within the ranges described in paragraph 29.

Conclusion

Literature for Appendix II

- (1) Fujita M, Yamamoto Y, Tahara H, Kasahara T, Jimbo Y and Hioki T (2014), Development of a prediction method for skin sensitisation using novel cysteine and lysine derivatives, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 70:94-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2014.06.001.
- (2) Yamamoto Y, Tahara H, Usami R, Kasahara T, Jimbo Y, Hioki T and Fujita M (2015), A novel *in chemico* method to detect skin sensitizers in highly diluted reaction conditions, *Journal of Applied Toxicology*, 35:1348-60. DOI: 10.1002/jat.3139.
- (3) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara K, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Kojima H, Ono A, Katsuoka Y, Tanabe H, Yokoyama H and Kasahara T (2019), Cause of and Countermeasures for Oxidation of the Cysteine-Derived Reagent Used in the Amino acid Derivative Reactivity Assay, *Journal of Applied Toxicology*, 39:191-208. DOI: 10.1002/jat.3707.
- (4) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Sugawara T, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kurokawa Y, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, Nakayama T, Kusao T, Richmond J, Kleinstreuer N, Kim BH, Kojima H, Kasahara T and Ono A (2019), The within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of the *in chemico* Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Results of validation study implemented in four participating laboratories, *Journal of Applied Toxicology*, 39: 1492-1505. DOI: 10.1002/jat.3834.
- (5) OECD (2022), Updated Validation report: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) – JaCVAM Validation Study Report. Series on testing and Assessment n° 304. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OECD (2019), Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) – Report of the Peer Review Panel. Series on testing and Assessment n° 305. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (7) Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Katsuoka Y, Ono A and Kasahara T (2019), Expanding the applicability of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA): Determining a weight concentration for preparation of test chemical solutions that yields a predictive capacity identical to the conventional method using molar concentration and demonstrating the capacity to detect sensitizers in liquid mixtures. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 97: 67-79. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.01.001
- (8) Imamura M, Wanibuchi S, Yamamoto Y, Kojima H, Ono A, Kasahara T and Fujita M (2021), Improving predictive capacity of the Amino acid Derivative Reactivity Assay test method for skin sensitisation potential with an optimal molar concentration of test chemical solution. *Journal of Applied Toxicology*, 41: 303-329. DOI: 10.1002/jat.4082.
- (9) Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Sozu T, Wanibuchi S, Fujita M, Kasahara T, Ono, A and Kojima H (2022), Within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of amino acid derivative reactivity assay (ADRA) using a 0.5 mg/ml test chemical solution: Results of the study for reproducibility confirmation implemented in five participating laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, DOI: 10.1002/jat.4279. Epub ahead of print.
- (10) Fujita M, Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Sozu T, Wanibuchi S, Kasahara T, Ono, A and Kojima H (2022), The within- and between-laboratories reproducibility and predictive capacity of Amino acid Derivative Reactivity Assay using 4 mM test chemical solution: Results of ring study implemented at five participating laboratories. *Journal of Applied Toxicology*, 42: 318-333. DOI:

10.1002/jat.4268.

- (11) Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y and Kasahara T (2019), A Newly Developed Means of HPLC-Fluorescence Analysis for Predicting the Skin Sensitisation Potential of Multi-Constituent Substances Using ADRA. *Toxicology In Vitro*, 59, 161-178. DOI: 10.1016/j.tiv.2019.04.014.
- (12) Wanibuchi S, Yamamoto Y, Sato A, Kasahara T and Fujita M (2019), The amino acid derivative reactivity assay with fluorescence detection and its application to multi-constituent substances. *Journal of Toxicological Sciences*, 44: 821-832. DOI: 10.2131/jts.44.821.
- (13) Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Sato A, Akimoto M, Katsuoka Y, Ono A and Kasahara T (2019), Applicability of amino acid derivative reactivity assay for prediction of skin sensitisation by combining multiple alternative methods to evaluate key events. *Journal of Toxicological Sciences*, 44: 585-600. DOI: 10.2131/jts.44.585.
- (14) Imamura M, Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Nakashima N, Kojima H, Ono A and Kasahara T (2022), Applicability of ADRA (4mM) for prediction of skin sensitisation by combining multiple alternative methods to evaluate Key events. *Journal of Applied Toxicology*, DOI: 10.1002/jat.4283. Epub ahead of print.
- (15) Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S, Katsuoka Y and Kasahara T (2019), The underlying factors that explain why nucleophilic reagents rarely co-elute with test chemicals in the ADRA. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 96: 95-105. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.02.004.
- (16) Yamamoto Y, Wanibuchi S, Sato A, Kasahara T and Fujita M (2019), Precipitation of test chemicals in reaction solutions used in the amino acid derivative reactivity assay and the direct peptide reactivity assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 100: 106624. DOI: 10.1016/j.vascn.2019.106624.
- (17) ADRA protocol: JaCVAM Statements. Available at: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html
- (18) Tam JP, Wu CR, Liu W and Zhang JW (1991), Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 6657–6662. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00017a044>
- (19) Akimoto M, Yamamoto Y, Watanabe S, Yamaga H, Yoshida K, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Kusakari K, Kamiya K, Kojima K, Kawakami T, Kojima H, Ono A, Kasahara T and Fujita M (2020), Oxidation of a cysteine-derived nucleophilic reagent by dimethyl sulfoxide in the amino acid derivative reactivity assay. *J Appl Toxicol.*, 40: 843-854. DOI: 10.1002/jat.3948.
- (20) Natsch A, Ryan CA, Foertsch L, Emter R, Jaworska J, Gerberick F and Kern P (2013), A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitisation undergoing prevalidation. *Journal of Applied Toxicology*, 33: 1337-52, DOI:10.1002/jat.2868.
- (21) Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG and Lepoittevin J-P (2007), Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach, *Toxicological Sciences*, 97: 417-427. DOI: 10.1093/toxsci/kfm064.
- (22) Basketter DA, Scholes EW (1992), Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens, *Food and Chemical Toxicology*, 30: 65-69.
- (23) ECETOC (2003), Contact sensitisation: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).
- (24) Raja S, Settivari, Sean C. Gehen, Ricardo Acosta Amado, Nicolo R. Visconti, Darrell R. Boverhof, Edward W. Carney, (2015) Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations, *Regulatory Toxicology and*

Pharmacology, 72, 350-360.

Known limitations of the Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)

The table below provides a summary of the known limitations of the ADRA.

Substance class / interference	Reason for potential underprediction or interference	Data interpretation	Example substance
Metals and inorganic compounds	Known to react with proteins via mechanisms other than covalent binding	Should not be tested	Nickel sulphate; 7786-81-4
Pro-haptens	Test Chemicals that require enzymatic bioactivation to exert their skin sensitisation potential cannot be detected by the test method unless activation is caused by auto-oxidation to a similar degree as <i>in vivo</i> /in humans. It will however normally not be known whether this will be the case	May lead to false negatives. Negative results obtained with the test method should be interpreted in the context of the stated limitations and in the connection with other information sources within the framework of an IATA	Diethylenetriamine; 111-40-0 (human 1A, LLNA n/a)
Pre-haptens	Chemicals that become sensitisers after abiotic transformation are reported to be in some cases correctly detected by the test method		Linalool: 78-70-6
Test chemicals that have a UV absorption (OD, 281 nm) or FL (Ex/Em, 284/333 nm) and have the same retention time than NAC or NAL (co-elution)	When co-elution occurs the peak of the NAC or NAL cannot be integrated and the calculation of the percent NAC or NAL depletion is not possible.	The substances that absorb UV in this range of the spectrum are generally limited to those having conjugated double bonds, which significantly lowers the potential for co-elution. The substances that have a FL in this range are generally limited to polyaromatic or polyheterocyclic compounds, including naphthalene derivatives. If co-elution of such test chemicals occurs with both the NAC and the NAL or with the NAC only, then the analysis should be reported as "inconclusive" and alternative HPLC set up should be considered (see paragraph 28). In cases where co-elution occurs only with the NAL, then the NAC-only prediction model reported in Table 2 can be used."	Safranal; 116-26-7
Complex mixtures of unknown composition, substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials	ADRA using a 4 mM chemical solution needs for defined molar ratio of test chemical and nucleophilic reagent, but ADRA using a 0.5 mg/mL solution does not need the defined molar ratio of a test chemical and can predict sensitisation for test chemicals, which are prepared at a weight concentration of 0.5 mg/mL. When the mixture is a liquid, the evaluation of sensitisation using ADRA cannot be performed if the total weight of the mixture components dissolved in solvent (water, dissolving solution, extraction solvent, etc) is not known, since it is then impossible to prepare a 0.5 mg/mL test chemical solution.	Since plant extract contains various polyphenols, which react with NAC, it may be judged as a sensitiser when a solution containing a high concentration of the plant extract is evaluated using ADRA. Therefore, these results should be considered with reference to results obtained using alternative methods for other key events and <i>in vivo</i> results of similar substances.	n/a
Test chemicals which cannot be dissolved in an appropriate solvent	Not sure if sufficient exposure can be achieved	The ADRA test method allows testing of poorly soluble chemicals. Test chemicals that are not soluble at this	n/a

at a final concentration of 4 mM	If the mixture is liquid and the total weight of the mixed components dissolved in a solvent (e.g., water, dissolving solution, extraction solvent) is not known, it is not possible to prepare a 0.5 mg/mL test substance solution, and thus the sensitisation potential cannot be evaluated by ADRA.	concentration though may still be tested at lower soluble concentrations. In such a case, a positive result could be used to support the identification of the test chemical as a skin sensitiser but no firm conclusion on the lack of reactivity should be drawn from a negative result.	
Chemicals which precipitate in reaction solution	Not sure if sufficient exposure can be achieved	Test chemicals that precipitate in the reaction solution even if dissolved in the solvent may still be tested at lower soluble concentrations. In such a case, a positive result could still be used to support the identification of the test chemical as a skin sensitiser but no firm conclusion on the lack of reactivity should be drawn from a negative result.	Isopropyl myristate CAS: 110-27-0
Test chemicals that do not covalently bind to the NAC but promote its -oxidation (i.e. NAC dimerisation)	Could lead to a potential over-estimation of NAC depletion, resulting in possible false positive predictions.	It may be possible to detect and quantify any NAC dimer formed by HPLC (UV detector), thus confirming or ruling out that the NAC reagent has been depleted via oxidative dimerisation as opposed to reaction and covalent bonding to the test item substance(s). Therefore, ADRA may prevent erroneous judgement due to the oxidizing action of the test chemical. However, since the NAC dimer does not have fluorescence, it can only be detected by ADRA-UV.	DMSO Oxidant
Test chemicals that are only soluble in DMSO	DMSO causes excessive NAC depletion due to NAC dimerization resulting in high background NAC depletion.	DMSO is allowed to be contained in the test chemical solution up to 5%. If DMSO is chosen, attempts should be made to solubilise the test chemical in a 1:20 mixture of DMSO and acetonitrile (5% DMSO in acetonitrile).	n/a

Proficiency Substances

In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)

Prior to routine use of the test method, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly obtaining the expected ADRA prediction for the 10 proficiency substances recommended in Table 1 and by obtaining NAC and NAL depletion values that fall within the respective reference ranges for 8 out of the 10 proficiency substances. The test to demonstrate technical proficiency in ADRA is basically ADRA with 4 mM (10). If ADRA with 4 mM has been proven to be mastered by performing proficiency substances, ADRA with 0.5 mg/mL can be exempt from demonstrating the technical proficiency (9). These proficiency substances were selected to represent the full range of responses for skin sensitisation hazards. Other selection criteria were that they are commercially available, that high quality *in vivo* reference data and high quality ADRA data are available, and that they were used during the JaCVAM-coordinated validation study to demonstrate successful implementation.

Table 1. Recommended chemicals for demonstrating technical proficiency with ADRA_4 mM

No.	Test chemicals	CAS No.	Physical state	Molecular weight	<i>In vivo</i> Prediction ¹	ADRA 4 mM prediction ²	Range of % depletion	
							NAC ³	NAL ³
1	<i>p</i> -Benzoquinone	106-51-4	Solid	108.09	Sensitiser (extreme)	Positive	90-100	70-100
2	Diphenylcyclopropenone	4886-38-4	Solid	206.24	Sensitiser (strong)	Positive	50-90	≤ 10
3	2-Methyl-2H-isothiazol-3-one	2682-20-4	Solid	115.15	Sensitiser (moderate)	Positive	80-100	≤10
4	Palmitoyl Chloride	112-67-4	Liquid	274.87	Sensitiser (moderate)	Positive	≤ 40	70-100
5	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	Solid	388.29	Sensitiser (weak)	Positive	40-70	≤ 20
6	Farnesal	19317-11-4	Liquid	220.35	Sensitiser (weak)	Positive	60-100	5-40
7	Glycerol	56-81-5	Liquid	92.09	Non-sensitiser	Negative	≤ 7	≤ 7
8	Isopropanol	67-63-0	Liquid	60.10	Non-sensitiser	Negative	≤ 7	≤ 7
9	Dimethyl isophthalate	1459-93-4	Solid	194.19	Non-sensitiser	Negative	≤ 7	≤ 7
10	Propyl paraben	94-13-3	Solid	180.20	Non-sensitiser	Negative	≤ 7	≤ 7

¹The *in vivo* hazard (and potency) predictions are based on LLNA data (20) (21) (22). The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (23).

² An ADRA prediction should be considered in the framework of an IATA and in accordance with the provisions of paragraphs 3 and 5.

³ Ranges determined on the basis of at least 10 depletion values generated by 5 independent laboratories.

EXAMPLES OF ANALYSIS SEQUENCE

Each sample of HPLC analysis should be analysed in number order below. Refer to the table showing Examples of HPLC Sample Analysis Sequences for more practical sequences about HPLC analysis.

1. Start to analyse calibration standards and Reference Control A (N = 3).
2. The co-elution Control does not need to be analysed by turns if it is analysed after analysis of standard solution and Reference Control A.
3. Reference Control B should be analysed three times (total six times) before and after the analysis of sample, Reference Control C and Positive Control.
4. The Reference Control C, Positive Control and Test chemical solutions are analysed. (After the first set of replicates of each sample is analysed, the second set of replicates of each should be analysed).

Calibration standards and reference controls	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Dilution buffer Reference control A, rep 1 Reference control A, rep 2 Reference control A, rep 3
Co-elution controls	Co-elution control 1 for test chemical 1 Co-elution control 2 for test chemical 2
Reference controls	Reference control B, rep 1 Reference control B, rep 2 Reference control B, rep 3
First set of replicates	Reference control C, rep 1 Positive control, rep 1 Sample 1, rep 1 Sample 2, rep 1
Second set of replicates	Reference control C, rep 2 Positive control, rep 2 Sample 1, rep 2 Sample 2, rep 2
Third set of replicates	Reference control C, rep 3 Positive control, rep 3 Sample 1, rep 3 Sample 2, rep 3
Reference controls	Reference control B, rep 4 Reference control B, rep 5 Reference control B, rep 6

Three sets of reference controls (NAC or NAL dissolved in the appropriate solvent) should be included in the analysis sequence:

Reference control A: Control for verifying validity of the HPLC system. Reference Control A is used to verify concentration of NAC and NAL from each calibration curve after addition of acetonitrile rather than test chemical.

Reference control B: Control for verifying stability of reaction solution under analysis. Reference Control B is used to verify variability (CV) of each three NAC/NAL peak areas in the solution after addition of acetonitrile rather than test chemical at the start of analysis and at the end of analysis.

Reference control C: Control for calculating NAC/NAL depletion of each test chemical solution. To calculate depletion of NAC/NAL, measure three Reference Controls C after addition of solvent instead of test chemical. Prepare reference Control C for all solvents used to dissolve the test chemicals.

APPENDIX III

In Chemico Skin Sensitisation: kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA)

INITIAL CONSIDERATIONS, APPLICABILITY AND LIMITATIONS

1. The kDPRA is proposed to address the molecular initiating event of the skin sensitisation AOP - namely, protein reactivity - by quantifying the reactivity of test chemicals towards a synthetic model peptide containing cysteine in a time- and concentration dependent manner (1) (2). Kinetic rate constants are calculated and the logarithm of the maximum rate constant ($\log k_{\max}$ value in $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$) for a tested substance is then used to support the discrimination of UN GHS subcategory 1A skin sensitisers (subcategory 1A) from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory 1A) i.e., subcategory 1B or no category according to UN GHS (3). Based on theoretical consideration, the rate constant of the reaction between a test chemical and skin proteins will determine the amount of epitope formed from a given amount of chemical or, vice-versa, determine the dose needed to form the amount of epitope needed for induction of sensitization to occur and it is thus a rate limiting and potency determining step. Based on empirical evidence when evaluating 180 chemicals, the rate constant was shown to be the strongest determinant of potency among all evaluated parameters measured in OECD 442C, 442D and 442E (3).
2. The kDPRA proved to be transferable to laboratories without hands-on training (4). For the 24 test chemicals tested during the validation study, the overall within-laboratory reproducibility of kDPRA for assigning UN GHS subcategory 1A was 96% and the average between-laboratory reproducibility was 88% (4). Results from the validation study (4) as well as from other published studies (3) encompassing 180 test chemicals that fall within kDPRA's applicability domain indicate that kDPRA allows to discriminate UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS with a balanced accuracy of 85%, a sensitivity of 84% (38/45), and a specificity of 86% (116/135) relative to LLNA results (3). Similar performances were obtained when comparing kDPRA outcomes with the OECD LLNA database compiled within the context of the Test Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitization (15)⁴. In addition, the prediction for 123 test chemicals (out of the 180) having human skin sensitisation data (5) (6) has a balanced accuracy of 76%, a sensitivity of 64% (21/33), and a specificity of 89% (80/90) (3), although the human reference data are subject to a significant uncertainty⁵. Furthermore, when evaluating non-animal methods for skin sensitisation, it should be kept in mind that the

⁴ A balanced accuracy of 85%, a sensitivity of 82% (31/38), and a specificity of 88% (102/116) were found relative to LLNA dataset compiled within the context of the Test Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitization (15).

⁵ A balanced accuracy of 67%, a sensitivity of 53% (9/17), and a specificity of 81% (25/31) were found relative to human skin sensitisation dataset compiled within the context of the Test Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitization (15).

LLNA test as well as other animal tests may not fully reflect the situation in the species of interest, which is humans. For comparison, based on a data set of 123 chemicals used to evaluate the kDPRA vs. human sensitising potential, the LLNA showed a 73% balanced accuracy, a 55% (18/33) sensitivity and a 91% (82/90) specificity for the identification of UN GHS subcategory 1A. On the basis of the overall data available, kDPRA's applicability domain was shown to include a variety of organic functional groups, reaction mechanisms, skin sensitisation potencies (as determined in *in vivo* studies), and physicochemical properties (3). Following an independent peer review (16), the kDPRA was considered to be scientifically valid to discriminate UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS (7). The kDPRA can therefore be used (i) as a follow-up test method for sub-categorisation of chemicals identified as UN GHS Category 1 skin sensitisers, or (ii) on its own by using positive results for direct classification of a chemical into UN GHS subcategory 1A, depending on the regulatory framework.

3. The term "test chemical" is used in this Test Guideline to refer to what is being tested and is not related to the applicability of the kDPRA to the testing of substances and/or mixtures. This test method is not applicable to the testing of metal compounds, which are known to react with proteins via mechanisms other than covalent binding. Furthermore, kDPRA only measures reactivity with the cysteine peptide, so that strong sensitisers having an exclusive lysine-reactivity, such as some acyl-halides, phenol-esters or aldehydes are outside of the applicability domain of kDPRA. However, only few UN GHS subcategory 1A skin sensitisers are known currently to react exclusively with lysine residues. In addition, considering exclusive strong Lysine-reactivity from the DPRA or ADRA in a tiered strategy may reduce this uncertainty. Test chemicals that do not covalently bind to the peptide but promote its oxidation (i.e. cysteine dimerisation) could lead to a potential over estimation of peptide depletion, resulting in possible false positive predictions and/or assignment to a higher reactivity class. The test method described in this Appendix of the Test Guideline is an *in chemico* method that does not encompass a metabolic system. Reactivity of chemicals that require enzymatic bioactivation to exert their skin sensitisation potential (i.e. pro-haptens) cannot be reliably detected by the test method. However, the limitation for detecting pro-haptens was found to be less pronounced when identifying strong sensitisers as compared to the identification of weak sensitisers (3). The majority of chemicals that become sensitisers after abiotic transformation (i.e. pre-haptens) were reported to be correctly detected by *in chemico* test methods (8) (9). However, spontaneously rapidly oxidizing pre-haptens may be under-predicted by kDPRA (as in any *in vitro* skin sensitisation assay) due to a lag-phase for oxidation which reduces the overall reaction rate. In the light of the above, results obtained with the test method that do not lead to subcategory 1A categorisation should be interpreted in the context of the currently known limitations (see also Annex 1 of this Appendix), i.e.:
 - aromatic amines, catechols or hydroquinones may require further data to confirm their weak reactivity even under oxidizing conditions, and
 - acyl-halides, phenol-esters or aldehydes specifically reacting with Lysine-residue according to e.g. the DPRA or ADRA, may require further data to confirm their weak reactivity.
4. To be tested, a test chemical should be soluble in an appropriate solvent at a final concentration of 20 mM (see paragraphs 12-13). Test chemicals that are not soluble at this concentration may still be tested at lower concentrations as long as a k_{\max} value (i.e., the maximum rate constant (in $s^{-1}M^{-1}$) determined from the reaction kinetics for a tested substance in the kDPRA (see paragraph 24)), can be derived. In such a case, a positive result leading to a UN GHS subcategory 1A skin sensitization prediction (i.e. $\log k_{\max} \geq -2.0$) could still be used, but no firm conclusion should be drawn from a negative result (i.e., non-reactive or $\log k_{\max} < -2.0$ outcome).

5. The kDPRA uses a fluorescence readout which requires attention for potential test chemical autofluorescence, fluorescence quenching or interaction with the reagent (monobromobimane). In particular, it is important to include the respective test chemical controls as described in paragraph 16 and to assess the incubation time dependence of the determined peptide depletion. Furthermore, test chemicals with primary SH-group (thiols) cannot be tested with the kDPRA as the thiol group can interact with the monobromobimane (see paragraph 8) leading to enhanced fluorescence. Finally, chemicals decomposing under the conditions of the assay (neutral, aqueous conditions) and releasing a free SH-group will be prone to the same limitations.
6. The kDPRA is considered to be technically applicable to the testing of multi-constituent substances and mixtures of known composition, although such substances were not tested during the validation studies. In this case, a single purity may be determined by the sum of the proportion of its constituents (excluding water), and a single apparent molecular weight may be determined by considering the individual molecular weights of each component in the mixture (excluding water) and their individual proportions. The resulting purity and apparent molecular weight can then be used to calculate the weight of test chemical necessary to prepare a 20 mM solution. Results obtained with mixtures and multi-constituent substances of known composition can lead to a non-linear behaviour, so that the provisions described in paragraph 27(ii) should be used. Regarding mixtures and substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials (i.e. UVCB substances), the current model cannot be used due to the need for defined molar ratios. In any case, when considering testing of mixtures, difficult-to-test chemicals (e.g. unstable), or test chemicals not clearly within the applicability domain described in this Guideline, upfront consideration should be given to whether the results of such testing will yield results that are meaningful scientifically. Finally, in cases where evidence can be demonstrated on the non-applicability of the test method to specific categories of chemicals, the test method should not be used for those specific categories of chemicals.
7. The kDPRA can be used for the discrimination of UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS (3). As for any key-event based test method, the performance of kDPRA will have to be further assessed when used in combination with other assays such as DPRA or ADRA, and within integrated approaches such as IATA or DA for a more comprehensive analysis of skin sensitisation (3) (10).

PRINCIPLE OF THE TEST

8. The kDPRA is a modification of the *in chemico* test method DPRA (described in Appendix I of this Test Guideline). The kDPRA uses the cysteine peptide (Ac-RFAACAA-COOH) also used in the DPRA, while it does not use a lysine containing peptide. The final concentration of the test peptide (0.5 mM) and the reaction medium (25% acetonitrile in phosphate buffer) is identical in the kDPRA and in the DPRA. While the DPRA measures only at one concentration of the test chemical (5 mM for the cysteine peptide) and at one time point (≥ 24 h), the kDPRA performs parallel reactions at five concentrations (5, 2.5, 1.25, 0.625 and 0.3125 mM) and at six time-points (10, 30, 90, 150, 210 and 1440 min) at $25 \pm 2.5^\circ\text{C}$. Residual concentration of the cysteine peptide after the respective reaction time is measured after stopping the reaction by the addition of monobromobimane (mBrB; CAS 74235-78-2). The highly reactive and non-fluorescent mBrB rapidly reacts with unbound cysteine moieties of the model peptide to form a fluorescent complex which is measured in order to quantify the non-depleted peptide concentration. If the depletion of the highest concentration surpasses the threshold of 13.89% (cut-off used in the DPRA for positivity in the cysteine only prediction model) and this depletion is statistically significant vs. controls with peptide

only, further calculations are performed (otherwise the test chemical is considered to be non-reactive according to the prediction model shown in paragraph 28). The natural logarithm of the non-depleted peptide concentrations is plotted vs. the concentration of the test chemical at each time point. If a linear relationship is observed (correlation coefficient > 0.90), the slope of this curve is determined and divided by the incubation time to calculate the rate constant in $[\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}]$. This value is transformed to the rate constant in $[\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}]$ and the logarithm is calculated. The maximum value observed at any time point is taken as the $\log k_{\text{max}}$, and this maximum rate constant is the primary read-out of the test. It gives a quantification of the maximum kinetic rate of the reaction of the test chemical with the test peptide. Kinetic reaction rates of the cysteine peptide depletion are then used to discriminate UN GHS subcategory 1A skin sensitizers from those not categorised as 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS. Chemicals with a $\log k_{\text{max}} \geq -2.0$ are predicted as UN GHS subcategory 1A. The kinetic rate constant may be further used in integrated approaches such as IATA or DA to assess the skin sensitisation potency of a test chemical in a continuous scale as needed for risk assessment (3) (10).

9. Prior to routine use of this test method, laboratories should demonstrate technical proficiency, using the nine proficiency substances listed in Annex 2 of this Appendix.

PROCEDURE

10. This test method is based on the kDPRA DB-ALM protocol no 217 (11) which represents the protocol used for the industry-coordinated validation study. It is recommended that this protocol is used when implementing and using the method in a laboratory. The main components and procedures for the kDPRA are described below.

Preparation of the cysteine-peptide

11. The stock solution of the cysteine containing synthetic peptide (Ac-RFAACAA-COOH) of purity equal to or higher than 95% should be freshly prepared just before the incubation with the test chemical. The final concentration of the cysteine peptide should be 0.667 mM in pH 7.5 phosphate buffer for test chemical soluble in acetonitrile and 1.0 mM for chemicals soluble in pH 7.5 phosphate buffer.

Preparation of the test chemical

12. Solubility of the test chemical in an appropriate vehicle should be assessed before performing the assay. A non-reactive, water-miscible vehicle able to completely dissolve the test chemical should be used. Solubility is checked by visual inspection where the forming of a clear solution is considered sufficient to ascertain that the test chemical is dissolved. The preferred vehicle is acetonitrile. When a substance is not soluble in acetonitrile, solubilisation in pH 7.5 phosphate buffer should be assessed. Further vehicles have not been tested yet but may be used if it is demonstrated that the vehicle does not interfere with the assay, e.g. all controls should be prepared using the same vehicle, and the reaction rates obtained for the positive control and for the proficiency chemicals should fall within the ranges described in paragraph 26 and Annex 2 of this Appendix, respectively. It is important to note that use of DMSO as a vehicle should be avoided as it may lead to peptide dimerisation.
13. The test chemical should be pre-weighed into glass vials and dissolved immediately before testing to prepare a 20 mM solution using the appropriate vehicle as described in paragraph 12. Test chemical dilutions are prepared by serial dilution to obtain concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mM.

Preparation of controls

14. Cinnamic aldehyde (CAS 104-55-2; $\geq 95\%$ food-grade purity) should be used as positive control (PC). It is dissolved at a concentration of 20 mM in acetonitrile immediately before testing. Serial dilutions are then prepared to obtain PC concentrations of 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 mM. Use of other positive controls is not recommended since in this assay an exact reaction rate is measured and consistent use of the positive control allows quantitative comparison between laboratories, with validation study data and as intra-laboratory historical control.
15. A vehicle control (VC), considered as the negative control, includes the peptide dissolved in buffer and vehicle respectively but no test chemical nor PC. The peptide-depletion of test chemical or PC incubated samples is calculated relative to the respective VC.
16. The assay also includes test chemical controls at the respective test chemical concentration in the vehicle and buffer but without peptide. This set of controls is used for the identification of interference of the test chemical with the fluorescence measurement (autofluorescence and quenching) to assess e.g., interference with monobromobimane and as a background measurement.
17. A blank control (BC) is used as a background measurement and is prepared with vehicle and buffer but without test chemical, PC, or peptide.

Incubation of the test chemical with the cysteine peptide solution

18. Serial dilutions of the test chemical and PC are prepared in a 96-well microtiter plate referred to as the application plate. Further, a 96-well black assay plate for each exposure time is prepared, referred to as the assay plates, by adding the relevant reagents (i.e., peptide stock solution, vehicle and buffer solution) according to a predefined plate layout such as recommended within the kDPRA protocol (11). Each test chemical concentration should be analysed in triplicate. The reaction is started by adding the test chemical and PC dilutions from the application plates to the assay plates. If a precipitate is observed immediately upon addition of the test chemical solution to the peptide solution, due to low aqueous solubility of the test chemical, one cannot be sure how much test chemical remained in the solution to react with the peptide. In such a case, a positive result (i.e. $\log k_{\max} \geq -2.0$) could still be used, but a negative result (i.e., non-reactive or $\log k_{\max} < -2.0$ outcome) should be interpreted with due care (see also provisions in paragraph 4 for the testing of chemicals not soluble up to a concentration of 20 mM in the kDPRA). After adding the test chemical and PC, plates are sealed with gas-tight adhesive foil and shaken at least 200 rpm for 5 min. Assay plates solution should be incubated in the dark at $25 \pm 2.5^\circ \text{C}$ for several incubation (exposure) times, i.e. 10, 30, 90, 150, 210, and 1440 min before addition of mBrB solution. Incubation times may be adapted to investigate the most relevant time points for a specific chemical (e.g., shorter incubation times might be more suitable for fast reacting chemicals). However, 1440 min should always be tested, as it corresponds to the incubation time of the DPRA. The incubation (exposure) time is the time interval from the application of the test chemical and PC dilutions to the assay plate until the addition of mBrB.

Fluorescence measurement

19. When the desired incubation (exposure) time is reached, freshly prepared mBrB solution (3 mM in acetonitrile) is added rapidly to the wells of the assay plates (one per exposure time) in the dark. Plates are sealed with gas-tight adhesive foil and shaken at least 200 rpm for 5 min. Fluorescence intensity is then determined using an excitation filter of 390 nm and an emission filter of 480 nm.

DATA AND REPORTING

Data evaluation

20. An automated Excel-evaluation spreadsheet is available with the DB-ALM protocol and should be used for data evaluation. Detailed instructions are provided in the DB-ALM protocol no. 217 (11).
21. For each incubation (exposure) time 't' the following parameters are calculated:
- The arithmetic mean and standard deviation of the fluorescence intensity of the 12 blank controls (BC);
 - The arithmetic mean and standard deviation of the fluorescence intensity of the 12 vehicle controls (VC);
 - The mean BC value is subtracted from the VCs to obtain corrected VC values.
 - For each test chemical and PC concentration, the respective test chemical control value is subtracted from their obtained values to calculate corrected test chemical or PC values.

22. To determine the relative peptide depletion in % for each test chemical concentration per exposure time, the following calculation is performed:

$$\text{relative peptide depletion [\%]} = \left[1 - \left(\frac{\text{corrected test chemical or PC value}}{\text{mean of corrected VC}} \right) \right] \times 100\%$$

23. For each test chemical concentration, the arithmetic mean and standard deviation of the three replicates is calculated (per exposure time). A student's t-test is performed to test whether the peptide concentrations measured in the three replicates is statistically significantly lower as compared to the concentration in the 12 VC wells.
24. In the kDPRA, reaction kinetic rate constants are determined as explained below if (i) a peptide depletion of $\geq 13.89\%$ is observed at the highest test chemical concentration (final test chemical concentration 5 mM) at a given time and if (ii) the difference is statistically different from the VC. This 'positivity criterion' is based on the 'positive' criterion for peptide reactivity in the cysteine only prediction model of the DPRA described in Appendix I of this test guideline. If the positive criterion is not met, the test chemical is considered to be non-reactive according to the prediction model shown in paragraph 28.

The natural logarithm of the non-depleted peptide concentrations (100-relative peptide depletion (%)) is plotted vs. the concentration of the test chemical at each time point. If a linear relationship is observed (correlation coefficient > 0.90), the slope of this curve is determined. The absolute value of this negative slope corresponds to the observed reaction kinetic constant (pseudo first order rate constants k_{observed} in mM^{-1}). From the k_{observed} value for each exposure time, the reaction kinetic constant (k_t) per concentration and incubation (exposure) time 't' is calculated as follows:

$$k_t [\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}] = k_{\text{observed}} \cdot \frac{1000}{60 \cdot t}$$

with 't' being the exposure time in minutes. If no linear relationship is observed (i.e., correlation coefficient < 0.90), the recommendations within paragraph 27.ii should be followed.

25. For each exposure time 't' with a correlation > 0.90 , the decimal logarithm ($\log k_t$) is calculated and the highest value is determined as $\log k_{\text{max}}$.

Acceptance criteria

26. The following criteria should be met for a run to be considered valid. If one or more of these criteria is not met the run should be repeated.
- PC: the log k of the PC at 90 min ($\log k_{90 \text{ min}}$) should be within the following range: -1.75 to -1.40 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. If no $\log k_{90 \text{ min}}$ is obtained in case of e.g., reactivity is not yet statistically significant, the value at 150 min ($\log k_{150 \text{ min}}$) can be taken into account and should lie in the following range: -1.90 to -1.45 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.
 - VC: The coefficient of variance of the 12 VC values of a plate should be < 12.5% for at least 5 of the 6 exposure times.
27. The data obtained for the test chemical are further assessed to check for possible conditions which may affect results:
- Interrupted time-course: If significant peptide depletion is observed at early time-points but not at following time points, there is either an intrinsic non-linear reaction for the test chemical or an experimental variation. In such cases the run is repeated. If the same pattern is reproducible, a non-linear kinetic is proven and the rate-constant observed at early time points is accepted.
 - Non-linear concentration-response: There are few cases where the concentration-response is not linear, but clear depletion is noted. In such cases no rate constant is calculated by the slope method, as regression coefficient is $R^2 < 0.90$. Alternatively, rate constants can also be calculated based on individual depletion values according to the formula:

$$k = [\ln(100/(100 - dp))]/(E \times t)$$

Where 'dp' is depletion in %, 'E' is the concentration of test chemical and 't' is the incubation (exposure) time. Rate constants according to this formula are calculated at each time point 't' and at each concentration 'E' with depletion values above the threshold of 13.89%. For each time point 't' the average of the values for the different concentrations is taken, and then again the $\log k_{\text{max}}$ for the highest rate at any given time point is reported.

In such a case a repetition should be performed to check whether this non-linear behaviour is intrinsic to the test chemical, or whether an experimental variation is the cause. If the non-linearity is reproducible, this alternative rate calculation based on the individual depletion values is used for the final rating.

- Fluorescence interference, namely autofluorescence or fluorescence quenching: Based on the control wells with test chemical only in absence of the test peptide, incidences of autofluorescence and fluorescence quenching by the test chemical can be detected. As the values are corrected for the autofluorescence recorded in the test chemical control wells, this shall not be a problem for low autofluorescence, but with a high autofluorescence, the fluorescence of the peptide-adduct and the autofluorescence may not be fully additive, and subtraction of autofluorescence may lead to apparent depletion, which is not due to loss of peptide signal but to this non-additivity. Thus, one should check whether the observed depletion is time dependent. If this is not the case and autofluorescence is observed, then depletion from autofluorescence is assumed to occur. Fluorescence quenching can also lead to 'pseudo-depletion', but this would happen immediately and resulting depletion would not increase with time. If both conditions are met, it is assumed that depletion from quenching occurs. These cases are rare. If this is not clear from the results a run may be repeated, but if the effect is clear-cut no repetition is needed. In such a case, the test chemical cannot be assessed in the kDPRA (technical limitation)

unless the reaction can be measured with an alternative fluorescent probe not leading to autofluorescence or quenching (see Section II of the Annex 1 to DB-ALM protocol (11)).

- (iv) All above cases are detailed in the DB-ALM protocol and automatic alerts appear in the Excel template provided with the DB-ALM protocol when evaluating the data.

Prediction model

28. The kDPRA uses kinetic rates of cysteine peptide depletion for discrimination of UN GHS subcategory 1A skin sensitisers from those not categorised as subcategory 1A (non-subcategory 1A) according to UN GHS (3). Results obtained with the test method that do not lead to subcategory 1A categorisation should be interpreted in the context of the limitations stated in paragraph 3 and Annex 1 of this appendix.

Table 1: kDPRA prediction model

Reaction rate	kDPRA Prediction
$\log k_{\max} \geq -2.0$	UN GHS subcategory 1A
Non-reactive or $\log k_{\max} < -2.0$	Not categorised as UN GHS subcategory 1A* (non-subcategory 1A)

* Further information is needed to discriminate UN GHS subcategory 1B from UN GHS No Category. Depending on the context (e.g. IATA, DA) this information can be generated prior to or after performing the kDPRA.

29. In cases of a $\log k_{\max}$ result close to the -2.0 threshold falling in the borderline range calculated for kDPRA (i.e., between -1.93 and -2.06 (12)), no conclusive prediction can be made. In this case, re-testing and/or additional data/information is needed before a conclusive prediction can be made.
30. The kinetic rate constant may be further used in integrated approaches such as IATA or DA to assess the skin sensitisation potency of a test chemical in a continuous scale as needed for risk assessment (3) (10).

Test report

31. The test report should include the following information

Test chemical and Controls (positive control and solvent/vehicle)

For all mono-constituent substance (test and control chemicals)

Chemical identification, such as IUPAC or CAS name(s), CAS number(s), SMILES or InChI code, structural formula, and/or other identifiers;

Physicochemical properties such as physical state, appearance, water solubility, molecular weight, and additional relevant physicochemical properties, to the extent available;

Purity, chemical identity of impurities as appropriate and practically feasible, etc;

Treatment prior to testing, if applicable (e.g. warming, grinding);

Concentration(s) tested;

Storage conditions and stability to the extent available.

Additional information for positive control

Reference to historical positive control results demonstrating suitable run acceptance criteria, if applicable.

Additional information for solvent/vehicle control

Solvent/vehicle used and ratio of its constituents, if applicable;

Justification for choice of other solvent than acetonitrile and experimental assessment of the solvent effect on peptide stability.

Peptide

Supplier, lot, purity

Fluorescence analysis

Fluorimeter used (e.g., model and type), including wavelengths settings

Proficiency testing

Statement that the testing facility has demonstrated proficiency in the use of the test method before routine use by testing of the proficiency chemicals.

Discussion of the results

Description of any unintended modifications to the test procedure.

Discussion of the results obtained with the kDPRA test method and if it is within the ranges described in paragraph 29.

Description of any relevant observations made, such as appearance of precipitate in the reaction mixture at the end of the incubation time, if precipitate was resolubilised or centrifuged.

Conclusion

LITERATURE FOR APPENDIX III

- (1) Wareing, B., Urbisch, D., Kolle, S. N., Honarvar, N., Sauer, U. G., Mehling, A. and Landsiedel, R., (2017) Prediction of skin sensitization potency sub-categories using peptide reactivity data. *Toxicol In Vitro* 45, 134-145.
- (2) Roberts, D. W. and Natsch, A., (2009) High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 592-603.
- (3) Natsch, A., Haupt, T., Wareing, B., Landsiedel, R., and Kolle, S.N., (2020) Predictivity of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for sensitizer potency as-sessment and subclassification. *ALTEX*, 37(4), 652-664
- (4) Wareing, B., Kolle, S.N., Birk, B., Alépée, N., Haupt, T., Kathawala, R., Kern, P., Nardelli, L., Raabe, H., Rucki, M., Ryan, C., Verkaart, S., Westerink, W., Landsiedel, R., Natsch, A., (2020) The kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA): Intra- and inter-laboratory reproducibility in a seven-laboratory ring trial. *ALTEX*, 37(4), 639-651, DOI: 10.14573/altex.2004291.
- (5) Hoffmann S., Kleinstreuer N., Alépée N., Allen D., Api A. M., Ashikaga T., Clouet E., Cluzel M., Desprez B., Gellatly N., Goebel C., Kern P. S., Klaric M., Kühnl J., Lalko J. F., Martinozzi-Teissier S., Mewes K., Miyazawa M., Parakhia R., van Vliet E., Zang Q., Petersohn D., Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit Rev Toxicol*, 2018. 48(5): p. 344-358.
- (6) Basketter, D. A., Alepee, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Gilmour, N., Goebel, C., Hibatallah, J., Hoffmann, S., Kern, P., Martinozzi-Teissier, S., Maxwell, G., Reisinger, K., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M. and Templier, M., (2014) Categorization of chemicals according to their relative human skin sensitizing potency. *Dermatitis* 25, 11-21.
- (7) International ad hoc Expert Panel, (2020) Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA) as a modified version of the DPRA assay according to OECD TG 442C, to extend its regulatory applicability to identify UN GHS Subcategory 1A.
- (8) S. Casati, K. A., B.D. Asturiol, D. Basketter, S. Dimitrov, C. Dumont, A.T. Karlberg, J. P. Lepoittevin, G. Patlewicz, D. Roberts, A. Worth, (2016) Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. Available at: <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479><http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100479>, last accessed 27.05.206.
- (9) Urbisch, D., Becker, M., Honarvar, N., Kolle, S. N., Mehling, A., Teubner, W., Wareing, B. and Landsiedel, R., (2016) Assessment of Pre- and Pro-haptens Using Nonanimal Test Methods for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* 29, 901-13.
- (10) Natsch, A., Emter, R., Gfeller, H., Haupt, T. and Ellis, G., (2015) Predicting Skin Sensitizer Potency Based on In Vitro Data from KeratinoSens and Kinetic Peptide Binding: Global Versus Domain-Based Assessment. *Toxicol. Sci.* 143, 319-32.
- (11) DB-ALM Protocol 217: The kinetic Direct Peptide Reactivity assay (kDPRA). Accessible at http://cidportal.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/DBALM_docs/217_P_kDPRA_final_27Oct20.pdf.
- (12) Kolle, S., Mathea, M., Natsch, A., Landsiedel, R., (2021) Borderline ranges for in chemico and in vitro skin sensitization methods determined from ring trial data - acknowledging experimental

uncertainty in defined approaches, Toxicology Letters, 350.

- (13)ICCVAM, ICCVAM Test Method Evaluation Report: Usefulness and Limitations of the Murine Local Lymph Node Assay for Potency Categorization of Chemicals Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans. 2011. NIH Publication 11-7709.
- (14)ECETOC, ECETOC Document No. 46: Potency Values from the Local Lymph Node Assay: Application to Classification, Labelling and Risk Assessment. 2008.
- (15)OECD (2021), Validation report: Kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 337 Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (16)OECD (2021), Independent Peer-Review Panel Report on the scientific validity of the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA). Series on testing and Assessment n° 338. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

APPENDIX III, ANNEX 1

KNOWN LIMITATIONS OF THE KINETIC DIRECT PEPTIDE REACTIVITY ASSAY

The table below provides a summary of the known limitations of the kDPRA.

Substance class / interference	Reason for potential underprediction or interference	Data interpretation	Example substance
Metals and inorganic compounds	Known to react with proteins via mechanisms other than covalent binding	Should not be tested	Nickel sulphate; 7786-81-4
Hydroquinones, catechols and aromatic amines	Lag time of oxidation may reduce apparent reaction rate	Results with $\log k_{\max} < -2.0$ can only be accepted if low reactivity can be confirmed after oxidation	Para-phenylenediamine; 106-50-3; Human and LLNA 1A
Thiols or thiol-releasers	Test chemicals with primary SH-groups and those decomposing under the conditions of the assay can react with the detection probe	Test chemical cannot be tested in the kDPRA with derivatisation by thiol reactive probes: other kinetic data with the test peptide e.g. by HPLC may need to be generated (not part of this guideline)	Thioglycerol; 96-27-5; LLNA UN GHS category 1B; Human n/a
Test chemicals having an exclusive lysine-reactivity as observed in DPRA or ADRA	kDPRA only measures reactivity with the cysteine peptide	Results with $\log k_{\max} < -2.0$ for chemicals which specifically deplete NH_2 -groups, but not SH-groups in DPRA or ADRA are not conclusive	Some acyl-halides, phenol-esters or aldehydes, Dihydrocoumarin, 119-84-6; LLNA UN GHS category 1B; Human n/a, Glutaric aldehyde; 111-30-8; Human and LLNA UN GHS category 1A
Pro-haptens	Test chemicals for which there is evidence that they strictly require enzymatic bioactivation to exert their skin sensitizing potential	Strict pro-haptens may be underestimated. However chemicals which are i) strict pro-haptens (i.e. test chemicals not also acting as direct haptens or pre-haptens, too) and ii) strong allergens were found to be rare	Diethylenetriamine; 111-40-0 (human 1A, LLNA UN GHS category 1)
Fluorescent chemicals with excitation in the range of the fluorescent probe	If fluorescence of test chemicals and of the mBrB-peptide adduct is not additive, pseudo-depletion is observed	Follow the considerations in the DB-ALM Protocol n° 217 to evaluate assay interference	Tetrachlorosalicylanilide; 1154-59-; Human and LLNA UN GHS category 1A
Test chemicals absorbing in the emission range of the probe	If test chemical quenches fluorescence emission of the mBrB-peptide adduct, pseudo-depletion is observed	Follow the considerations in the DB-ALM Protocol n° 217 to evaluate assay interference	Vanillin, 121-33-5; LLNA NC; Human n/a
Mixtures of unknown composition, substances of unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials	no information on applicability of kDPRA is available in the published literature	n/a	UVCBs, chemical emissions, products or formulations with variable or not fully known composition
Test chemicals which cannot be dissolved in water or	Not sure if sufficient exposure can be achieved	In such cases, a $\log k_{\max} > -2.0$ could still be used to support the identification of the test chemical as a UN GHS subcategory	n/a

acetonitrile or a compatible water-miscible solvent		1A skin sensitiser but no firm conclusion should be drawn in case $\log k_{\max}$ is < -2.0 . Alternative vehicle may be used according to the prescriptions given in paragraph 12.	
Test chemicals which precipitate in reaction solution	Not sure if sufficient exposure can be achieved: If a precipitate is observed immediately upon addition of the test chemical solution to the peptide solution, due to low aqueous solubility of the test chemical, one cannot be sure how much test chemical remained in the solution to react with the peptide.	In such a case, a positive result (i.e. $\log k_{\max} \geq -2.0$) could still be used, but a negative result (i.e., non-reactive or $\log k_{\max} < -2.0$ outcome) should be interpreted with due care (see also provisions in paragraph 4 for the testing of chemicals not soluble up to a concentration of 20 mM in the kDPRA).	Methyl-2-nonynoate ⁶ ; 111-80-8; LLNA NC
Test chemicals promoting cysteine-peptide oxidation		May lead to a potential over estimation of peptide reactivity.	DMSO

⁶ Roberts, D.W. and A. Natsch, *High throughput kinetic profiling approach for covalent binding to peptides: Application to skin sensitization potency of michael acceptor electrophiles*. Chem. Res. Toxicol., 2009. **22**(3); p. 592-603

PROFICIENCY SUBSTANCES

In Chemico Skin Sensitisation: kinetic Direct Peptide Reactivity Assay (kDPRA)

Prior to routine use of the test method described in this appendix, laboratories should demonstrate technical proficiency by correctly obtaining the expected kDPRA prediction for at least 8 of the 9 proficiency substances recommended in Table 1 and by obtaining cysteine rate constants $\log k_{\max}$ that fall within the respective reference range for 7 out of the 9 proficiency substances. These proficiency substances were selected to represent the range of responses for skin sensitisation hazard and potency. Other selection criteria were that they are commercially available, that high quality *in vivo* reference data and high quality *in vitro* data generated with the kDPRA are available, and that they were used in the industry-coordinated validation study to demonstrate successful implementation of the test method in the laboratories participating in the study.

Table 1: Recommended proficiency substances for demonstrating technical proficiency with the kinetic Direct Peptide Reactivity Assay

Proficiency substances	CASRN	Physical state	<i>In vivo</i> prediction ¹	UN GHS Category LLNA	UN GHS Category human	kDPRA prediction ²	Range of $\log k_{\max}$ ²
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	Solid	Sensitiser (extreme)	1A	1A	1A	(-0.8) – (-0.4)
Methylisothiazolinone	2682-20-4	Solid	Sensitiser (extreme)	1A	1A	1A	(-0.5) – (-0.1)
Oxazolone	15646-46-5	Solid	Sensitiser (extreme)	1A	No data	1A	(-0.3) – (0.0)
Methyl-2-octynoate	111-12-6	Liquid	Sensitiser (strong)	1A	1A	1A	(-1.6) – (-1.2)
Isoeugenol	97-54-1	Liquid	Sensitiser (moderate)	1A	1A	1A	(-1.4) – (-1.1)
2,3-Butanedione	431-03-8	Liquid	Sensitiser (weak)	1B	No data	non-1A (1B or NC)	(-3.2) – (-2.1)
Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)	97-90-5	Liquid	Sensitiser (weak)	1B	1B	non-1A (1B or NC)	(-2.8) – (-2.1)
4-Methoxyacetophenone	100-06-1	Solid	Non-sensitiser	No Cat. ³	No Cat. ³	non-1A (1B or NC)	Not reactive
Chlorobenzene	108-90-7	Liquid	Non-sensitiser	No Cat. ³	No Cat. ³	non-1A (1B or NC)	Not reactive

¹The *in vivo* hazard and (potency) predictions are based on LLNA data (13). The *in vivo* potency is derived using the criteria proposed by ECETOC (14).

² Rounded ranges determined on the basis of at least 14 $\log k_{\max}$ determinations generated by 7 independent laboratories.

³ Non sensitisers according to the UN GHS.

Unclassified

English - Or. English

19 September 2022

ENVIRONMENT DIRECTORATE
CHEMICALS AND BIOTECHNOLOGY COMMITTEE

**Detailed Review Paper on In Vitro Test Addressing Immunotoxicity With a Focus on
Immunosuppression**

Series on Testing and Assessment No. 360

JT03502631

OECD Environment, Health and Safety Publications
Series on Testing & Assessment
No. 360

Detailed Review Paper on In Vitro Test Addressing Immunotoxicity
With a Focus on Immunosuppression

IOMC

INTER-ORGANIZATION PROGRAMME FOR THE SOUND MANAGEMENT OF CHEMICALS

A cooperative agreement among FAO, ILO, UNDP, UNEP, UNIDO, UNITAR, WHO, World Bank and OECD

Environment Directorate
ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT
Paris 2022

About the OECD

The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) is an intergovernmental organisation in which representatives of 38 industrialised countries in North and South America, Europe and the Asia and Pacific region, as well as the European Commission, meet to co-ordinate and harmonise policies, discuss issues of mutual concern, and work together to respond to international problems. Most of the OECD's work is carried out by more than 200 specialised committees and working groups composed of member country delegates. Observers from several countries with special status at the OECD, and from interested international organisations, attend many of the OECD's workshops and other meetings. Committees and working groups are served by the OECD Secretariat, located in Paris, France, which is organised into directorates and divisions.

The Environment, Health and Safety Division publishes free-of-charge documents in eleven different series: **Testing and Assessment; Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring; Pesticides; Biocides; Risk Management; Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology; Safety of Novel Foods and Feeds; Chemical Accidents; Pollutant Release and Transfer Registers; Emission Scenario Documents;** and **Safety of Manufactured Nanomaterials.** More information about the Environment, Health and Safety Programme and EHS publications is available on the OECD's World Wide Web site (www.oecd.org/chemicalsafety/).

This publication was developed in the IOMC context. The contents do not necessarily reflect the views or stated policies of individual IOMC Participating Organizations.

The Inter-Organisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC) was established in 1995 following recommendations made by the 1992 UN Conference on Environment and Development to strengthen co-operation and increase international co-ordination in the field of chemical safety. The Participating Organisations are FAO, ILO, UNDP, UNEP, UNIDO, UNITAR, WHO, World Bank and OECD. The purpose of the IOMC is to promote co-ordination of the policies and activities pursued by the Participating Organisations, jointly or separately, to achieve the sound management of chemicals in relation to human health and the environment.

This publication is available electronically, at no charge.

Also published in the Series on Testing and Assessment: [link](#)

**For this and many other Environment,
Health and Safety publications, consult the OECD's
World Wide Web site (www.oecd.org/chemicalsafety/)**

or contact:

**OECD Environment Directorate,
Environment, Health and Safety Division**

2 rue André-Pascal

75775 Paris Cedex 16

France

Fax: (33-1) 44 30 61 80

E-mail: ehscont@oecd.org

© **OECD 2022** Applications for permission to reproduce or translate all or part of this material should be made to: Head of Publications Service, RIGHTS@oecd.org, OECD, 2 rue André-Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France

Unclassified

FOREWORD

The project to develop a Detailed Review Paper (DRP) on non-animal approaches that could be used to test chemicals for their potential immunotoxic effects was initiated by the Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), who submitted a Standard Project Submission Form (SPSF) proposing the preparation of this DRP to OECD. Japan had already investigated the potential relevance and reproducibility of certain *in vitro* assays used in specific combinations to inform the assessment of immunotoxicity. Given the absence of standardized *in vitro* methods in this particular area of chemical safety testing, the Working Party of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme recommended to start with a DRP to enable an overview of the state-of-the-science, techniques, and methods available.

The Detailed Review Paper was prepared by an international team of subject matter experts. A dedicated OECD Expert Group was formed to provide input into the draft DRP and two WNT commenting rounds were organized in 2020 and 2021 to subject the document to broad review and comments from the regulatory science community.

The Working Party of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme approved this Detailed Review Paper at its 34th meeting in April 2022. This document is published under the responsibility of the Chemicals and Biotechnology Committee.

LIST OF ABBREVIATIONS

AOP: Adverse Outcome Pathway
 CFU-GM: Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage
 CTL: Cytotoxic T lymphocyte
 DC: Dendritic Cell
 DHR: Delayed Hypersensitivity Response
 DTH: Delayed Type Hypersensitivity
 EAGMST: Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics
 ECVAM: European Centre for the Validation of Alternative Methods
 FCC: Fluorescent Cell chip
 HWBCRA: Human Whole-Blood Cytokine Release Assay
 ICH: International Conference on Harmonisation
 IL: interleukin
 IL2-LA: IL-2 Luciferase activity
 IL8-LA: IL-8 Luciferase activity
 iPSC: induced Pluripotent Stem Cells
 LOEL: Lowest Observed Effect Levels
 LPS: Lipopolysaccharide
 MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
 M-CFS: Macrophage Colony-Stimulating Factor
 MIG: Macrophage-Induced Gene
 MITA: Multi-ImmunoTox Assay
 MLR: Mixed Leukocyte Reaction
 mMITA: modified Multi-ImmunoTox Assay
 NK: Natural Killer
 OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development
 PGE₂: Prostaglandin E₂
 SLG: Stable Luciferase Green
 SLR: Stable Luciferase Red
 SLO: Stable Luciferase Orange
 SRB: Sulforhodamine B
 TDAR: T-cell-Dependent Antibody Response
 TF: Tissue Factor
 TM: Thrombomodulin
 TNF: Tumor Necrosis Factor
 TPA: Phorbol Myristate Acetate
 VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule 1

Table of contents

FOREWORD	6
LIST OF ABBREVIATIONS	7
EXECUTIVE SUMMARY	9
. Introduction	11
. Basic concept of immunotoxicity	14
. Current status of AOPs on immunotoxicity testing	16
. State-of-the-art knowledge in the field of <i>in vitro</i> or non-animal assays	18
<i>In vitro</i> opportunities to identify immunosuppressive agents	18
. Performance factors of <i>in vitro</i> assay(s)	25
. Performance information of <i>in vitro</i> assay(s) to be provided to health authorities	27
. Selection factors for the reference compounds to be used in development of the <i>in vitro</i> assay(s)	29
. <i>In vitro</i> immunotoxicological assessments using combinations of cell types or cell lines	33
8.1. Lessons from immunotoxicological assessments using rodents	33
2. <i>In vitro</i> immunotoxicological assessments using primary cells	34
3. <i>In vitro</i> immunotoxicological assessments using cell lines	34
4. Combination of <i>in vitro</i> assays and clustering analysis has the potential to increase predictivity	37
. Discussion and Conclusion	38
. References	40
. Appendix	46

EXECUTIVE SUMMARY

This Detailed Review Paper (DRP) aims to present and discuss the application and interpretation of *in vitro* immunotoxicity assays, mainly covering immunosuppression, and to define an *in vitro* tiered approach to testing and assessment. This project was led by Japan, as Japan has developed three Adverse Outcome Pathways (AOPs) for immunotoxicity in the OECD Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics (EAGMST). Japan also coordinated a validation study of the Multi-ImmunoTox Assay (MITA), based on one of the proposed AOPs.

A well-functioning immune system is essential for maintaining the integrity of an organism. Immune cells are an integral part of other systems including the respiratory, dermal, gastrointestinal, neurological, cardiovascular, reproductive, hepatobiliary, musculoskeletal system, and endocrine systems. As such, exposure to immunotoxic compounds can have serious adverse health consequences affecting responses to both communicable and non-communicable diseases. It is therefore important to understand the immunotoxic potential of xenobiotics and the risk(s) they pose to humans.

In contrast to the *in vivo* testing batteries traditionally used to investigate systemic chemical toxicity, *in vitro* methods have historically been used to generate focused mechanistic information. When using *in vitro* assays for screening purposes it is likely that several assays will be required to identify immunotoxicants because of the different components of the immune system and their influences on other systems. A tiered testing strategy is proposed to assess immunotoxicity *in vitro*. In the proposed tiered approach, pre-screening for direct immunotoxicity *in vitro* begins by evaluating myelotoxicity (Tier 1). Compounds capable of damaging or destroying bone marrow cells will most likely have immunotoxic effects, as the majority of immune cells are derived from a common precursor located in the adult bone marrow. If compounds are not potentially myelotoxic, they should be tested for direct leukotoxicity, as defined as toxicity to any cell of the lymphoid or myeloid lineages (Tier 2). Compounds should then be tested for immunotoxicity at non-cytotoxic concentrations using various approaches, such as cytokine production, T cell-dependent antibody response, lymphocyte proliferation assay, mixed leukocyte reaction, and natural killer cell assay (Tier 3).

Despite the need for an *in vitro* tiered system to evaluate immunotoxicity, at present there is no consensus on which assays to use, nor how, and there are no Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Test Guidelines to detect chemical immunosuppression *in vitro*. It is clear that one assay alone will not be able to cover all of the potential adverse effects of chemicals on the immune system and that a larger set of assays that will cover the spectrum of immunotoxicity is needed. The MITA is one example of such an integrated testing strategy which may be used to predict the immunotoxicity of chemicals, and may be even more powerful when combined with complementary assays. More research and investigation are needed to develop candidate assays amenable to detect immunotoxic substances without the use of animals, but available tools can already be used in an integrated fashion for that purpose.

. Introduction

1. Since the early 1980s, there has been increasing recognition that some natural and synthetic substances to which humans may be exposed are able to interfere with the function of the immune system (e.g. Vos, 1977; Dean et al 1982). As an adequately functioning immune system is essential for maintaining the integrity of an organism, immune dysregulation can have serious adverse health consequences, ranging from reduced resistance to infection and neoplasia to allergic and autoimmune conditions. For example, it is well-known in clinical practice that treatment of patients with immunosuppressive drugs, such as those intended to prevent rejection of organ transplants, is often associated with increased numbers of infections or tumors. In addition to drugs, environmental contaminants and food additives can also target the immune system, resulting in immune dysregulation. Originally the emphasis of immunotoxicology, which is defined as the study of toxicological effects of xenobiotics on the immune system, was on immunosuppression. Later, more attention was given to chemical-induced allergies, inadvertent immunostimulation, and chemical-induced autoimmunity. The immune system comprises a complex network of different cell types located in various organs and their mediators, which operate to maintain homeostasis. Because of its complex nature, influences of chemical exposure can occur on different components of the immune system, with different mechanisms, eventually leading to adverse health outcomes. For this reason, testing has been done most often in the intact animal if not in humans themselves, and *in vitro* testing was predominantly used to unravel specific mechanisms of immunotoxicity.

2. Current practices in immunotoxicity testing are still varied and employ either or both unchallenged and challenged immune systems. Although useful information can be obtained by the histopathology of immune organs and enumeration of immune cells obtained from regular 28-day general toxicity tests, most immunotoxicity testing historically has been organized into tiers (Hinton 2000; Luster et al. 1988). Functional immune tests, which may be used in various tiers, enable the generation of data of increased quality and specificity.

3. There are several regulatory guiding principles in immunotoxicology published as pharmaceutical industry guidances (eg. ICH S8 guidance) or chemical industry guidelines for immunotoxicity. In addition to the specific OECD Test Guidelines for skin sensitizing activity (*in vivo* OECD TG 406, *in vivo* TG 429, *in vivo* TG 442A-B, *in vitro* TG 442C-E, *in silico/in vitro* GL 497), other OECD guidelines for toxicity testing include assays for assessing immunotoxic potential in the context of more general toxicity testing, such as the 28-Day Repeated Dose Toxicity Study (OECD 407), the 90-Day Repeated Dose Toxicity Study (OECD 408), and the Extended One Generation Reproduction Toxicity Study (OECD 443). The World Health Organisation/International Programme on Chemical Safety (WHO/IPCS) has published the Guidance for Immunotoxicity Risk Assessment for Chemicals (IPCS Harmonization project No. 10) oriented at immunosuppression, inadvertent immunostimulation, and autoimmunity caused by chemical exposure.

4. A workshop hosted by the International Life Sciences Institute-Health and Environmental Sciences Institute (ILSI-HESI) was held to share perspectives on immunotoxicity testing, developmental immunotoxicity, and integrated approaches to testing and assessment (IATA¹) of immunotoxicity. The

¹ IATA Are pragmatic, science-based approaches for chemical hazard characterization that rely on an integrated analysis of existing information coupled with the generation of new information using testing strategies [See OECD

workshop summarized that standard toxicity studies, combined with trigger-based functional immune testing approaches, represent effective approaches to evaluate immunotoxic potential (Boverhof et al. 2014). To date, the chemical risk assessment practice in OECD member countries has relied to a large extent on animal data. However, these animal models and assays have many drawbacks: they are resource intensive (time, costs, and animal numbers), pose ethical problems, and have varying ability for predicting human health outcomes. For these reasons, there is a clear societal desire to minimize the use of experimental animals for toxicity testing, while ensuring adequate protection to human health and the environment. Efforts have been and are being made to replace, reduce, or refine animal-based assays as much as possible. The EU Directive (2010/63/EU) was sanctioned to achieve these goals, and some US regulatory agencies aim to phase out animal testing by 2035 (EPA, 2019).

5. In the regulatory context, while animal models for hypersensitivity (respiratory and skin sensitization for type 1 and type 4 hypersensitivity, respectively) and immunosuppression show an overall good correlation with human data, currently available animal models and assays are not valid to assess the potential for systemic hypersensitivity (type 2 and type 3 hypersensitivity) and autoimmunity. Because we understand the mechanism of dermal sensitization to a large degree, there has been success with the development of *in vitro* methods for hypersensitivity. Additional efforts for the development of *in vitro* assays to detect other forms of immunotoxicity (e.g. immunosuppression) are needed. One aim is that this DRP, which is focused on immunosuppression, will trigger further development of methods and approaches in those immunotoxicological aspects not covered by the current Test Guidelines. Several non-animal-based testing methods for immunotoxicity have been published, although few have reached the stage of validation and acceptance by international regulatory bodies. A workshop hosted by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM2) in 2003 focused on what was at that time the current status of *in vitro* systems for evaluating immunotoxicity (Gennari et al. 2005). In this workshop, a tiered approach for *in vitro* immunotoxicity testing (similar to that used for *in vivo* immunotoxicity testing) was proposed. The proposed tiered approach would begin with pre-screening for direct immunotoxicity by evaluating myelotoxicity (Tier 1). Compounds capable of damaging or destroying bone marrow will most likely have immunotoxic effects. If compounds are not potentially myelotoxic, they should be tested for leukotoxicity (Tier 2). Compounds should then be tested for immunotoxicity using various approaches, such as T cell-dependent antibody response (TDAR), lymphocyte proliferation assay, mixed leukocyte reaction (MLR), natural killer (NK) cell assay, dendritic cell (DC) maturation assay, human whole-blood cytokine release assay (HWBCRA), and fluorescent cell chip (FCC) assay (Tier 3).

6. The T lymphocyte (T cell), being a crucial cell type in function and regulation of many aspects of the immune system, has been a prime target in *in vitro* assays for immunotoxicity testing. The IL-2 Luc assay developed by Dr. S. Aiba from the Department of Dermatology at Tohoku University School of Medicine in Japan is one such assay that has reached a level of validation (Kimura, 2020). Yet, it is clear that one assay alone will not cover the entire spectrum of potential adverse effects of chemicals on the immune system. Any validated test will therefore be part of a larger set of different assays that could potentially assess all types of immunotoxicity including immunosuppression, sensitization, and autoimmunity, which together will be able to adequately predict immunotoxic action of chemicals. An integral battery of tests to achieve this goal, designated as Multi-ImmunoTox Assay (MITA), is being developed by the same institute, and is described in this document as an example of how to integrate multiple tests.

(2016) Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA), Series on Testing and Assessment No. 260].

7. This DRP reviews developments made in the field of non-animal-based immunotoxicity testing. Immunotoxicity by drugs or chemicals can be manifested in various ways, including dysregulation of the immune response, which could lead to immunosuppression or inappropriate immunostimulation. The latter can include unintended immune stimulation, sustained inflammation, hypersensitivity reactions and autoimmune disease. With reference to chemical-induced immunotoxicity, the effect may not be exclusively in one direction and the same substance can produce immunosuppression or immune stimulation, depending on the dose and the cellular target. Thus, it may be more appropriate to define an immunotoxic substance as any agent that can alter one or more immune functions resulting in an adverse effect for the host. In this way we focus not on the direction of the effect, but on its consequence. For this reason, we prefer to use the term immunotoxicant/immunotoxicity throughout the document, although the primary focus of this DRP will be on immunosuppression. This document is not meant to be an extensive review of immunology but does include a brief overview of the immune system, a description of commonly available assays and data that have been used to determine suppressive effects of chemicals on immune responses, and considerations for establishing assays for immunotoxicity testing. Thus, the purpose of this DRP is to provide a brief overview of the complicated nature of the immune system and assessment of immunotoxicity using cell-based methods from a regulatory standpoint. The focus of this DRP is thus on in vitro test methods that are considered ready for standardisation as OECD Test Guidelines. Although there is on-going research to further develop computational approaches, organ-on-a-chip and other technologies, these are not covered in this DRP since the level of readiness for regulatory application in the area of immunotoxicity may still be limited.

. Basic concept of immunotoxicity

8. The immune system is responsible for providing protection against foreign invaders while not reacting to self-entities. The responses required to eliminate a threat occur at the same time that responses to a non-threat must be quelled. For these reasons, immunity is dynamic, with constant surveillance needed to determine whether to initiate an immune response or to not respond. Immunity can therefore be considered a continuum along which the actions of initiating a response, resolving a response, or not responding at all are carefully balanced to achieve immune homeostasis. A tip of the balance can lead to morbidity or mortality; suppression of immune responses renders an individual susceptible to infections or cancer, while enhancement can result in hypersensitivity or autoimmune disease.

9. The immune system is comprised not only of specific immune organs, but also specialized immune cells present in most tissues. It is therefore an integral part of other systems including the respiratory, dermal, gastrointestinal, neurological, cardiovascular, reproductive, hepatobiliary, musculoskeletal, and endocrine systems. An immune response occurs through the coordination of many different cell types and can involve several tissues. The thymus and bone marrow are critical for immune cell development, while the lymph nodes and spleen are organs in which many immune responses occur.

10. Initially, the cells that are involved in detecting a threat are those belonging to the innate arm of the immune response. Innate cells, such as macrophages and neutrophils, express receptors that specifically recognize pathogen-specific patterns of proteins or lipids on foreign invaders. These innate cells can release directly cytotoxic proteins, or produce cytokines or chemokines to recruit other immune cells to the area of insult. Macrophages and dendritic cells (DCs) also serve as antigen presenting cells (APCs), which provide a bridge between the innate and adaptive arms of the immune response. The most critical APC is the DC. DCs are capable of antigen uptake, allowing for removal and destruction of pathogens. The DCs also process the antigen and present antigenic epitopes to T cells, allowing for activation of the adaptive arm of the immune response.

11. The adaptive immune response includes actions by T cells and B cells, which express receptors that recognize antigenic epitopes. Pathogen-specific T cells and B cells then undergo robust proliferation, known as clonal expansion, to ensure that a large population of cells is present to react to the current threat. Specialized subsets of T cells aid in the immune response by recruiting or activating other immune cells (TH1 or TH2 cells) or by directly killing infected cells (cytotoxic T cells, CTL). Other specialized T cells include TH17 cells, which produce high levels of pro-inflammatory cytokines that recruit innate cells, and regulatory T cells (Tregs), which help to regulate the immune response and prevent autoimmune responses. The primary role of the B cell in an adaptive response is to produce antibodies, which can neutralize foreign invaders, initiate cytolysis of infected cells, or enhance the actions of innate cells, such as phagocytosis. There are also specialized cells called innate lymphoid cells (iLCs) that play a critical role in early responses in part through robust cytokine production. Both the innate and adaptive arms of an immune response can contribute to inflammation, and even though inflammation is a normal process of pathogen destruction, it can also produce tissue damage.

12. It is clear from the above that the immune system has the functional mechanisms to eradicate threats but must also be tightly regulated to avoid inappropriate reactions. Thus, the immune system is

susceptible to toxic insults in part because of: 1) the need to maintain the delicate balance between activation, regulation, and silencing; 2) its dependence on regeneration of cells from hematopoietic stem cells in the bone marrow; 3) its requirement of clonal expansion of T cells and B cells by cellular proliferation during the adaptive response; 4) the required maintenance of appropriate levels of lymphocyte subsets, including effector, memory and regulatory subsets; and 5) its interaction with other physiological systems (i.e., gut microbiota) to maintain immune homeostasis.

13. In considering how a drug or chemical exhibits immunosuppression, the agent might alter the number of cells (innate or adaptive), the ability of the cells to produce cytokines, chemokines, antibodies or growth factors, the composition of the subpopulations of cells present at the site of the response, or the function of the cells (i.e., kill infected cells or proliferate). Signs of immunotoxic potential of agents in standard animal toxicology studies can be defined by hematological changes (i.e., leukocytopenia/leukocytosis, granulocytopenia/granulocytosis, or lymphopenia/lymphocytosis), alterations in immune system organ weights or histology, changes in serum antibodies, or changes in incidence of infections or tumors (Galbiati, et al., 2010).

14. Once it has been determined that an agent possesses immunosuppressive potential, the mechanism(s) by which an agent acts can be investigated. First, given the extensive involvement of different cell types and organs in an immune response, the cellular target(s) must be defined, which could identify that the innate or adaptive (or both) arms are sensitive to alteration by a drug or chemical. Second, it is important to define whether the parent compound or a metabolite is mediating the immunotoxic effects. Immune cells have limited capacity to metabolize chemicals, but immune cells may be targeted by metabolites generated in other organs, such as the liver. Third, it is important to determine whether the agent is directly or indirectly producing immune system toxicity. For example, there are critical interactions between the immune system and endocrine systems such that immunity is regulated by various neurotransmitters and hormones (Karmaus et al 2015). Thus, the mechanisms by which an immunotoxicant acts might be different in males versus females, or the mechanism of immune suppression might involve induction of stress, as high glucocorticoid levels suppress immunity. Fourth, an immunotoxicant might alter the gut microbiome, subsequently alerting immune homeostasis. Finally, the intracellular components altered by the agent that led to immune alteration should be defined. For instance, identification of whether a drug or chemical alters specific cytokines could dictate if the agent will affect all T cells, T cells and B cells, or subpopulations of one or both cells (i.e., TH1, TH2, TH17, and/or Tregs).

15. In summary, a robust immune response requires the careful coordination of cellular interactions, subsequent recruitment and/or activation of various cells, and mechanisms for regulation at all steps. There are several cell types, immune cellular functions, and/or changes in distinct physiological systems that influence immune homeostasis and might be disrupted by an immunotoxicant. Thus, *in vitro* immune toxicity tests are critical tools for deciphering whether a drug or chemical suppresses the immune response, but it is just as important to use a battery of tests to fully characterize how an agent exhibits immunotoxicity.

. Current status of AOPs on immunotoxicity testing

16. An Adverse Outcome Pathway (AOP) describes a logical sequence of causally linked events at different levels of biological organization, which follows exposure to a chemical and leads to an adverse health effect in humans or wildlife. AOPs are the central element of a toxicological knowledge framework, promoted by member countries through OECD, built to support chemical risk assessment based on mechanistic reasoning (OECD, 2020a). These AOPs are available in the AOP Wiki (OECD, 2020b), an interactive and virtual encyclopedia for AOP development.

17. All AOPs on immunosuppression currently available in the OECD work plan are on-going and shown in Table 1. Project 1.74: Inhibition of JAK3 leading to impairment of TDAR is under development and will not be discussed. However, two of the proposed AOPs, Project 1.38 “ No. 154: Inhibition of Calcineurin Activity Leading to Impaired T-Cell Dependent Antibody Response” and Project 1.48 “No. 277: Inhibition of IL-1 binding to IL-1 receptor leading to increased susceptibility to infection” are undergoing peer review. No. 154 shows calcineurin (CN) activity is inhibited when CN inhibitors bind to CN with their respective immunophilins, which interferes with the nuclear localization of nuclear factor of activated T cells (NFAT), a substrate of CN. As a result, the formation of functional NFAT complexes with activator protein-1 (AP-1) that bind at the site of IL-2, IL-4 and other T cell-derived cytokine promoters is reduced, thereby suppressing production of these cytokines. Among the affected cytokines from each of the helper T cell subsets, reduced production of IL-2 and IL-4 affects the proliferation and differentiation of B cells to suppress the TDAR. AOP 277 addresses one Molecular Initiating Event (MIE), impaired IL-1 receptor signaling. The biological plausibility of the signaling cascade from the activation of IL-1 receptor to the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B) is already confirmed (Verstrepen et al., 2008). In addition, the biological plausibility that suppressed NF- κ B activation leads to impaired T cell activation and antibody production leading to increased susceptibility to infection is supported by several published works (OECD, 2020b). To recapitulate some aspects of the *in vivo* immunotoxic responses by using *in vitro* methods, it will be very important to more closely mimic respective *in vivo* situations based on individual AOPs, although this may be complicated and laborious.

Table 1. Ongoing AOPs for Immunosuppression in the OECD work plan

Project 1.38: The Adverse Outcome Pathway on Binding of FK506-binding protein (FKBP12) by calcineurin inhibitors leading to immunosuppression	
Lead:	Japan
Inclusion in work plan:	2015
Current situation:	No. 154: Inhibition of Calcineurin Activity Leading to Impaired T-Cell Dependent Antibody Response , External review completed as presented in EAGMST meeting 2020.
Project 1.48: The Adverse Outcome Pathway on Dysregulation of IL-1 transcription leading to immunotoxicity	
Lead:	Japan
Inclusion in work plan:	2016
Current situation:	No. 277: Inhibition of IL-1 binding to IL-1 receptor leading to increased susceptibility to infection , External review completed as presented in EAGMST meeting 2020.
Project 1.74: Inhibition of JAK3 leading to impairment of TDAR	
Lead:	Japan
Inclusion in work plan:	2018
Current situation:	No. 315: Inhibition of JAK3 leading to impairment of T-Cell Dependent Antibody Response , Under Development

. State-of-the-art knowledge in the field of *in vitro* or non-animal assays

18. As mentioned in the previous sections, an immunotoxic compound is a compound that can alter one or more immune functions resulting in an adverse effect for the host (Luster et al., 1992). Any alteration in immune functions (e.g., antigen presentation, cytokine production, cell proliferation) that significantly deviates from control values and that can be linked to a downstream immunotoxic effect, should be considered as adverse if the immunomodulation is unintended. Considering this definition and that many functional immune tests following *in vivo* exposure are de facto *ex vivo* tests, attempts are being made to recapitulate the immune response following chemical exposure *in vitro* considering as much as possible the complexity of immune function and integration with multiple cells and soluble mediators. When interpreting the *in vitro* results, as discussed in section V, any limitations of the assay(s) (e.g. metabolic capacity) should be taken into consideration.

19. Although outside the scope of this DRP, the success in replacing animal testing for assessment of skin sensitization is a noteworthy accomplishment in the field of immunotoxicology. In the past two decades, thanks to the mechanistic understanding of the skin sensitization process that made it possible to define the first AOP (OECD (2014), *The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins*, OECD Series on Testing and Assessment, No. 168, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264221444-en>) incredible progress has been made into the development and validation of non-animal models to detect skin sensitizers, and several OECD test guidelines have been published (TG 442C-E and GL 497). In addition, several reviews have been recently published on this topic (de Avila, 2019; Casati et al., 2018; Corsini et al., 2018).

20. With the successful development of new approach methodologies for the assessment of skin sensitization, the next step must be the development of a strategy to address immunosuppression without the use of animals. We recognize that the level of complexity and our understanding of the mechanistic pathways that lead to immunosuppression are less clear than those for hypersensitivity, and additional studies are needed to prove the possibility and feasibility to address immunotoxicity using *in vitro* approaches (Corsini and Roggen, 2009; Lankveld et al., 2010; Galbiati et al., 2010; Luster and Gerberick, 2010; Hartung and Corsini, 2013). Nevertheless, we must acknowledge that important progress has been made in the development of *in vitro* assays for the assessment of immunotoxicity, with the HWBCRA and the MITA representing significant achievements (Langezaal et al., 2001; Kimura et al., 2018).

In vitro opportunities to identify immunosuppressive agents

21. As noted above, factors such as age at onset, gender, dose, duration, and route of exposure may result in differing effects on the immune system and skew the adverse response in the direction of immunosuppression or immunostimulation. Thus, while this DRP focuses on immunosuppression, all

the assays described in this section could lead to results demonstrating either no effect, immunosuppression and/or immune enhancement when compared to a control group, with the last two indicating an immunotoxic effect. Before beginning any evaluation, it would be useful to collect all available information in the literature, including information from sources such as the CompTox Dashboard, and the Integrated Chemical Environment data integrator, which include data from multiple endpoints, several of which may be relevant for immunotoxicity (Bell et al., 2017; Naidenko et al., 2021).

22. Due to the complexity and diversity of the immune responses, it was generally assumed that it would be very difficult to reproduce all the key events and processes *in vitro*. To a large extent, *in vitro* systems do not consider the interactions of the different cellular and soluble components involved in the immune response, nor the potential for neuro-immuno-endocrine interactions. Therefore, the assessment of *in vitro* immunotoxicity has often been valuable only in the cases of a direct immunotoxicant (Gennari et al., 2005). Several isolated processes can be studied *in vitro* including antigen presentation, lymphocyte proliferation, cytokine production, phagocytosis, lytic functions, and even primary antibody production, offering the possibility to assess immunotoxicity *in vitro*. Recently there has been incredible progress in 3D models with engineered immune tissues and organs, such as bone marrow, thymus, lymph nodes and spleen being described (see review by Gosselin et al., 2018), and microfluidic body-on-a-chip, and in the future it may be possible to identify both direct and indirect immunotoxicants using an integrated model of the whole human immune system (Shanti et al., 2018).

23. Primary human immune cells such as monocyte-derived DCs, T cells, and B cells obtained from human peripheral blood may be useful materials for *in vitro* testing and are highly clinically relevant. However, the use of human primary cells for developing a testing assay may have several issues regarding ethics, donor-to-donor variability, versatility, and reproducibility. Variability reflects diversity in individual immune capability that requires consideration, and it is important to understand and ensure that it is reflected in *in vitro* systems developed using non-primary cells. Variability and predictive capacity are important considerations for establishing scientific confidence for individual or combinations of *in vitro* methods. Use of induced pluripotent stem cells (iPSC) technology may further improve the versatility of *in vitro* assays. Several human immune cells including T cells, B cells, DCs, and NK cells have been generated from iPSC (Vizcardo et al., 2013; French et al., 2015; Senju et al., 2011; Kitayama et al., 2016). In the future, iPSC technology might be used to provide different populations of bone marrow cells such as iPSC-derived hematopoietic stem cells and mesenchymal stem/stromal cells to obtain a more complete picture of myelotoxicity *in vitro*.

24. When assessing the potential immunotoxicity of xenobiotics, bioavailability should also be considered as part of *in vitro* testing. If a compound is not systemically available, a direct adverse effect on the immune system should not be expected as the compound would not reach immune cells or tissues. However, local effects at the site of exposure would still be possible. For example, it is important to consider that the immune system is closely linked and influenced by the microbiota. A substance taken orally could influence the microflora and mucosal DCs, and even if it is not absorbed into the systemic circulation, it may in turn influence the immune response (Belkaid and Hand, 2014). *In vivo* toxicokinetic studies, if available, or physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models should be used to assess or predict absorption. For consistency, any alternative means to obtain information on systemic bioavailability without *in vivo* animal data should be preferred. At this regard, the ECHA Guidance in information requirements and chemical safety assessment Chapter R.7c (available at: https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7c_en.pdf/e2e23a98-adb2-4573-b450-cc0dfa7988e5) contains a section on how information on systemic bioavailability can be gathered.

25. As a general strategy, *in vitro* testing for direct immunotoxicity should be done in a tiered approach (adapted from Gennari et al., 2005; Corsini and Roggen, 2009), with the first tier measuring myelotoxicity (Tier 1). Myelotoxicity or bone marrow toxicity represents the decrease in production of cells responsible for providing immunity (leukocytes), carrying oxygen (erythrocytes), and/or those

responsible for normal blood clotting (thrombocytes). In the context of immunotoxicity, myelotoxicity would refer to toxicity to precursors of immune cells. Compounds that are capable of damaging or destroying the bone marrow will have a profound immunotoxic effect, since the effectors of the immune system itself will no longer be available. Therefore, if a compound is myelotoxic, according to the specific assay performed, the chemical will *de facto* be an immunotoxicant. *Ex vivo* colony forming assays are used to assess bone marrow toxicity in animal models. The methodologies for evaluating myelotoxicity *in vitro* using bone marrow culture systems are well-characterized and scientifically validated for reproducibility and predictive capacity (Pessina et al., 2003; 2005; Rich and Hall, 2005; Haglund et al., 2010), but they are not required for regulatory testing or widely accepted as a standard screening tool due to technical challenges. Results of a pre-validation study showed that the *in vitro* colony forming unit-granulocyte-macrophage assay (CFU-GM) is linear and highly reproducible within and between laboratories (Pessina et al., 2001; Pessina et al., 2010). In an international blind trial (Pessina et al., 2002), the model correctly predicted the human maximum tolerated dose (MTD) for 20 drugs out of the 23 tested (87%).

26. Compounds that are not directly myelotoxic may still selectively damage leukocytes (defined as cells of lymphoid or myeloid lineage), which are the primary effectors and regulators of immunity, so the next step in evaluating potential immune toxicity *in vitro* is testing for leukotoxicity (Tier 2). If the agent is cytotoxic to immune cells at concentrations relevant for human exposure, the agent should be considered an immunotoxicant. If not, data on leukotoxicity will be used for the selection of the concentration range to be used in Tier 3, in which only non-cytotoxic concentrations should be used (cell viability > 80%). The choice of the cellular model to be used in Tier 3 will depend on the target identified in Tier 2 and the functional test to be performed (e.g., B or T cells, DCs, NK cells). There are several methods that can be used to assess cytotoxicity, among which the fluorometric microculture cytotoxicity assay to screen for leukotoxicity can be mentioned. This assay is based on measurement of fluorescence generated from hydrolysis of fluorescein diacetate to fluorescein by cells with intact plasma membranes. This method has been used in primary peripheral blood mononuclear cells (from different species) by Hassan et al. (2007) to measure cell survival following exposure to cytotoxic drugs and shown to correlate well with CFU-GM data. Cytotoxicity may result from the destruction of rapidly dividing cells by necrosis or apoptosis. Alternatively, chemicals may cause cell death by interfering with cell activation by affecting signal transduction pathways. A variety of well-established and accepted methods are available for assessing cell viability (e.g., colorimetric, flow cytometric assays), and several of these assays are integral parts of currently accepted OECD TGs. If leukotoxicity occurs at concentrations relevant to the expected *in vivo* human exposure, then cytotoxicity remains a relevant effect associated with immunosuppressive potential. If expected *in vivo* concentrations are unknown, the use of PBPK models should be considered to predict pharmacokinetic parameters. After consideration of myelotoxicity and leukotoxicity, which if positive are sufficient to classify the compound as immunotoxic, basic immune cell functionality may then be assessed by performing specific functional assays that identify targeted cells and processes (Tier 3). These assays (i.e., proliferative responses, lytic activity, cytokine production), should be conducted using concentrations of the test chemical that are not cytotoxic and provide acceptable viability for the specific assay.

27. Alternative *in vitro* methods have the potential to reduce animal use and testing cost, to facilitate immunotoxicity screening, and prioritization efforts (Luebke, 2012). Several *in vitro* assays that evaluate specific functions or functional correlates of the immune system (e.g., CTL activity, NK cell activity, antibody production, cytokine production, cell proliferation) have been used to assess immunotoxicity. A significant response in any of these assays should be interpreted as the chemical possessing the potential for immunotoxicity and should warrant further investigation. In Table 2, relevant immune components, and opportunities for *in vitro* assessment of immunotoxicity (immunosuppression) are reported, and readers are referred to the cited works for further details. The tests shown in Table 2 refer to what has been published with the specific purpose of identifying immunotoxic substances *in vitro*. Other aspects of immune function may be evaluated (e.g., phagocytosis, production of lysozyme,

microbicidal activity) to identify the immunotoxic potential of a substance, but have been used less frequently for screening purposes. In addition, while there are numerous immune cell subtypes, (e.g., Th subpopulations or DC subsets), involved in the different immune responses, there is a need to establish validated methods to study how alterations in their functional capabilities contribute to immunotoxicity. Considering the complexity of the immune response, more than one *in vitro* test will likely be needed to define the immunotoxic potential of a xenobiotic. Table 2 also includes the source of cell used (i.e. human vs animal, or primary vs cell line). While some of the methods reported involve the use of primary cultures of animal origin, the partial replacement still allows for a reduction and refinement in the use of animals. Currently, the main issue for most of the *in vitro* models mentioned in Table 2 is the limited number of chemicals tested. Some of the most promising tests will be described in more detail in the following paragraphs, either because they have been validated or are in the process of validation or because they measure the production of antibodies, which in animal models is considered the most predictive parameter.

Table 2. Key targets in chemical-induced immunosuppression and *in vitro* test opportunities

KEY IMMUNOLOGICAL TARGETS (TIER)	IN VITRO OPPORTUNITIES	CELL MODEL	REFERENCES
Bone marrow (Tier 1)	Human lympho-hematopoietic colony-forming assay for myelotoxicity (e.g. CFU-GM)	Human bone marrow and umbilical cord blood; rodent bone marrow	Pessina et al., 2003; 2005; 2010; Rich and Hall, 2005; Haglund et al., 2010
Leukotoxicity (Tier 2)	Cell viability (e.g., MTT, LDH release assay, flow cytometry)	Rodent splenocytes; human peripheral blood mononuclear cells	Hassan et al 2007; GIVIMP, 2018
Innate immunity (Tier 3)	NK cell activity	Rodent splenocytes; human peripheral blood mononuclear cells	Lebrec et al., 1995
	Monocytes/macrophages cytokines	Human peripheral blood mononuclear cells (e.g. whole blood assay); rodent splenocytes; cell lines (e.g. THP-1)	Langezaal et al., 2001; Langezaal et al., 2002; Carfi et al., 2007; Vessillier et al., 2015; Kimura et al., 2018
	Mast Cells/Basophils	Human basophils	McGowan et al., 2013
Cell mediated immunity (Tier 3)	T cell proliferation	Rodent splenocytes; human peripheral blood mononuclear cells	Lebrec et al., 1995; Carfi et al., 2007
	Mixed leukocyte response (MLR)	Rodent splenocytes; human peripheral blood mononuclear cells	Lebrec et al., 1995
	Cytotoxic T lymphocyte (CTL)	Rodent splenocytes; human peripheral blood mononuclear cells	Lebrec et al., 1995
	Cytokine production	Rodent splenocytes; human peripheral blood mononuclear cells (e.g. HWBCRA); human cell lines (e.g. Jurkat T cells)	Langezaal et al., 2001; Langezaal et al., 2002; Ullerås et al., 2005; Carfi et al., 2007; Ringerike et al., 2005; Stølevik et al., 2010; Kimura et al., 2018
	Transcriptomic profiles	Human peripheral blood mononuclear cells; human cell lines (e.g. Jurkat T cells)	Hochstenbach et al., 2010; Shao et al., 2014; Schmeits et al., 2015
	<i>In vitro</i> antigen presentation to T cells	Mouse cell lines (e.g. 3A9; Ch27B)	Lehmann and Williams, 2018

Humoral immunity (Tier 3)	B cell proliferation	Rodent splenocytes; human peripheral blood mononuclear cells	Carfi et al., 2007
	<i>In vitro</i> antibody production	Rodent splenocytes; human peripheral blood mononuclear cells	Keoper and Vohr, 2009; Lu et al., 2009; Collinge et al., 2010; Fischer et al., 2011

The table reports methods that have been proposed as alternatives to animals for the identification of immunotoxicants.

28. Among these assays, the HWBCRA has the advantage of comprising multiple cell types in their natural proportion and environment, allowing the evaluation of both monocyte and lymphocyte functions by using selective stimuli (Langezaal et al., 2001 and 2002), while “omics” techniques can provide additional mechanistic understanding and hold promise for the characterization of classes of compounds and prediction of specific toxic effects (Hochstenbach et al., 2010; Shao et al., 2014; Schmeits et al., 2015). The IL-2 Luc assay also allows high-throughput analysis (Kimura et al., 2018), which will greatly expand the opportunities for *in vitro* testing. The CFU-GM assay, the HWBCRA as a pyrogen test, and the IL-2 Luc assay have undergone validation for reproducibility and predictive capacity.

29. The whole blood assay provides a more physiological environment, as compared to isolated peripheral mononuclear cells, which may allow for a broader assessment of immune functions. In addition to cytokine production as in the HWBCRA, the whole blood assay can be used to address many other relevant immunological endpoints, including NK cell activity, lymphocyte proliferation, and antibody production. The cost of performing these assays depends on the endpoints, but it is overall relatively inexpensive compared to *in vivo* studies, and feasibility is high due to extensive use of this methodology (Hartung and Corsini, 2013). In the *in vitro* pyrogen test (i.e., HWBCRA), which is used in the same way as the Limulus test to analyze the possible presence of contamination of Gram negative bacteria or their remnants in drugs, and in the analysis of water and industrial raw materials, samples are incubated with fresh or cryopreserved human whole blood for the detection of the production of the proinflammatory cytokine IL-1 β by enzyme-linked immunosorbent assay (Hartung and Wendel, 1995). In addition, the HWBCRA has also been adapted for immunotoxicity testing, to permit the potency testing of immunostimulants and immunosuppressants (Langezaal et al., 2001 and 2002). In this case, tested compounds are incubated in the presence of lipopolysaccharide (LPS) to activate monocytes or staphylococcal enterotoxin B to activate lymphocytes (mainly CD4+), and the release of IL-1 β and IL-4, respectively, are subsequently measured by ELISA. Results are then expressed as IC50 values for immunosuppression, or SC(4) (stimulatory concentration resulting in a four-fold increase) values for immunostimulation, depending on the results observed. Thirty-one pharmaceutical compounds were used to 2222optimize and standardize the method. The *in vitro* results correlated well with *in vivo* data, and the test appears to reflect immunomodulation, meaning that both immunosuppression and immunostimulation can be detected. Results were reproducible (CV = 20 +/- 5%), and the method could be successfully transferred to another laboratory. A sensitivity of 67% and a specificity of 100% for the combined endpoints were calculated, where “sensitivity” refers to correctly identifying positive immunotoxicants, and “specificity” refers to correctly identifying negative immunotoxicants (reviewed in Hartung and Corsini, 2013).

30. Progress in *in vitro* testing for direct immunotoxicity includes validation of existing assays and selection of the assay (or combination of assays) that performs best, as described in the last section of this document (section VIII). In particular, the two luciferase assays that comprise the MITA are undergoing official validation studies; the IL-2 Luc assay that evaluates the effects of chemicals on the IL-2 promoter activity in response to stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin (Io), and the IL-1 Luc assay that evaluates the effects of chemicals on the IL-1 β promoter activity in response to stimulation with LPS. During the validation studies, the lead laboratory evaluated

the predictivity of the IL-2 Luc assay by examining 25 chemicals in the validation studies and 60 chemicals in the test data set. The predictivity of the IL-2 Luc assay was 75% in 25 chemicals and 82.5% in 60 chemicals, respectively. This predictivity is not optimal to predict immunotoxicity of chemicals as a stand-alone test method. Combination with other immune function tests, in particular myelotoxicity tests or leukotoxicity tests, will increase the predictivity of the IL-2 Luc assay, as it is unable to detect myelotoxicity or antiproliferative effects (Kimura et al., 2014; Kimura et al., 2018).

31. In experimental animals, the TDAR is considered the “gold standard” to identify immunotoxic compounds (Luster et al., 1992; Lebrec et al., 2014). The TDAR has been the consensus choice for a functional endpoint to identify immunotoxicity hazard in most, if not all, regulatory guidelines, because the TDAR requires many of the cellular components of an immune response and thus, is a sensitive indicator of the overall immunotoxic potential of chemicals. Koeper and Vohr (2009), Lu et al. (2009), Collinge et al. (2010, 2020), and Fischer et al. (2011) reported the possibility to assess *in vitro* antibody production in the context of immunotoxicity. Antibody production provides a holistic summation of antigen processing, presentation and recognition, gene transcription and rearrangement, cell proliferation and differentiation, and ultimately, the production of antibodies, the effector molecules (Luebke, 2012). Koeper and Vohr (2009) and Fischer et al. (2011) used the *in vitro* antibody response (Mishell-Dutton culture) as an alternative to the existing animal tests to predict different immunosuppressants. Using this model, they were able to show that cell sources from both rats and mice were able to correctly predict all of 11 tested compounds and to clearly distinguish immunosuppressants from negative control substances. In another model proposed by Lu et al. (2009) a polyclonal immunoglobulin M (IgM) antibody-forming cell (AFC) response model to directly characterize immunotoxicity in primary mouse or human B cells was developed. CD40 ligand (CD40L) is used to activate B cells and to mimic T cell-dependent antibody responses *in vivo*. Antibody production, proliferation, and phenotypic changes characteristic of B cell activation as well as the plasma cell phenotype are measured. Two well-characterized immunotoxicants, arsenic and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide, were tested. The novel model proposed by Lehmann and Williams (2018) to evaluate effects on antigen presentation, which is a key step in successful immunization is also of interest. Even if it is based on the use of two mouse T and B cell lines (3A9 hen egg lysozyme-specific I-A^k restricted T cell hybridoma cell line and the mouse Ch27 B lymphoma cell line), the method allows the evaluation of the effect of chemical exposure on several integrated events critical for immunization, including uptake, processing and presentation of antigen by antigen presenting cells, and antigen recognition and IL-2 production and secretion by T cells (Lehmann and Williams, 2018). However, these assays do not address all aspects of the humoral immune response, and it will be necessary to develop methods which assess the ability of B cells to undergo somatic hypermutation, affinity maturation, and class-switch. In the future, the gold standard TDAR might be replaced with *in vitro* coculture systems using iPSC-derived DCs, T cells, and B cells, or ultimately a microphysiological system of human immune system-on-a-chip consisting of these cell types to capture all aspects of humoral immunity (Miller et al., 2020). Further explorations of these models are recommended.

32. Finally, the BioMap™ Diversity Plus platform can be mentioned (Singer et al., 2019). The BioMap® Diversity Plus platform consists of several human primary cell-based assays modeling complex tissue and disease biology of organs (vasculature, immune system, skin, lung) and general tissue biology. Among the 12 systems, monocyte activation (readouts: MCP-1, VCAM-1, TM, TF, CD40, E-selectin, CD69, IL-8, IL-1α, M-CSF, sPGE2, SRB, sTNFα), T cell activation (readouts: MCP-1, CD38, CD40, E-selectin, CD69, IL-8, MIG, PBMC Cytotoxicity, Proliferation, SRB), and B and T cell autoimmunity (readouts: B cell Proliferation, PBMC Cytotoxicity, Secreted IgG, sIL-17A, sIL-17F, sIL-2, sIL-6, sTNFα) are likely to be relevant to identify chemical-induced immunotoxicity. However, its predictivity and reproducibility for chemicals inducing immunotoxicity, has not been demonstrated with a diverse set of environmental contaminants. Further explorations are recommended.

. Performance factors of *in vitro* assay(s)

33. To be appropriate for regulatory use, alternative *in vitro* assay(s) examining immunotoxicity should be characterized using the Reference Compound List (Table 3). The list is not exhaustive but is a compilation of environmental contaminants and drugs that have been shown to induce immunotoxicity in non-clinical studies and/or humans. When evaluating assay performance, to be in line with other validation studies, typically at least 20 compounds in total should be considered, but the required number of chemicals will depend on the specific test being performed and the regulatory guidance for the assay type. Compounds other than those in the reference list may be included, but their use should be justified according to the selection factors listed in section VII. The compounds in Table 3 have been selected from multiple classes, covering a wide range of biological and chemical modalities that have multiple immune targets. While it is beneficial to use compounds from multiple classes with different immune-related targets, some consideration of the cell type or response evaluated in the assay is necessary to interpret the sensitivity and specificity of each test. An approximate 2:1 ratio of positive to negative compounds, selected from different chemical classes, should be tested to ensure selectivity with the limited number of reference materials available.

34. A range of concentrations should be tested in each assay, and clearly described, as the same compound may be immuno-stimulatory or immunosuppressive depending on the concentration level. A certain degree of toxicity is expected at the highest concentration tested, which indicates that the chemical is doing something to the cells (similarly to the maximum tolerated dose in animal studies). However, significant toxicity should be avoided as it is difficult to ascertain whether the compound is toxic to a particular cell type, or if it decreases the proliferative capacity of those cells in the assay. When available, information on internal dose from *in vivo* exposure should be used to guide dose selection. Ideally, sensitivity and specificity would be 100%. However, these levels cannot be standardized and are dependent on the assay and chemicals being used. In general, the sensitivity to detect a positive compound in an assay(s), when applied on chemicals from the Reference Compound List (Table 3), should be at least 75%, with evidence of sufficient specificity (i.e., differentiating between true positives and true negatives, OECD GD286, 2018).

35. Inter-laboratory reproducibility and transferability between laboratories is required for the purpose of validation to establish an OECD test guideline if a particular assay is to be used in more than one laboratory. The minimum and maximum number of laboratories needed for a comprehensive assessment of the validity of the test method will depend on the type of test, the questions being addressed, and/or the overall amount of testing required of each laboratory. In many cases, three or four laboratories per test method may be an adequate number for an assessment of the inter-laboratory reproducibility (OECD GD34, 2005). Evaluation should also include assessments of accuracy and reproducibility over time. The performance characteristics of each assay, as well as the performance of the combined battery (if used) should be specified.

36. When interpreting results, the applicability domain and any limitations of the assay(s) should be taken into consideration (i.e., solubility, stability in culture media, metabolism). If the compound requires metabolism to exert its effects, but the system lacks metabolic enzymes, the results need to be considered in this context. Immune cells are generally considered to have low metabolic capacity, therefore, the use of S9 or other alternative metabolic activation systems should be considered by test

developers (Ooka et al, 2020). If not, it must be clearly stated that compounds that require metabolic activation fall outside the applicability domain of the test, and in case of negative results, one must be sure before classifying the compound as non-immunotoxic that the compound does not undergo bioactivation.

. Performance information of *in vitro* assay(s) to be provided to health authorities

37. To enable evaluation of an alternative assay(s) for use in immunotoxicity risk assessment for regulatory purposes, the following information should be provided: a detailed description of the predictive model including the *in vivo* endpoints for which it is trying to predict an outcome, and its use in the context of a tiered approach and integrated testing strategy. The *in vitro* model can consist of a single assay or a battery of assays together (a battery of tests measuring different immune endpoints is more likely to be predictive). If a battery of tests is used, each individual endpoint should be fully described with how the assessment of validity is made, including how the endpoints were selected.

38. The details of the prediction model used for determining positive and negative outcomes from the assay, including the borderline results and their interpretation should be presented for each assay. The model should correlate concentrations tested in the *in vitro* assays to the *in vivo* internal dose required to result in immunotoxicity in the species being predicted. For example, concentrations associated with immunotoxic effects should be interpreted in the context of expected *in vivo* exposure parameters such as C_{max} or AUC. If available, PBPK models can also inform concentration ranges.

39. The compound list used to qualify the assay performance should be presented. For purposes of establishing the predictive capacity (i.e., sensitivity, specificity and accuracy) of proposed test methods to be used by several laboratories, typically at least 20 compounds encompassing multiple chemical classes (examples listed in Table 3) in total should be tested by multiple laboratories, recognizing that the number of chemicals and testing laboratories will depend on the variability of the specific test being performed. In each laboratory, the chemicals should be tested in three independent runs performed with different cell batches on multiple days. Each run should consist of at least three concurrent replicates for each test chemical, negative, and positive control.

40. The calculation of the accuracy, sensitivity, and specificity values of the proposed *in vitro* test method for a single assay or battery of assays, should be equal to or better than the target values derived from the validated *in vivo* reference method(s). If a battery of assays is being proposed, the above information for each individual test method should be included. The combined accuracy, sensitivity, and specificity of the battery of assays should be greater than that of each of the individual assays. Typically, the sensitivity should be $\geq 75\%$ (OECD 286). Any participating laboratory may misclassify an *in vivo* non-immunotoxic chemical as long as the final specificity of the test method is within the acceptable range.

41. The source of all reagents, biologic materials, and test compounds should be included. Test compound purity, stability and CAS number should be documented if available. The source/reference of all *in vivo* exposure data used for comparison should also be provided. Assays should be developed with the understanding that regulatory studies should generally be conducted in compliance with current

Good Laboratory Practice (GLP). Consultation with the relevant health authority(ies) is highly recommended to determine the level of validation needed.

. Selection factors for the reference compounds to be used in development of the *in vitro* assay(s)

42. The Reference Compound List (Table 3) contains environmental contaminants and drugs that have been shown to induce immunotoxicity in nonclinical studies and/or humans. The list includes representative chemicals from a number of classes of compounds that have been demonstrated to be immunotoxic (i.e. perfluoroalkyl substances, polycyclic aromatic hydrocarbons, organotins), known immunosuppressive therapeutics and other substances, but is not a comprehensive listing of all immunotoxicants. These compounds, as well as others, can be used to support qualification of an alternative assay or battery of assays. Many of the suggested reference compounds have been evaluated using tiered testing panels of *in vivo* assays in rodents (Luster et al., 1988; Vos and Van Loveren, 1989) and have been reported to suppress functional immune responses or modulate disease resistance. Modulation of observational measures, such as organ weights and cell subpopulations have also been described. It should be noted that while these compounds generally have immunosuppressive effects, depending on the exposure concentration and experimental design, some of these compounds may exhibit immunostimulatory effects, particularly when they act upon regulatory cells. In addition, positive control compounds may have different potency or target different cell types *in vitro* and an understanding of their mode of action and *in vivo* exposure parameters such as internal dose and metabolism may inform effects on specific cell populations. For a limited number, there is evidence from human epidemiology (i.e. ethanol, lead, and 2929 perfluorooctanoic acid) or clinical studies (cyclosporine A, dexamethasone, and diethylstilbestrol). In addition, there is a growing body of *in vitro* evidence supporting the immunotoxicity of these reference materials, and for many there are data with human cells or cell lines. The selected compounds target a variety of cell types and processes and will thus be useful to identify defined approaches for the *in vitro* assessment of immunotoxicity. The proposed negative compounds have been tested in a full battery of immune function assays in rodents as described in Luster et al (1988) and were negative under the conditions of those studies.

Table 3. Reference Compound List

Positive Controls	CAS Number	Reported Immune Targets
Aflatoxin B1*	1162-65-8	DTH, Cell Proliferation, Innate Immunity
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine*	105650-23-5	Cell Proliferation, Antibody Response, Cytokine Production
Atrazine	1912-24-9	Cell Proliferation, Lymphoid Organ Weights, Clinical Pathology
Azathioprine*	446-86-6	Antibody Response, CTL
Benzidine*	92-87-5	Antibody Response, NK Cell Activity, Cell Proliferation, CTL
Benzo(a)pyrene*	50-32-8	Antibody Response, Cell Proliferation, Host Resistance, NK Cell Activity, Lymphoid Organ Weights
Cadmium Chloride	10108-64-2	Antibody Response, Cell Proliferation, Cytokine Production
Chloroquine*	54-05-7	Innate Immunity
Chrysene*	218-01-9	Antibody Response
Cyclophosphamide*	50-18-0	Antibody Response, Cell Proliferation, DTH, Lymphoid Organ Weights
Cyclosporine A	59865-13-3	Antibody Response
Deoxynivalenol	51481-10-8	Antibody Response, Cytokines
Dexamethasone	50-02-2	Macrophage Function, NK Cell Activity, Clinical Pathology, Lymphoid Organ Weights, Cytokines
2,4 Diaminotoluene*	95-80-7	Antibody Response, DTH
Dibromoacetic acid	631-64-1	Antibody Response, NK Cell Activity, CTL
Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT)	50-29-3	Antibody Response, Cell Proliferation, Cytokine Production, Lymphoid Organ Weights
Dideoxyadenosine	4097-22-7	Antibody Response, Cell Proliferation
Diethanolamine	111-42-2	Antibody Response, CTL, Clinical Pathology
Di(2-Ethylhexyl) Phthalate	117-81-7	Antibody Response, Innate Immunity, Cytokines
Diethylstilbestrol*	56-53-1	Antibody Response, Cell Proliferation, Cytokine Production
Dimethylbenz(a)-anthracene*	57-97-6	Antibody Response, Cell Proliferation, Lymphoid Organ Weights
Diphenylhydantoin*	630-93-3	NK Cell Activity, Lymphoid Organ Weights
Ethanol*	64-17-5	Antibody Response, NK Cell Activity, Cytokine Production
Ethyl carbamate*	51-79-6	Antibody Response, Cell Proliferation
Ginseng	50647-08-0	NK Cell Activity, Lymphoid Organ Weights

Glycidol	556-52-5	Antibody Response, NK Cell Activity, Clinical Pathology
Hexachlorobenzene*	118-74-1	Antibody Response
Hexachlorobiphenyl 153	35065-27-1	Antibody Response, CTL, DTH
γ -Hexachlorocyclohexane (Lindane)*	58-89-9	Cell Proliferation, CTL, NK Cell Activity
1,2,3,6,7,8-Hexachlorodibenzo-p-dioxin	57653-85-7	Antibody Response, Cell Proliferation, DTH, Lymphoid Organ Weights
Indomethacin	95-83-0	Cell Proliferation
Lead acetate	6080-56-4	Antibody Response, DTH
Methadone Hydrochloride	1095-90-5	NK Cell Activity, Lymphoid Organ Weights
2-Methoxyacetic Acid	625-45-6	Antibody Response, Cell Proliferation, Lymphoid Organ Weights
Morphine Sulfate	64-31-3	Antibody Response, NK Cell Activity, Cell Proliferation, Lymphoid Organ Weights
Mycophenolic Acid	24280-93-1	Antibody Response, Cell Proliferation
Nitrobenzene*	98-95-3	Antibody Response, NK Cell Activity, Cell Proliferation
n-Nitrosodimethylamine*	62-75-9	Antibody Response, NK Cell Activity, Cell Proliferation, DTH
m-Nitrotoluene*	99-08-1	Antibody Response, Cell Proliferation, DTH
Ochratoxin A	303-47-9	NK Cell Activity, Lymphoid Organ Weights
Parathion	56-38-2	Host Resistance, Antibody Response
Pefluorooctanoic Acid	335-67-1	Antibody Response, NK Cell Activity, Cytokine Production
Perfluorooctanesulfonic acid	1763-23-1	Antibody Response, NK Cell Activity, Cell Proliferation, Cytokine Production
3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl*	57465-28-8	Antibody Response, NK Cell Activity, Cell Proliferation, Lymphoid Organ Weights
Pentachlorophenol*	87-86-5	Antibody Response, NK Cell Activity, Cell Proliferation
Prednisolone	50-24-8	Macrophage Function, NK Cell Activity, Clinical Pathology, Lymphoid Organ Weights, Cytokines
Propanil*	709-98-8	Antibody Response, NK Cell Activity, CTL, Cell Proliferation, Cytokine Production
Tetrabromobisphenol A	79-94-7	Cytokines, Innate Immunity
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	1746-01-6	Antibody Response, CTL, Thymus Weight,
δ 9- Tetrahydrocannabinol	1972/8/3	Antibody Response, Cell Proliferation, Cytokine Production
Thalidomide	50-35-1	Antibody Response, CTL, Clinical Pathology
Tributyltin	56-24-6	Antibody Response, Lymphoid Organ Weights, Cytokine Production
Tributyltin Chloride	1461-22-9	Antibody Response, NK Cell Activity, CTL, Cell Proliferation, Lymphoid Organ Weights
Tributyltin Oxide	56-35-9	Antibody Response, NK Cell Activity, CTL, Cell Proliferation, DTH, Lymphoid Organ Weights

Negative Controls		
Chloramine	10599-90-3	
4-Chloro-o-phenylenediamine	95-83-0	
Dichloroacetic acid	79-43-6	
Methyl carbamate	598-55-0	
Nitrofurazone	59-87-0	
Oxymethalone	434-07-1	
Patulin	149-29-1	
Sodium Bromate	7789-38-0	
Sodium Chlorite	7758-19-2	

*Denotes compounds which require metabolic activation for immunotoxicity to manifest. Because there is a large body of literature for each of these individual compounds the reader is referred to compilations of information or data on immunotoxicity that review these effects including: Cohen et al 2000; Corsini and van Loveren, 2015; Descotes 2004; Dewhurst et al 2015; House et al 2007; Kaplan et al 2019; Kimura et al 2020; Luster et al 1988; 1992; Tryphonas et al 2005; Vohr 2005, WHO 1996

. *In vitro* immunotoxicological assessments using combinations of cell types or cell lines

8.1. Lessons from immunotoxicological assessments using rodents

43. The use of tiered testing panels of *in vivo* assays in rodents has been the most common methodology for assessment of immunotoxicity since the inception of the discipline (Luster et al., 1988; Van Loveren and Vos, 1989). The *in vivo* tiered approach proposed by the National Toxicology Program at the NIH contains both screening assays to detect immunologic effects (Tier I) and a comprehensive suite of assays to provide an in-depth assessment of immune function and host resistance endpoints (Tier II), as listed in Table 4 (modified from (Luster 1998)). Chemicals are judged as immunotoxicants based on whether they produced a significant dose-response effect ($p < 0.05$) in a measure of a functional immune response (rather than an observational measure such as a change in body or organ weights), or if they significantly altered two or more test results at the highest dose of chemical tested ($p < 0.05$). Based on the ability of various immune tests to predict increased susceptibility in disease resistance assays, Luster et al. (1992), demonstrated that: 1) a number of the immune tests provided a relatively high association with changes in host resistance (i.e., > 70%), such as the TDAR, delayed hypersensitivity response (DHR), cell surface immunophenotyping markers, and CTL assay. In contrast, several of the tests, such as leukocyte counts and lymphoproliferative response to LPS were poor predictors, with concordance values of approximately 50%; and 2) the combination of two immune tests significantly increased the predictive value from that obtained using individual tests. Pair-wise combinations which included either the plaque forming cell (PFC) response (a TDAR endpoint), cell surface immunophenotyping markers, or DHR gave consistently higher concordances and combinations of two or three immune tests involving these measures could give more than 90% concordance with effects on disease resistance.

44. Several regulatory guidelines or guidance documents have since been developed for the assessment of immunotoxicity of pharmaceuticals or industrial products (e.g. ICH S8). The majority of these suggest that standard toxicity studies, combined with trigger-based functional immune testing, represent an effective approach to evaluate immunotoxic potential (Boverhof et al., 2014). Among the various functional immune tests, the TDAR has been the consensus choice for a functional endpoint to identify immunotoxicity hazard in most, if not all, regulatory guidelines (Fischer et al., 2011; Koeper and Vohr, 2009). These approaches affirm the need to evaluate multiple aspects of the immune response to accurately predict immunotoxicity.

Table 4. *In vivo* tiered approach for detecting immune alterations in rodents

	Procedures
Tier I	<ul style="list-style-type: none"> Hematology Organ Weights – Spleen, thymus Cellularity – Spleen and bone marrow Histology of lymphoid organs IgM antibody plaque-forming cells (PFCs) Lymphocyte blastogenesis Natural killer cell activity Surface markers (peripheral or tissue immunophenotyping)
Tier II	<ul style="list-style-type: none"> IgG antibody PFC response Cytotoxic T lymphocyte cytotoxicity Delayed hypersensitivity response (DHR) Macrophage/neutrophil functional assays Host resistance (syngeneic tumors, bacterial, viral, and parasite models)

2. *In vitro* immunotoxicological assessments using primary cells

45. To maximize relevance to human immunotoxicology and to avoid inter-species extrapolation, it is recommended to use human cells for all *in vitro* tests. Although the use of primary human cells, which are available from peripheral blood or from buffy coats, are of highest clinical relevance, consideration can be given to the use of sufficiently well-characterized and largely used cell lines for certain aspects of the test systems (Gennari et al., 2005). Although continuous cell lines are not physiologically equivalent, many have proven to be valid surrogates but require appropriate characterization to ensure they are accurately recapitulating the normal immunological responses and functions (Boverhof et al., 2014). However, as cell lines are subject to genetic drift over excessive passages, it is important to control the stability of the cell line used. Another aspect that should not be disregarded, is that some compounds' immunotoxicity, especially drug-induced hypersensitivity, has been associated with specific HLA-types (Fan et al. 2017). Thus, the haplotype of the cell lines used should also be considered. If human cells are not available or human cell lines cannot be used, the use of non-human cells may be considered if the method proves to have acceptable predictive capacity or if the same response is expected both qualitatively and/or quantitatively, similar to what is expected using animals in toxicology (Corsini and Roggen, 2017; Lankveld et al., 2010).

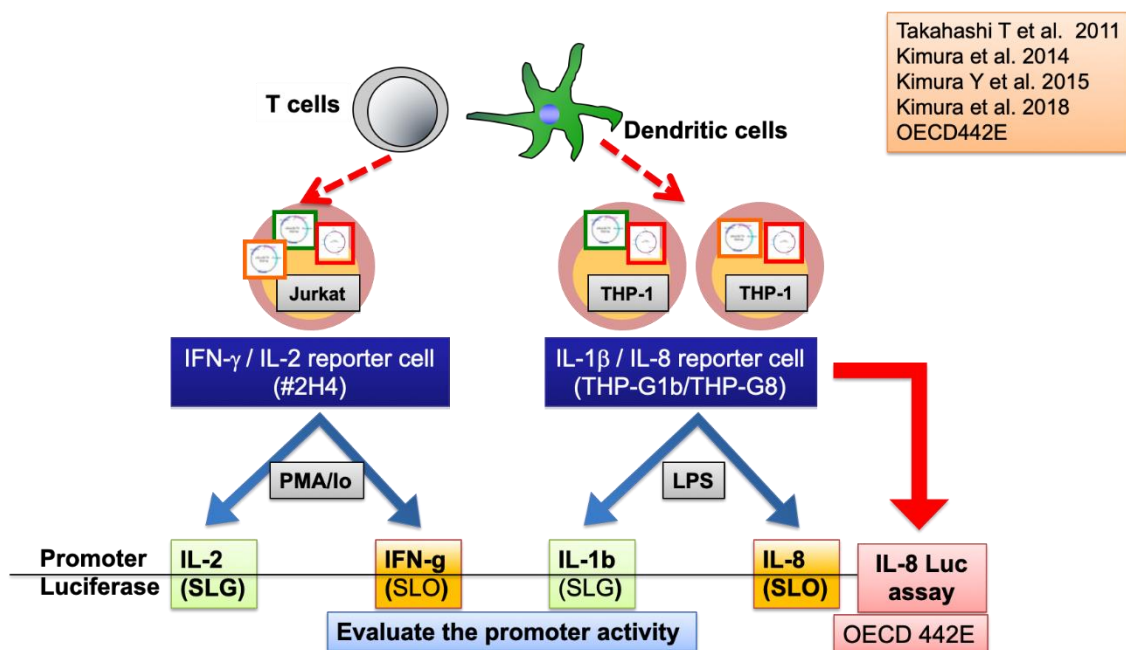
3. *In vitro* immunotoxicological assessments using cell lines

46. Most of the *in vitro* immune tests described in section IV use animals or human samples to obtain immune cells. The use of primary human cells for *in vitro* tests can entail challenges and

inconsistencies due to constraints around securing human samples, large variability among donors, poor reproducibility, inability to control donors' disease state and environmental factors, or the need to differentiate progenitor cells. Although continuous cell lines are not the physiological equivalent of primary cells or animals, many have proven to be valid surrogates if appropriately characterized to ensure they are accurately recapitulating the normal immunological responses and functions (Boverhof et al., 2014).

47. Almost a decade ago, a luciferase reporter assay system, MITA, was established to evaluate the effects of chemicals on the human immune system using stable reporter cell lines instead of primary human cells (Figure 1). The MITA is composed of 3 stable reporter cell lines: 1) 2H4 derived from Jurkat cells containing luciferase genes regulated by the IL-2, IFN γ , and G3PDH promoters (Saito et al. 2011), 2) THP-G8 cells derived from THP-1 cells containing luciferase genes regulated by the IL-8 and G3PDH promoters (Takahashi et al., 2011), and 3) THP-G1b cells derived from THP-1 cells containing luciferase genes regulated by the IL-1 β and G3PDH promoters (Kimura et al. 2018). Using these cell lines, it has been demonstrated that MITA can reflect the effects of immunosuppressive drugs on cytokine expression by T cells or macrophages, and that the evaluation of drugs using the MITA was consistent with those obtained using the mother cell lines (Jurkat and THP-1 cells) or by using stimulated human whole blood cells ((Kimura et al. 2014) and Table 5).

Figure 1. Multi-ImmunoTox Assay (MITA)



MITA is an approach to detect immunotoxic chemicals using a combination of 3 luciferase reporter cell lines. 2H4 cells are used to evaluate the effects of chemicals on IL-2 and IFN γ promoter activity under stimulation with PMA/ionomycin. THP-G1b cells evaluate IL-1 β promoter activity under stimulation with LPS, while THP-G8 cells evaluate IL-8 promoter activity under stimulation with LPS. The IL-8 Luc assay (OECD 442E) is an *in vitro* skin sensitization test that determines the induction of IL-8 promoter activity by chemical-treated THP-G8 cells. A modified version of the MITA (mMITA) is composed of the MITA and the IL-8 Luc assay (OECD 442E). In support of the initiative to increase the number of available *in vitro* immunotoxicity assays, two of the four reporter assays comprising MITA (IL-2 Luc and IL-1 Luc) are currently undergoing validation studies (Kimura et al. 2020).

48. When the performance of the IL-2 reporter assay was evaluated by examining immunosuppressive drugs whose effects in humans have been well-established (Table 5, reviewed by Allison 2000), the results demonstrated that the majority of the known agents caused reductions in IL-2 transcription including tacrolimus, cyclosporine A, dexamethasone, chloroquine, minocycline, sulfasalazine, ruxolitinib, tofacitinib, and baricitinib. However, decreased IL-2 transcription was not observed with several immunosuppressants whose mechanism of action is dependent on the inhibition of DNA synthesis or anti-proliferative effects on T cells, such as rapamycin, cyclophosphamide, azathioprine, mycophenolic acid, mizoribine, and methotrexate. Thus, it is critical to define the applicability domain for any proposed *in vitro* testing strategy to understand if the assay can appropriately assess the effects of certain compounds (e.g., those that require metabolism or target particular pathways).

Table 5. Evaluation of immunomodulatory drugs by MITA (modified from the original report by Kimura et al 2014 and Kimura et al 2018)

Principal Mechanism of Action	Drug	Effects of Transcriptional Activity			
		IL-2	IFN γ	IL-1 β	IL-8
IMMUNOSUPPRESSIVE DRUGS					
Regulation of gene expression	Dexamethasone	↓	—	↓	↓
Kinase and phosphatase inhibitors	Cyclosporin A	↓	↓	—	—
	Tacrolimus	↓	↓	—	—
	Rapamycin	↑	—	—	—
JAK inhibitors	Ruxolitinib	↓	N	N	N
	Tofacitinib	↓	N	N	N
	Baricitinib	↓	N	N	N
Nrf-2 inhibitor	Dimethyl fumarate	↓	N	N	N
PDE4 inhibitor	Apremilast	↑	N	N	N
Alkylation	Cyclophosphamide	—	—	—	—
Inhibition of de novo purine synthesis	Azathioprine	—	—	—	—
	Mycophenolic acid	↑	↑	—	—
	Mizoribine	—	—	↑	↑
Inhibition of pyrimidine and purine synthesis	Methotrexate	↑	↑	—	—
OFF-LABEL IMMUNOSUPPRESSIVE DRUGS					
	Sulfasalazine	↓	↓	↓	↓
	Colchicine	↑	—	↑	↑
	Chloroquine	↓	—	—	↓
	Minocycline	↓	↓	—	—
	Nicotinamide	↑	—	↓	↓
NON-IMMUNOMODULATORY DRUGS					
	Acetaminophen	↑	—	—	↑
	Digoxin	↓	↓	—	—
	Warfarin	↑	—	↓	↓

JAK=Janus kinase, Nrf-2=nuclear factor erythroid 2-related factor 2,
PDE4=phosphodiesterase 4
↑=stimulation, ↓=suppression, —=no effect, N=not tested

4. Combination of *in vitro* assays and clustering analysis has the potential to increase predictivity

49. As stated throughout this document it is likely that several assays will need to be used in combination to increase the ability to predict immunotoxicity using *in vitro* tests. For example, while the predictivity of the IL-2 Luc assay is high when testing T cell-targeting chemicals, combination with other immune function tests, in particular myelotoxicity tests or leukotoxicity tests, will be essential to cover global immunotoxicity. Methods for evaluating myelotoxicity *in vitro* using bone marrow culture systems (Haglund et al., 2010; Pessina et al., 2003) could be combined with the MITA to provide a more complete assessment. In addition, a novel luciferase assay designated as the IL-2 Luc LTT has recently been developed, that can detect the antimitotic effects of chemicals and can correctly identify immunosuppressive chemicals that were negative in the IL-2 assay (Kimura et al., 2021). Thus, the combination of the IL-2 Luc assay and the IL-2 Luc LTT can overcome some of the limitations of the IL-2 Luc assay alone (Kimura et al., 2021) and may be even more predictive when combined with a myelotoxicity assay.

50. Another example of this combinatorial approach is the addition of the MITA (IL-2 reporter assay in response to PMA/ionomycin [IL-2LA] plus the IL-8 reporter assay in response to LPS [IL-8+LPS]) with the IL-8 reporter assay for skin sensitization test (IL-8-LPS, OECD 442E), denoted as the modified MITA (mMITA). Sixty chemicals with well-known immunotoxic profiles were examined by the mMITA and were classified based on multiple approaches into a final group of six clusters with distinct characteristics. **Cluster 1:** chemicals that preferentially suppressed IL-8+LPS and showed a negative IL-8-LPS (preferential IL-8+LPS suppression); **Cluster 2:** those that suppressed IL-2LA and showed a positive IL-8-LPS, but did not affect IL-8+LPS (IL-2LA suppression and IL-8-LPS(+)); **Cluster 3:** those that suppressed both IL-2LA and IL-8+LPS and showed a positive IL-8-LPS (IL-2LA and IL-8+LPS suppression and IL-8-LPS(+)); **Cluster 4:** those that did not suppress either IL-2LA or IL-8+LPS and showed a negative IL-8-LPS (all negative); **Cluster 5:** those that suppressed both IL-2LA and IL-8+LPS but showed a negative IL-8-LPS (IL-2LA and IL-8+LPS suppression); and **Cluster 6:** those that preferentially suppressed IL-2LA and showed a negative IL-8-LPS (preferential IL-2LA suppression). The power of this approach is highlighted by the fact that although there were less well characterized chemicals tested, their potential *in vivo* effects could be inferred by comparing to well understood medicinal drugs that landed in the same cluster, such as sulfasalazine for Cluster 1, chloroquine for Cluster 2, colchicine for Cluster 3, acetaminophen for Cluster 4, dexamethasone for Cluster 5, and cyclosporine A and FK506 for Cluster 6 (Kimura et al., 2014; Kimura et al., 2018).

51. Overall, it is crucial to examine the correlation between *in vitro* assays and their *in vivo* effects. As demonstrated using the example of the mMITA, the clustering of chemicals using only three parameters may be inadequate to detect every aspect of their immunotoxic effects. However, such clustering in the context of a battery of complementary assays can be a first step to profile the immunotoxicity of chemicals.

. Discussion and Conclusion

52. Besides the presence of specific immune organs, immune cells are an integral part of other systems including the respiratory, dermal, gastrointestinal, neurological, cardiovascular, reproductive, hepatic, and endocrine systems. Consequently, exposure to immunotoxic compounds can have detrimental effects on the response to both communicable and non-communicable diseases. It is therefore important to understand the immunotoxic potential of xenobiotics and the risk they pose to humans.

53. Current practices in overt immunotoxicity testing are still varied and employ either experimental animals or humans themselves, while *in vitro* testing has predominantly been used to study specific mechanisms of immunotoxicity. There are several regulatory guiding principles in immunotoxicology, including IPCS/WHO Guidance for Immunotoxicity Risk Assessment for Chemicals (Harmonization project No. 10). All of these guidelines involve animal testing, and the current practice of risk assessment of chemical exposure is based to a large extent on animal testing.

54. While a number of non-animal-based testing methods for immunotoxicity have been published, not many have reached the stage of validation and acceptance. In accordance with the promotion of alternative testing methods and the global desire to reduce the use of laboratory animals, the purpose of this document is to provide the state-of-the-art knowledge for non-animal testing in immunotoxicology, and a way forward. Currently, a tiered approach is the most appropriate means to assess immunotoxicity, as described above. In the proposed tiered approach pre-screening for direct immunotoxicity *in vitro* begins by evaluating myelotoxicity (Tier 1). Compounds capable of damaging or destroying bone marrow cells will most likely have immunotoxic effects, as all immune cells derive from a common precursor located in the adult bone marrow. If compounds are not myelotoxic, they should be tested for direct leukotoxicity (Tier 2). Compounds should then be tested for immunotoxicity using various approaches, such as TDAR, lymphocyte proliferation assay, MLR, and NK cell assay (Tier 3).

55. It is likely that multiple assays will be required to define immunotoxicants because of the complexity and varied components of the immune system (e.g., innate or adaptive immune responses). The combined use of several *in vitro* assays in IATAs or defined approaches, such as those used for skin sensitization, should increase the ability to predict immunotoxicity over an individual assay. It is critical to define whether the parent compound or a metabolite is mediating the immunotoxic effects, as immune cells have limited capacity to metabolize drugs. Even upon determining that a compound is immunotoxic, it is important to remember that there are interactions between the immune, nervous, and endocrine systems such that immunity is regulated by various neurotransmitters and hormones, which could also result in sex differences in the sensitivity to immunotoxicity.

56. At present there is no consensus on which assays to use, or how, and there are no OECD test guidelines to detect chemical immunotoxicity *in vitro*. Any validated test should therefore be part of a larger set of different assays that preferably covers all types of immunotoxicity including immunosuppression, sensitization, and autoimmunity. The MITA described in Section VIII, is one example of a combination of *in vitro* assays which may be used to predict the immunotoxicity of chemicals (and could be considered a potential future Tier 3 approach), with the potential for including additional endpoints which address gaps in the assessment of innate and humoral immunity. Comparing unknown chemicals to known immunotoxicants through clustered analyses such as those used in the

mMITA, information can be obtained on potential cellular targets and mode of action. Considering the incredible progress in 3D models, with engineered immune tissues and organs, such as bone marrow, thymus, lymph nodes and spleen being described, and microfluidic body-on-a-chip, it is reasonable to think that in the future it will be possible to assess immunotoxicity in an integrated model of the whole human immune system. While additional studies are certainly needed to define the possibility of identifying immunotoxic substances without the use of animals, the road is being paved for the use of integrated testing strategies that together hold the promise of being able to adequately predict the immunotoxic action of chemicals *in vitro*.

Acknowledgments: We thank the International Cooperation on Alternative Test Methods (ICATM) members, especially EURL ECVAM and NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) for their support and recommendations. This work was partly supported by the Health and Labor Science Research Grant, Japan.

. References

- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., van Benthem, J., Zuang, V., Andersen, K.E., Angers-Loustau, A., Aptula, A., Bal-Price, A., Benfenati, E., Bernauer, U., Bessems, J., Bois, F.Y., Boobis, A., Brandon, E., Bremer, S., Broschard, T., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Cronin, M., Daston, G., Dekant, W., Felter, S., Grignard, E., Gundert-Remy, U., Heinonen, T., Kimber, I., Kleinjans, J., Komulainen, H., Kreiling, R., Kreysa, J., Leite, S.B., Loizou, G., Maxwell, G., Mazzatorta, P., Munn, S., Pfuhrer, S., Phrakonkham, P., Piersma, A., Poth, A., Prieto, P., Repetto, G., Rogiers, V., Schoeters, G., Schwarz, M., Serafimova, R., Tähti, H., Testai, E., van Delft, J., van Loveren, H., Vinken, M., Worth, A., Zaldivar, J.M., 2011. Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch. Toxicol.* 85(5), 367-485.
- Allison, A.C., 2000. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 47(2-3), 63-83.
- Belkaid Y, Hand T. Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell.* 2014 Mar 27; 157(1): 121–141. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011
- Bell SM, Phillips J, Sedykh A, Tandon A, Sprankle C, Morefield SQ, Shapiro A, Allen D, Shah R, Maull EA, Casey WM, Kleinstreuer NC. An Integrated Chemical Environment to Support 21st-Century Toxicology. *Environ Health Perspect.* 2017 May 25;125(5):054501.
- Boverhof, D.R., Ladics, G., Luebke, B., Botham, J., Corsini, E., Evans, E., Germolec, D., Holsapple, M., Loveless, SE., Lu, H., van der Laan, JW., White, K.L. Jr., Yang, Y., 2014. Approaches and considerations for the assessment of immunotoxicity for environmental chemicals: a workshop summary. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 68(1), 96-107
- Carfi, M., Gennari, A., Malerba, I., Corsini, E., Pallardy, M., Pieters, R., Van Loveren, H., Vohr, H.W., Hartung, T., Gribaldo, L., 2007. In vitro tests to evaluate immunotoxicity: a preliminary study. *Toxicology* 229(1-2), 11-22.
- Casati, S., Aschberger, K., Barroso, J., Casey, W., Delgado, I., Kim, T.S., Kleinstreuer, N., Kojima, H., Lee, J.K., Lowit, A., Park, H.K., Régimbald-Krnel, M.J., Strickland, J., Whelan, M., Yang, Y., Zuang, V., 2018. Standardisation of defined approaches for skin sensitisation testing to support regulatory use and international adoption: position of the International Cooperation on Alternative Test Methods. *Arch. Toxicol.* 92(2), 611-617.
- Chary, A., Serchi, T., Moschini, E., Hennen, J., Cambier, S., Ezendam, J., Blomeke, B., Gutleb, A.C., 2019. An in vitro coculture system for the detection of sensitization following aerosol exposure. *ALTEX* 36(3), 403-418.
- Cohen, MD., Zelikoff, JT., Schlesinger, RB. eds., 2000 *Pulmonary Immunotoxicology*, Springer, Boston, pp 465.
- Collinge, M., Cole, S.H., Schneider, P.A., Donovan, C.B., Kamperschroer, C., Kawabata, T.T., 2010. Human lymphocyte activation assay: an in vitro method for predictive immunotoxicity testing. *J. Immunotoxicol.* 7(4), 357-66.
- Collinge, M., Schneider, P., Li, D., Parish, S., Dumont, C., Freebern, W., Ghanime, J., Guimont-Derochers, F., Langenkamp, A., Lebron, J., Li, N., Marban, C., Plitnick, L., Wheeler, J. 2020 Cross-company evaluation of the human lymphocyte activation assay. *J Immunotoxicol* 17(1):51-58.
- Corsini, E., Roggen, E.L., 2009. *Immunotoxicology: opportunities for non-animal test*

- development. *Altern. Lab. Anim.* 37(4), 387-97.
- Corsini, E. and van Loveren, H. eds., 2015 *Molecular Immunotoxicology*, Wiley-VCH, Weinheim, pp 334.
- Corsini, E., Roggen, E., 2017. Overview of in vitro assessment of immunotoxicity. *Curr. Opin. Toxicol.* 5, 13-18.
- Corsini, E., Engin, A.B., Neagu, M., Galbiati, V., Nikitovic, D., Tzanakakis, G., Tsatsakis, A.M., 2018. Chemical-induced contact allergy: from mechanistic understanding to risk prevention. *Arch. Toxicol.* 92(10), 3031-3050.
- de Ávila, R.I., Lindstedt, M., Valadares, M.C., 2019. The 21st Century movement within the area of skin sensitization assessment: From the animal context towards current human-relevant in vitro solutions. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 108. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104445.
- Dean JH, Luster MI, Boorman GA. Methods and approaches for assessing immunotoxicity: an overview. *Environ Health Perspect.* 1982 Feb;43:27-9.
- Descotes, J. ed. 2004 *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals: An Experimental and Clinical Approach*, Elsevier, pp 398.
- Dewhurst, I., Koshy, L., Samuels, S., Shillaker, D., 2015. Retrospective analysis of the immunotoxic effects of plant protection products as reported in the Draft Assessment Reports for their peer review at EU level. EFSA supporting publication 2015:EN-782, 104 pp.
- Fan, Wen-Lang, Shiao, Meng-Shin, Hui, Rosaline Chung-Yee, Su, Shih-Chi, Wang, Chuang-Wei, Chang, Ya-Ching, Chung, Wen-Hung, 2017. HLA Association with Drug-Induced Adverse Reactions
J Immunol Res. 3186328. doi: 10.1155/2017/3186328
- Fischer, A., Koeper, L.M., Vohr, H.W., 2011. Specific antibody responses of primary cells from different cell sources are able to predict immunotoxicity in vitro. *Toxicol. in Vitro* 25, 1966-1973.
- French, A., Yang, C.T., Taylor, S., Watt, S.M., Carpenter, L., 2015. Human induced pluripotent stem cell-derived B lymphocytes express sIgM and can be generated via a hemogenic endothelium intermediate. *Stem Cells Dev.* 24(9), 1082-1095.
- Galbiati, V., Mitjans, M. & Corsini, E., 2010. Present and future of in vitro immunotoxicology in drug development. *J. Immunotoxicol.* 7(4), 255-267.
- Gennari, A., Ban, M., Braun, A., Casati, S., Corsini, E., Dastyh, J., Descotes, J., Hartung, T., Hooghe-Peters, R., House, R., Pallardy, M., Pieters, R., Reid, L., Tryphonas, H., Tschirhart, E., Tuschl, H., Vandebriel, R., Gribaldo, L., 2005. The Use of In Vitro Systems for Evaluating Immunotoxicity: The Report and Recommendations of an ECVAM Workshop. *J. Immunotoxicol.* 2(2), 61-83.
- Germolec, D., Luebke, R., Rooney, A., Shipkowski, K., Vandebriel, R., van Loveren, H., 2017. Immunotoxicology: A brief history, current status and strategies for future immunotoxicity assessment. *Curr. Opin. Toxicol.* 5, 55-59.
- Gosselin, E.A., Eppler, H.B., Bromberg, J.S., Jewell, C.M., 2018. Designing natural and synthetic immune tissues. *Nat. Mater.* 17(6), 484-498.
- Haglund, C., Aleskog, A., Håkansson, L.D., Höglund, M., Jacobsson, S., Larsson, R., Lindhagen, E., 2010. The FMCA-GM assays, high throughput non-clonogenic alternatives to CFU-GM in preclinical hematotoxicity testing. *Toxicol. Lett.* 194(3), 102-107.
- Hartung, T., Corsini, E., 2013. Immunotoxicology: challenges in the 21st century and in vitro opportunities. *ALTEX* 30(4), 411-426.
- Hartung, T., Wendel, A., 1995. Detection of Pyrogens using human whole blood. *ALTEX* 12(2):70-75.
- Hassan, S.B., Haglund, C., Aleskog, A., Larsson, R., Lindhagen, E., 2007. Primary lymphocytes as predictors for species differences in cytotoxic drug sensitivity. *Toxicol.*

- in Vitro 21(6):1174-1181.
- Hinton, D.M., 2000. US FDA "Redbook II" immunotoxicity testing guidelines and research in immunotoxicity evaluations of food chemicals and new food proteins. *Toxicol. Pathol.* 28(3), 467-478.
- Hochstenbach, K., van Leeuwen, D.M., Gmuender, H., Stølevik, S.B., Nygaard, U.C., Løvik, M., Granum, B., Namork, E., van Delft, J.H., van Loveren, H., 2010. Transcriptomic profile indicative of immunotoxic exposure: in vitro studies in peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Sci.* 118(1), 19-30.
- House, R.V., Luebke, R. and Kimber, I., eds., 2007 *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, CRC Press Boca Raton, pp 672.
- International Conference on Harmonisation (ICH) Tripartite Guideline S8, Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals, 2005.
- Kaplan, B., Sulentic, C., Haggerty, .H, Holsaplle, M., Kaminski, N., Toxic Responses of the Immune System, Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 9th Edition, Klaassen D, ed. McGraw Hill, New York, 2019. pp 633-718.
- Karmaus, A.L., Zacharewski, T.R., 2015. Atrazine-Mediated Disruption of Steroidogenesis in BLTK1 Murine Leydig Cells. *Toxicol. Sci.* 148(2), 544-554.
- Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Aiba, S., 2014. Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol. in Vitro* 28(5), 759-768.
- Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H., Aiba, S., 2018. Profiling the immunotoxicity of chemicals based on in vitro evaluation by a combination of the Multi-ImmunoTox assay and the IL-8 Luc assay. *Arch. Toxicol.* 92(6), 2043-2054.
- Kimura, Y., Yasuno, R., Watanabe, M., Kobayashi, M., Iwaki, T., Fujimura, C., Ohmiya, Y., Yamakage, K., Nakajima, Y., Kobayashi, M., Mashimo, N., Takagi, Y., Omori, T., Corsini, E., Germolec, D., Inoue, T., Rogen, EL., Kojima, H., Aiba, S., 2020. An international validation study of the IL-2 Luc assay for evaluating the potential immunotoxic effects of chemicals on T cells and a proposal for reference data for immunotoxic chemicals. *Toxicol. in Vitro* 66. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104832.
- Kitayama, S., Zhang, R., Liu, T.Y., Ueda, N., Iriguchi, S., Yasui, Y., Kawai, Y., Tatsumi, M., Hirai, N., Mizoro, Y., Iwama, T., Watanabe, A., Nakanishi, M., Kuzushima, K., Uemura, Y., Kaneko, S., 2016. Cellular adjuvant properties, direct cytotoxicity of re-differentiated valpha24 invariant NKT-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 6(2), 213-227.
- Koeper, L. M., Vohr, H. W., 2009. Functional assays are mandatory for correct prediction of immunotoxic properties of compounds in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 47(1), 110-118.
- Langezaal, I., Coecke, S., Hartung, T., 2001. Whole blood cytokine response as a measure of immunotoxicity. *Toxicol. in Vitro* 15(4-5), 313-318.
- Langezaal, I., Hoffmann, S., Hartung, T., Coecke, S., 2002. Evaluation and prevalidation of an immunotoxicity test based on human whole-blood cytokine release. *Altern. Lab. Anim.* 30(6), 581-595.
- Lankveld, D.P., Van Loveren, H., Baken, K.A., Vandebriel, R.J., 2010. In vitro testing for direct immunotoxicity: state of the art. *Methods Mol. Biol.* 598, 401-423.
- Lebrec, H., Roger, R., Blot, C., Burluson, G. R., Bohuon, C., Pallardy, M., 1995. Immunotoxicological investigation using pharmaceutical drugs. In vitro evaluation of immune effects using rodent or human immune cells. *Toxicology* 96(2), 147-156.
- Lebrec, H., Molinier, B., Boverhof, D., Collinge, M., Freebern, W., Henson, K., Mytych, DT., Ochs, HD., Wange, R., Yang, Y., Zhou, L., Arrington, J., Christin-Piché, MS., Shenton, J., 2014. The T-cell-dependent antibody response assay in nonclinical studies of pharmaceuticals and chemicals: study design, data analysis, interpretation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69(1), 7-21.
- Lehmann, D.M., Williams, W.C., 2018. Development and utilization of a unique in vitro antigen

- presentation co-culture model for detection of immunomodulating substances. *Toxicol. in Vitro* 53, 20-28.
- Luebke, R., 2012. Immunotoxicant screening and prioritization in the twenty-first century. *Toxicol Pathol.* 40(2), 294-299.
- Luster, M.I., Munson, A.E., Thomas, P.T., Holsapple, M.P., Fenters, J.D., White, K.L. Jr., Lauer, L.D., Germolec, D.R., Rosenthal, G.J., Dean, J.H., 1988. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 10(1), 2-19.
- Luster, M.I., Portier, C., Pait, D.G., White, K.L. Jr., Gennings, C., Munson, A.E., Rosenthal, G.J., 1992. Risk assessment in immunotoxicology. I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18(2), 200-210.
- Luster, M.I., Portier, C., Pait, D.G., Rosenthal, G.J., Germolec, D.R., Corsini, E., Blaylock, B.L., Pollock, P., Kouchi, Y., Craig, W., White, K.L., Munson, A.E., Comment, C.E., 1993. Risk assessment in immunotoxicology. II. Relationships between immune and host resistance tests. *Fundam. Appl. Toxicol.* 21(1), 71-82.
- Luster, M.I., Gerberick, G.F., 2010. Immunotoxicology testing: past and future. *Methods Mol. Biol.* 598, 3-13.
- Lu, H., Crawford, R.B., North, C.M., Kaplan, B.L., Kaminski, N.E., 2009. Establishment of an immunoglobulin m antibody-forming cell response model for characterizing immunotoxicity in primary human B cells. *Toxicol. Sci.* 112(2), 363-373.
- McGowan EC, Saini S., 2013. Update on the performance and application of basophil activation tests. *Curr Allergy Asthma Rep.* 13:101
- Miller et al. 2020: Engineering Microphysiological Immune System Responses on Chips. *Trends in Biotechnology* Volume 38, Issue 8, 2020, pp 857-872.
- Mizoguchi, I., Ohashi, M., Chiba, Y., Hasegawa, H., Xu, M., Owaki, T., Yoshimoto, T., 2017. Prediction of chemical respiratory and contact sensitizers by OX40L expression in dendritic cells using a novel 3D coculture system. *Front. Immunol.* 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00929.
- Naidenko OV, Andrews DQ, Temkin AM, Stoiber T, Uche UI, Evans S, Perrone-Gray S. Investigating Molecular Mechanisms of Immunotoxicity and the Utility of ToxCast for Immunotoxicity Screening of Chemicals Added to Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2021; 18(7):3332. <https://doi.org/10.3390/ijerph18073332>
- OECD Guidance document No. 286, 2018, Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP) Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-good-in-vitro-method-practices-givimp_9789264304796-en
- OECD Test No. 406, 1992. Skin sensitisation, Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en
- OECD, Test No.407, 2008. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents, Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en
- OECD, Test No.408, 2018. Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents, Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en
- OECD, Test No. 443, 2018. Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-443-extended-one-generation-reproductive-toxicity-study_9789264185371-en
- OECD, Test No. 442E, 2018. In Vitro Skin Sensitisation, In Vitro Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation, Available at: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442e-in-vitro-skin-sensitisation_9789264264359-en

- OECD, Adverse Outcome Pathways, Molecular Screening and Toxicogenomics, 2020a. Available at: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/adverse-outcome-pathways-molecular-screening-and-toxicogenomics.htm>
- OECD, AOP wiki, 2020b. Available at: <https://aopwiki.org/>
- Ooka, M., Lynch, C., Xia, M., 2020 Application of *In Vitro* Metabolism Activation in High-Throughput Screening. *Int. J. Mol. Sci.* 21(21):E8182.
- Peiser, M., Tralau, T., Heidler, J., Api, AM., Arts, JHE., Basketter, DA., English, J., Diepgen TL., Fuhlbrigge, RC, Gaspari, AA., Johansen, JD., Karlberg, AT., Kimber, I., Lepoittevin, JP., Liebsch, M., Maibach, HI., Martin, SF., Merk, HF., Platzek, T., Rustemeyer, T., Schnuch, A., Vandebriel, RJ., White, IR., Luch, A. 2012 Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 69:763-781.
- Pessina, A., Albella, B., Bueren, J., Brantom, P., Casati, S., Gribaldo, L., Croera, C., Gagliardi, G., Foti, P., Parchment, R., Parent-Massin, D., Sibiril, Y., Van Den Heuvel, R., 2001. Prevalidation of a Model for Predicting Acute Neutropenia by Colony Forming Unit Granulocyte/Macrophage (CFU-GM) Assay, *Toxicol. in Vitro* 15(6), 729-740.
- Pessina, A., Albella, B., Bayo, M., Bueren, J., Brantom, P., Casati, S., Croera, C., Parchment, R., Parent-Massin, D., Schoeters, G., Sibiri, Y., Van Den Heuvel, R., Gribaldo, L., 2002. In Vitro Tests for Haematotoxicity: Prediction of Drug-Induced Myelosuppression by the CFU-GM Assay, *Altern. Lab. Anim.* 30 Suppl 2, 75-79.
- Pessina, A., Albella, B., Bayo, M., Bueren, J., Brantom, P., Casati, S., Croera, C., Gagliardi, G., Foti, P., Parchment, R., Parent-Massin, D., Schoeters, G., Sibiril, Y., Van Den Heuvel, R., Gribaldo, L., 2003. Application of the CFU-GM assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics. *Toxicol. Sci.* 75(2), 355-367.
- Pessina, A., Malerba, I., Gribaldo, L., 2005. Hematotoxicity testing by cell clonogenic assay in drug development and preclinical trials. *Curr. Pharm. Des.* 11(8), 1055-1065.
- Pessina, A., Bonomi, A., Cavicchini, L., Albella, B., Cerrato, L., Parent-Massin, D., Sibiril, Y., Parchment, R., Behrsing, H., Verderio, P., Pizzamiglio, S., Giangreco, M., Baglio, C., Coccè, V., Sisto, F., Gribaldo, L., 2010. Prevalidation of the Rat CFU-GM Assay for in Vitro Toxicology Applications, *Altern. Lab. Anim.* 38(2), 105-117.
- Rich, I.N., Hall, K.M., 2005. Validation and development of a predictive paradigm for hemotoxicology using a multifunctional bioluminescence colony-forming proliferation assay. *Toxicol. Sci.* 87(2), 427-441.
- Ringerike, T., Ullerås, E., Völker, R., Verlaan, B., Eikeset, A., Trzaska, D., Adamczewska, V., Olszewski, M., Walczak-Drzewiecka, A., Arkusz, J., van Loveren, H., Nilsson, G., Lovik, M., Dastyk, J., Vandebriel, R. J., 2005. Detection of immunotoxicity using T-cell-based cytokine reporter cell lines ("Cell Chip"). *Toxicology* 206(2), 257-272.
- Saito, R., Hirakawa, S., Ohara, H., Yasuda, M., Yamazaki, T., Nishii, S., Aiba, S., 2011. Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 254(3), 245-255.
- Schmeits, P.C., Shao, J., van der Krieken, D.A., Volger, O.L., van Loveren, H., Peijnenburg, A.A., Hendriksen, P.J., 2015. Successful validation of genomic biomarkers for human immunotoxicity in Jurkat T cells in vitro. *J. Appl. Toxicol.* 35(7), 831-841.
- Senju, S., Haruta, M., Matsumura, K., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takamatsu, K., Irie, A., Nishimura, Y., 2011. Generation of dendritic cells and macrophages from human induced pluripotent stem cells aiming at cell therapy. *Gene. Ther.* 18(9), 874-883.
- Shao, J., Berger, L.F., Hendriksen, P.J., Peijnenburg, A.A., van Loveren, H., Volger, O.L., 2014. Transcriptome-based functional classifiers for direct immunotoxicity. *Arch Toxicol.* 88(3), 673-689.

- Shanti, A., Teo, J., Stefanini, C., 2018. In Vitro Immune Organs-on-Chip for Drug Development: A Review. *Pharmaceutics* 10(4). doi: 10.3390/pharmaceutics10040278.
- Stølevik, S.B., Nygaard, U.C., Namork, E., Granum, B., Pellerud, A., van Leeuwen, D.M., Gmuender, H., van Delft, J.H., van Loveren, H. & Løvik, M., 2011. In vitro cytokine release from human peripheral blood mononuclear cells in the assessment of the immunotoxic potential of chemicals. *Toxicol. in Vitro* 25(2), 555-562.
- Takahashi, T., Kimura, Y., Saito, R., Nakajima, Y., Ohmiya, Y., Yamasaki, K., Aiba, S., 2011. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci.* 124(2), 359-369.
- Investigative Immunotoxicology, Tryphonas, H., Fournier, M., Blakley, B., Smits, J. and Brousseau, P. eds. CRC Press Boca Raton 2005, pp 480.
- The European Parliament and the Council, Retrieved 17 April 2016, EU Directive (2010/63/EU). Official Journal of the European Union.
- Ullerås, E., Trzaska, D., Arkusz, J., Ringerike, T., Adamczewska, V., Olszewski, M., Wyczółkowska, J., Walczak-Drzewiecka, A., Al-Nedawi, K., Nilsson, G., Białek-Wyrzykowska, U., Stepnik, M., Loveren, H.V., Vandebriel, R.J., Løvik, M., Rydzyński, K., Dastyk, J., 2005. Development of the "Cell Chip": a new in vitro alternative technique for immunotoxicity testing. *Toxicology* 15, 206(2), 245-256.
- USEPA. 2019. Directive to Prioritize Efforts to Reduce Animal Testing. <https://www.epa.gov/research/administrator-memo-prioritizing-efforts-reduce-animal-testing-september-10-2019>. Accessed January 28, 2021
- Verstrepen L, Bekaert T, Chau TL, Tavernier J, Chariot A, Beyaert R. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-κB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65:2964-2978
- Vessillier, S., Eastwood, D., Fox, B., Sathish, J., Sethu, S., Dougall, T., Thorpe, S.J., Thorpe, R., Stebbings, R., 2015. Cytokine release assays for the prediction of therapeutic mAb safety in first-in man trials--Whole blood cytokine release assays are poorly predictive for TGN1412 cytokine storm. *J Immunol Methods* 424:43-52.
- Encyclopedic Reference of Immunotoxicology, Vohr, H-W. ed. Springer Berlin 2005 pp 730.
- Vos JG. Immune suppression as related to toxicology. *CRC Crit Rev Toxicol.* 1977 May;5(1):67-101.
- Vos, J.G., Van Loveren, H., 1998. Experimental studies on immunosuppression: how do they predict for man? *Toxicology* 129(1), 13-26.
- Vizcardo, R., Masuda, K., Yamada, D., Ikawa, T., Shimizu, K., Fujii, S., Koseki, H., Kawamoto, H., 2013. Regeneration of human tumor antigen-specific T cells from iPSCs derived from mature CD8(+) T cells. *Cell Stem Cell* 12(1), 31-36.
- WHO, Guidance for Immunotoxicity Risk Assessment for Chemicals. IPCS Harmonization Project Document No. 10. 2012. ISBN 978 92 4 150330.
- Principles and Methods for Assessing Direct Immunotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. International Programme on Chemical Safety: Environmental Health Criteria 180 1996. World Health Organization, Geneva

. Appendix

Antibody Response: Alterations in antigen-specific T cell-dependent antibody responses. Antigens most commonly used include sheep erythrocytes and keyhole limpet hemocyanin.

Cell Proliferation: Alterations in the proliferative response following stimulation with mitogenic compounds such as concanavalin A, phytohemagglutinin, lipopolysaccharide or with allogenic leukocytes in a mixed lymphocyte reaction.

Clinical pathology: Indicates alterations in the leukogram or hematology parameters, such as leukocytopenia/leukocytosis, granulocytopenia/granulocytosis or lymphopenia/lymphocytosis.

CTL: The cytotoxic T lymphocyte assay measures cytotoxicity against tumor or virally infected cells. For the reference compounds above, the majority of studies used either *ex vivo* or *in vitro* assays.

DTH: Alterations in delayed type hypersensitivity were measured by assessing the cell-mediated immune response to a soluble antigen such as keyhole limpet hemocyanin following sensitization and secondary challenge.

Lymphoid Organ weights: Decreases in the weight of spleen, thymus or relevant lymph nodes.

NK cytotoxicity: Natural killer cell cytotoxicity was measured using either *ex vivo* or *in vitro* assays which quantitate cytotoxicity against tumor cell lines or virally infected cells.

OECD 3rd webinar
August 31th, 2022

Lesson and Learned for a Validation Study

Hajime Kojima, Ph. D.,
JaCVAM, CBSR, NIHS, Japan



1

MPS Devices for Commercialization in AMED-MPS Project

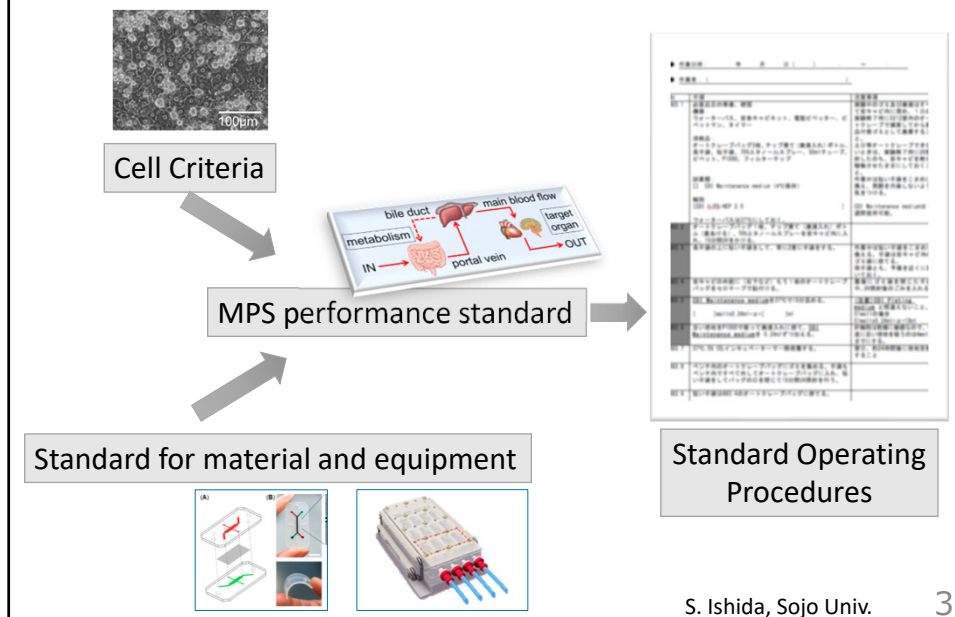
<http://www.scetra.or.jp/business/>

Name (tentative name)	Design/Manufacturing Related device manufacturing	Structure	Target organs				Characteristics
			Liver	Intestine	BBB	Kidney	
Matsunaga Device	Prof. Matsunaga's Laboratory, Nagoya City University/ Shinko Chemical Co., Ltd.	Two-organs connected culture	◎	◎			<ul style="list-style-type: none"> In addition to two-organ coupling assays, it is also applicable to membranous tissue/organ assays. Applicable to 5 commercially available inserts. Adopt pump drive. Size complies with SBS standards.
Kimura Device Fluid3D-X	Prof. Kimura's Laboratory, Tokai University/ TOKYO OHKA KOGYO Co., Ltd.	Multi-layered Microchannel with Porous Membrane Experimental example <ul style="list-style-type: none"> Shear stress load Coculture of Epithelial and endothelial cells AP-BL material transfer observation 	○	○	○	◎	<ul style="list-style-type: none"> Plastic is used as a chip material to low drug adsorption. A unique manufacturing process enables flexible microchannel design change. Low cytotoxicity and good observability (fluorescence/phase-contrast)
PD-MPS (Pressure Driven-MPS)	National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)/ Sumitomo Bakelite Co., Ltd. Control and sensing unit: SHIMADZU CORPORATION · SCREEN Holdings Co., Ltd.	Two-organs connected culture Flow culture (Medium flow under a membrane)	○	○			<ul style="list-style-type: none"> A platform device that can accommodate a variety of organ models by flexible fluid channel design and on-board inserts. A closed system fluid flow is possible by pressure driving.
Sakai/Kimura Device (On-chip pump type MPS device)	Prof. Sakai's Laboratory, Tokyo University; Prof. Kimura's Laboratory, Tokai University/ Sumitomo Bakelite Co., Ltd.	Two-organs connected culture	○	○			<ul style="list-style-type: none"> An organ block type platform device that can accommodate various organ assays through recombination of various culture equipment (inserts and cell deck). Perfusion culture is possible by driving the device built-in stirrer type pump. Oxygen permeable film, honeycomb structure membrane can be used for cell culture bottom in addition to conventional polystyrene.

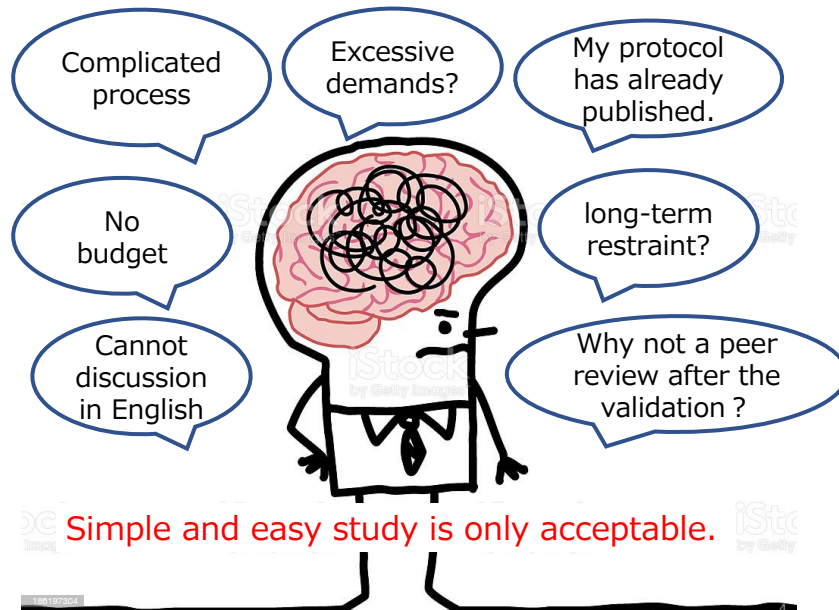
Column for the target organs. It shows the combination of experimental systems in which cells derived from various organs are cultured on each device to evaluate the function of cells and the device. Available in all combinations. The cells not shown are also available. Liver: Liver cells; Gut: Gut cells; BBB: Blood-brain barrier cells; Kidney: Kidney cells. The current development status is shown as follows; ◎: Analysis data using the applicable cells have been obtained; ○: An experiment using the applicable cells is desired based on the user needs.

2

Preparing Operating Procedure for Round-Robin Test



Test developers have many concerns for a validation study



Evaluation criteria for the validated novel test methods

1. **Study objective** and test method purpose
2. **Biological and mechanistic relevance**
3. Test method **protocol**
4. Appropriateness of the validation study management and conduct
5. Adequacy of **chemicals selected** for validation of the study objective
6. Quality of the **reference data** used for evaluation of the relevance
7. Training of naïve laboratories and **transferability**
8. Use of quality assurance system(s) during data generation
9. **Within- and between-laboratory reproducibility**
10. **Predictive capacity**
11. **Applicability domain and limitations**
12. Completeness of data and documentation

OECD GD34 (2005) 5

Simple validation study - Why now?

- A validation study for a novel test method is crucial for the regulatory acceptance of new approach methods.
- Limitations:
 - Numerous evaluation criteria before acceptance
 - Difficulty in performing an international study owing to limited budget
 - Members involved become exhausted while performing several phases owing to revising immature protocols
 - Availability of a poor database concerning several fields of toxicology

6

My proposal is based on Lessons and Learned

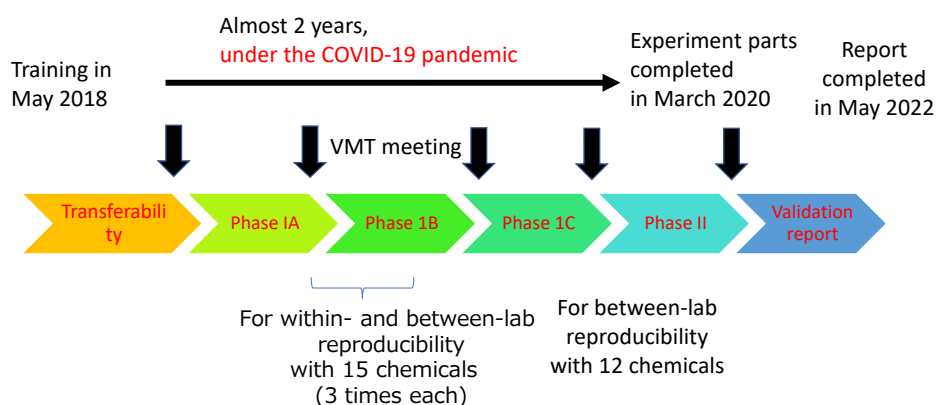
- A detailed review paper including a performance standard should be developed for each systemic toxicity by OECD.
- International experts who are familiar with TG development are mandatory on the validation management team and peer review panel.
- The purpose of the study is limited to checking the robustness and reliability of the protocol based on the performance standard.
- The chemical number is up to 30.



The bottleneck of the validation study is resolved simply and easily

7

Case study: EpisensA for skin sensitization validation study



#This validation study is a performance standard based on the ECVAM validation study.
#The predictive capacity and applicability domain were evaluated based on the data by test developers in the validation report.

8

Short cut for evaluation criteria

Checkpoints prior to a validation study

1. Study the objective and purpose of test method
2. Need and benefits in comparison to those of the existing test methods
3. Comparison of the test method with the essential test method components in the Performance Standards
4. Biological and mechanistic relevance
5. Test method protocol
6. Appropriateness of the validation study management and conduct
7. Adequacy of chemicals selected for validation of the study objective
8. Quality of the reference data used for the evaluation of relevance
9. Training of naive laboratories and transferability
10. Use of quality assurance system(s) during data generation
11. Within- and between-laboratory reproducibility
12. Predictive capacity
13. Applicability domain and limitations
14. Completeness of data and documentation

**Mandatory:
High Quality of VMT**

**Mission during the
validation study**

After the validation study, the predictive capacity and applicable domain is evaluated by VMT members and peer review panel with the test developers.

9

For NAM validation

- Test method is an important element for NAM.
- The purpose is limited to checking the robustness and reliability of the test protocol.
- Before starting the validation study, the VMT members should discuss the objective, benefit, and biological and mechanistic relevance with the test developers and the study plan, including acceptance criteria, with a sponsor.
- The VMT members should discuss protocol development and chemical selection during the ongoing validation study.

10

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

In vivo と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援
研究分担者 美谷島 克宏
東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 教授

研究要旨

本分担は、*in vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援を目的とした。

本年度は、肝臓における代替法の検討として、肝線維化の AOP に作成支援のための組織学的基礎的データを得るとともに、培養細胞において、肝線維化関連因子の発現変動を解析したほか、正常または癌肝細胞において各脂肪酸の影響を評価した。

その結果、肝線維化モデル動物において SOX9 や CD44 発現が増加した。LX-2 細胞の TGFβ1 刺激では変化がみられなかったが、THP-1 細胞の LPS またはパルミチン酸刺激において SOX9 と CD44 の発現が上昇した。脂肪酸の影響では、本実験で使用した正常と腫瘍細胞株においては、特に多価不飽和脂肪酸曝露に対する細胞毒性が異なる可能性が示唆された。

腸管に関する検討では、マウス、マウス空腸由来オルガノイド並びに Caco-2 細胞で、陽性物質である DSS の曝露により、早期からの MIP-2 の遺伝子発現増加が認められ、AOP の成立に寄与する可能性が示された。

以上、両実験系を通して動物モデルと *in vitro* 試験との相関性のある結果について、引き続き精査することにより、新たな毒性指標の開発へと繋がるものと考えられた。

A. 研究目的

本研究は、*in vivo* と相関性のある *in vitro* 毒性評価系による AOP 及び TG の実験データ支援を目的として、肝臓および消化管を標的として以下の検討を行った。

肝臓における検討では、今年度は、肝障害、肝線維化の AOP 作成における基礎データ取得を目的とした。

肝線維化の検討として、肝線維化モデル動物の肝組織において特異的に発現する因子を検討し、さらに、肝線維化を誘導する種々の条件下での培養細胞において、それらの因子の発現変動を検討した。

肝障害の検討として化学物質による肝臓への影響を *in vitro* の実験系において評価することを目的とし、ヒト新鮮正常肝細胞ヒト肝癌由来細胞株を用いて各種脂肪酸曝露の影響を評価した。

腸管由来組織における代替法の検討として、今年度は、化学物質による腸管への影響を *in vitro* の実験系において評価することを目的とし、2次元培養として Caco-2 細胞を用い、3次元培養としてマウス空腸由来のオルガノイドを用いてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 曝露の影響を中心に評価した。

B. 研究方法

B-1. 肝線維化について、肝線維化モデル動物として、高度な線維化を誘発し得る非アルコール性脂肪性肝炎モデルであるコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸食 (CDAA) を用いた。 雄性 F344 ラットならび C57BL/6J マウスに、それぞれに適した CDAA を 3 ヶ月与えて肝線維化を誘導した。病理組織切片を作製し、SRY-box9 (SOX9) および Cluster of Differentiation 44 (CD44) に着目して、免疫組織化学染色を行った。また、ヒト培養肝星細胞株 (LX-2) を TGF β 1 10ng/mL 48 時間刺激、あるいはヒト単球細胞株 (THP-1) を LPS 100 μ g/mL、パルミチン酸 250 μ M 24 時間刺激を行った際の SOX9 と CD44 の遺伝子発現について検討を行った。

肝障害について、新鮮ヒト肝細胞 PXB-cell と、ヒト肝癌由来細胞株 Huh7 を用い、各種脂肪酸 (パルミチン酸、オレイン酸、エイジン酸、リノール酸、アラキドン酸、EPA、DHA) を 1-1600 μ M の濃度で 24 時間曝露し、WST-8 アッセイで細胞毒性を評価した。

B-2. 腸管由来組織における代替法の検討

B-2-1. DSS 誘発腸病変に対する背景メカニズムの検証

DSS (MP Biomedicals) を 7 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに 1.25, 2.5, 5.0% の濃度で 3 日から 2 週間飲水投与し、小腸及び大腸の病理組織学的解析、粘膜における炎症系ならびに細胞接着・機能に関する遺伝子発現解析を行った。対照群として、同様に溶媒を投与したマウスを用いて比較検討した。

B-2-2. マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

正常 C57BL/6J マウスから作製した腸管オルガノイドに炎症を惹起させ、炎症関連

因子の変動について検証した。DSS で誘発された *in vivo* 実験より得られた成果をもとに、TNF α を起炎物質として検討した。実験は、通常のマウス由来腸管オルガノイドに TNF α を 0, 15, 30, 60 ng/mL の濃度で培地に添加し、0, 1, 3, 6, 24 時間後に培養組織を回収し、MIP-2 (IL-8 のマウスホモログ) の発現、細胞接着関連因子 (e-Cadherin, Tight junction protein-1 (Zo-1) への影響も解析した。

B-2-3. 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた平面培養による検討

DSS を通常培地 (DMEM: Low Glu に 10% 胎仔ウシ血清 (FBS)、1% 非必須アミノ酸溶液 (NEAA)、1% ペニシリン・ストレプトマイシン添加) にこれまでの検討から、1% 濃度 (w/v) で混じ、Caco-2 に 24 時間曝露した。蛍光免疫組織学的染色による観察を行うため、Cell culture slide (4-well タイプ) の各 well に Caco-2 を 1.3×10^5 cell/mL で播種した。培地は 400 μ L/well とした。2 日毎に培地交換を行い、約 2 ヶ月後に DSS を 1% の濃度で曝露した。DSS 処理後に 3% パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton-X100 で透過処理を行い、更に 1% FBS でブロッキング後、e-Cadherin Rabbit Polyclonal Antibody (ProteinTech) を添加し一晩処理し、Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific) を反応させ、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 添加剤にて封入した試料について蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(倫理面への配慮)

マウスおよびラット使用は最少匹数に留め、東京農業大学動物実験委員会より承認を受けた申請内容に則り実施した。また、

他実験で用いたサンプルを使用して検討するなど、使用動物数の低減に努めた。さらに、腸管組織における検討においては、マウス回腸由来のオルガノイド培養組織を作製においてマウスを使用した、その使用は最少匹数に留めた。

C. 研究結果

C-1. SOX9 は、ラット・マウス共に、肝線維化に沿って著明な発現増加がみられた (図 1, 2)。マウス組織において種々の検討を行ったところ、SOX9 は Sirius Red 陽性部位と一致した。SOX9 は、活性化細胞星細胞である α -smooth muscle actin (α SMA) とは部分一致にとどまり、胆管上皮細胞である Cytokeratin 19 (CK19) との一致を認めた (図 3)。CD44 は、ラット CDAА において著明な遺伝子発現を示し、病理組織においては一部の胆管に陽性を示した。CD44 陽性胆管上皮周囲に、ヒアルロン酸結合タンパクの沈着を認めた (図 4)。一方、マウスの CDAА モデルにおいて CD44 は、マクロファージ様の細胞に著明な発現増加を認めた (図 5)。

LX-2 細胞においては、TGF β 1 の刺激でコラーゲン type1 および type4 の発現増加がみられたが、SOX9 および CD44 発現に変化はみられなかった (図 6)。THP-1 細胞において、LPS ならびにパルミチン酸刺激で TNF α の発現増加がみられ、SOX9 と CD44 は、LPS 刺激で発現の増加、パルミチン酸刺激で発現上昇傾向を示した (図 7)。

肝細胞の脂肪毒性評価において、PXB-cell と Huh7 では、飽和または一価不飽和脂肪酸の脂肪酸曝露による細胞毒性が生じる濃度は同程度であったが、多価不飽和脂肪酸は PXB-cell と比較して Huh7 の低濃度曝露で細胞毒性を示した (図 8)。

C-2. 腸管由来組織における代替法の検討

C-2-1. DSS 曝露によるマウス腸管への影響

DSS 投与により、試験期間中に、一般状態の悪化を呈する個体は安楽殺を施した。解剖時には腸管を摘出し、遺伝子発現解析並びに病理組織学的解析を行った。DSS_1.25%及び2.5%群では、2週間の試験期間中で瀕死個体や死亡個体が見られた一方で、大腸に明らかな病変を示さない個体も観察され、病態にばらつきが生じた。DSS_5%群では、投与3日で炎症パラメータの安定的な上昇が示され、投与7日によって大腸における明らかな炎症像を呈し、安定した病態発現が観察された。TNF α や IL1 β は、投与3日で顕著な発現上昇を示し、投与7日では投与3日と比較して減少傾向を示した。その一方で、MIP-2 や HMGB1 は投与3日から顕著な発現上昇を示し、投与7日でさらに増強した。以上のことから DSS_5%飲水投与が早期から安定した病態発現を誘導し、さらに炎症の増強に関与する因子が明らかとなった。病理組織学的に変化は見られなかったが、炎症関連因子として、MIP-2 (CXCR2) の遺伝子発現が顕著に増加することが見出された (図 9)。

C-2-2. マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

TNF α 添加後1時間から MIP-2 の遺伝子発現は濃度依存的に増加した。DSS のいずれの濃度においても MIP-2 発現は TNF α 添加後1時間をピークとして24時間まで徐々に減弱した (図 10)。さらに、TNF α 添加後の e-Cadherin の免疫組織化学染色において、粘膜における染色性の低下が濃度依存的に認められた (図 11)。

C-2-3. 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた平面培養による検討

2週間 Pre 培養し 24 時間 DSS を培地に添加したところ、1%では細胞培養の状態に Control と明らかな差は見られなかったが、e-Cadherin の免疫組織化学染色では、細胞間の陽性部位における染色性の減弱が認められた (図 1 2)。

D. 考察

D-1. ラットおよびマウス CDAA モデルの組織学的検討により、SOX9 は線維上に著明に発現し、それは CK19 との一致を認めたことから、細胆管反応とよばれる現象が、従来からの活性化星細胞に加えて重要である可能性が示唆された。CD44 もラットにおいては胆管上皮細胞に発現がみられ、その周囲にヒアルロン酸結合タンパクが存在していたことより、胆管上皮細胞を介した肝線維化に寄与していると考えられた。一方で、マウスにおいてはマクロファージ様の細胞に発現がみられたため、同じげっ歯類においても、ラットとマウスでは発現様式が異なる可能性が示唆された。培養細胞において、SOX9 と CD44 は、LX2 を強力に活性化する TGFβ1 刺激には発現変動に関与せず、THP-1 への TLR4 を介した炎症性刺激において、発現の上昇が示唆された。

正常または腫瘍肝細胞における脂肪毒性に対する評価において、前年度と異なる細胞株で実験を実施した本年度も、特に多価不飽和脂肪酸曝露に対する細胞毒性が異なることが明らかとなった。今後、その機序について精査する予定である。

D-2. 腸管由来組織における代替法の検討

腸管由来組織における動物実験代替法の確立を目的として、今年度はマウスへの DSS 投与の実験条件の最適化、分子病理学

的な病態プロファイルを解析した。さらに、*in vitro* の検討では、上記の *in vivo* 実験系から見出された炎症系関連遺伝子発現の変動より、TNFα をオルガノイド組織に添加した後に IL-8 のマウスホモログである MIP-2 の発現が急性期から濃度依存的に顕著な増加を示すことを見出した。これは、DSS 投与によりマウス腸上皮で認められた変化が *in vitro* オルガノイド実験系においても検証されたことを示すものと考えられた。さらに、腸管由来の株化細胞 Caco-2 を用いた 2 次元培養による検討では、昨年度までの先行研究に基づき陽性対照物質として DSS 1%濃度で検討した。DSS 1%曝露では、形態的に細胞の離開や、毒性が生じていないと考えられたが、本濃度において、細胞接着関連因子の変動が観察され、e-Cadherin, ZO-1 の発現が減弱した。これより粘膜上皮細胞のバリア機構に影響するという DSS が有する *in vivo* 試験における毒性兆候が、Caco-2 の 2 次元培養条件下においても検証されたものと考えられた。

以上、腸管関連のいずれの実験系においても DSS の曝露により炎症病態に先立ち MIP-2 遺伝子の発現が増加すること、炎症に起因して細胞接着関連因子が低下することが明らかとなった。これらの知見は *in vitro* 腸管毒性評価の確立に向け新たな AOP 確立にも寄与する成果となり得るものと考えられた。

E. 結論

本研究により、肝臓・腸管由来組織における動物実験代替法の確立に向けた検討を 2 次元培養ないし 3 次元培養条件下で実施し、それぞれ、代替法の開発に資する基礎的情報を得た。今後は、実験条件の精査や *in vivo* 試験で得られる結果との比較検討を進めると共に、表現型の背景メカニズムの

解析を充実させ、具体的な代替法開発に取り組み予定である。さらに、本研究を emergency technology にあたる人体模倣システム (MPS) の開発にも発展させたいと考えている。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Uno K, Miyajima K, Ogawa S, Suzuki-Kemuriyama N, Nakae D. Effects of *Siraitia grosvenorii* extract on nonalcoholic steatohepatitis-like lesions in Sprague Dawley rats fed a choline-deficient, methionine-lowered, l-amino acid-defined diet. *J Toxicol Pathol.* 2023 Jan;36(1):1-10.
2. Uno K, Miyajima K, Toma M, Suzuki-Kemuriyama N, Nakae D. CD44 expression in the bile duct epithelium is related to hepatic fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis rats induced by a choline-deficient, methionine-lowered, L-amino acid diet. *J Toxicol Pathol.* 2022 Apr;35(2):149-157.

F-2 学会発表

1. 宇野 絹子, 美谷島 克宏, 当摩 茉莉花, グエン ハン ニユン, 煙山 紀子, 中江 大胆管上皮細胞におけるCD44発現のNASH肝線維化への寄与, 第49回日本毒性学会学術年会, 2022年6月30日～7月2日, 札幌コンベンショナルセンター.

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

図 1. ラット組織における SOX9 免疫組織化学染色

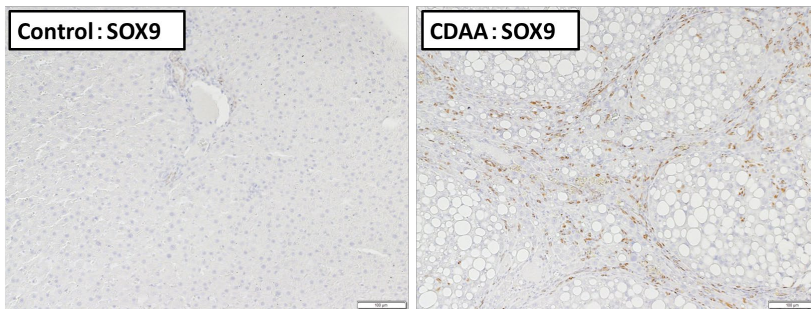


図 2. マウス組織におけるSOX9免疫組織化学染色

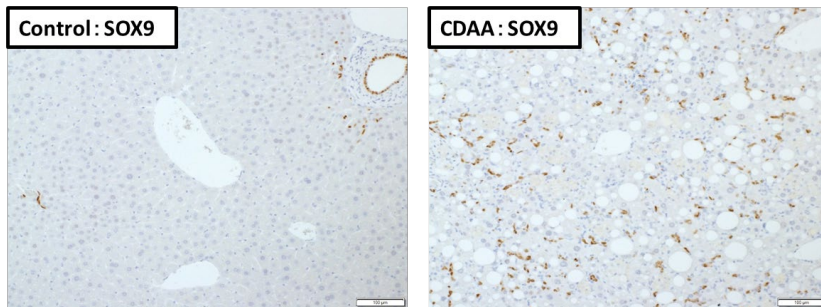


図 3. マウス組織におけるSOX9二重染色

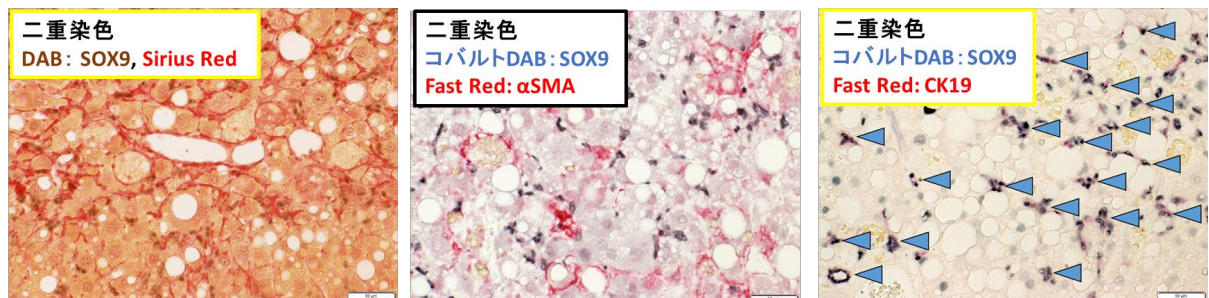
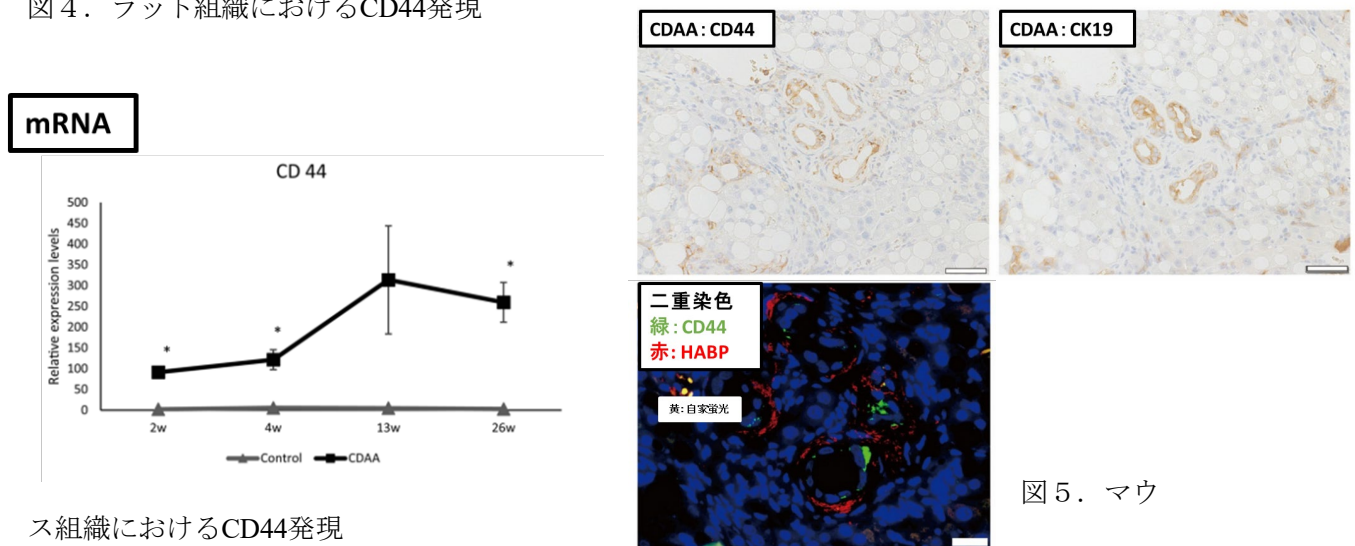


図 4. ラット組織におけるCD44発現



ラット組織におけるCD44発現

図 5. マウ

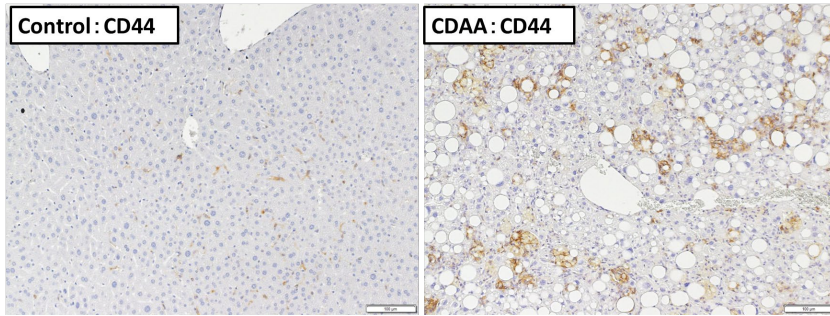


図6. LX2細胞におけるSOX9, CD44発現

SB431542 2 μM 2時間→TGF-β1 10 ng/mL 48時間

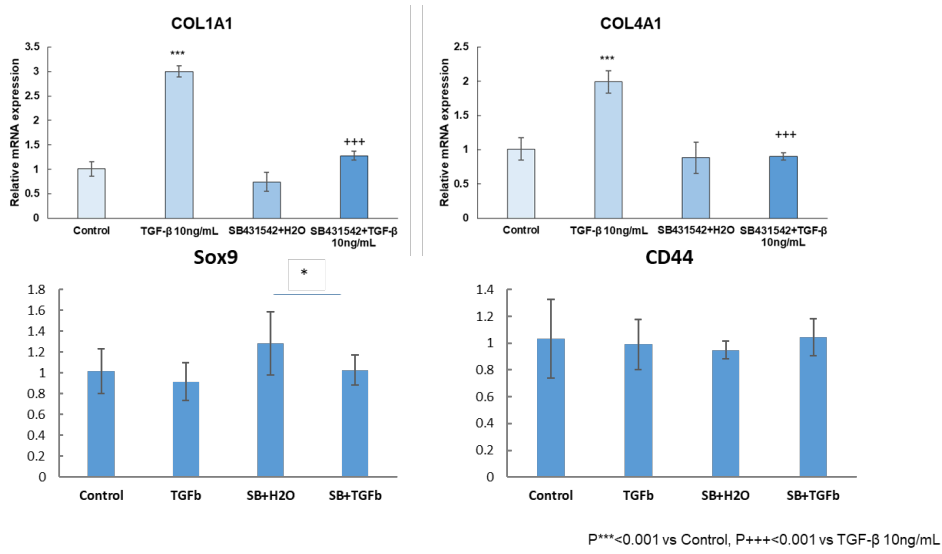


図7. THP-1細胞におけるSOX9, CD44発現

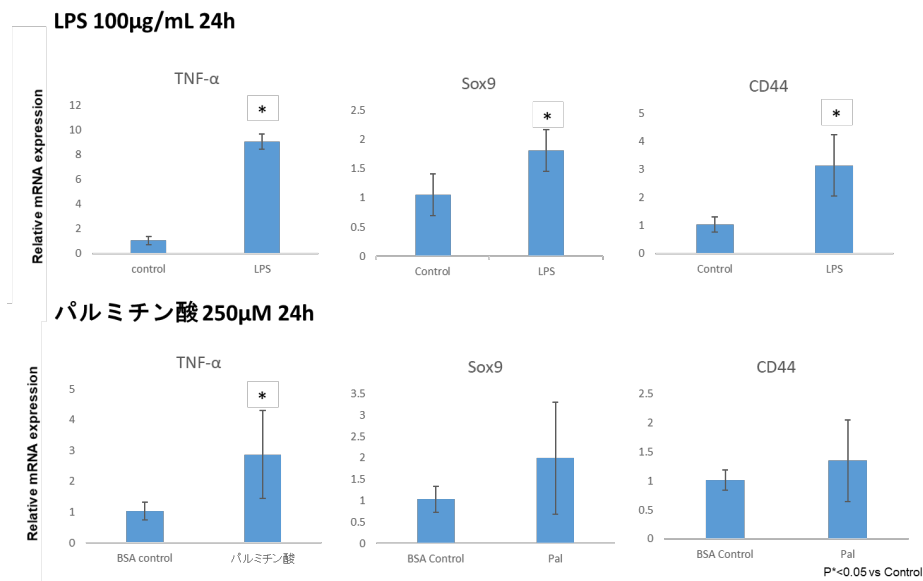


図8. 肝細胞の脂肪毒性評価

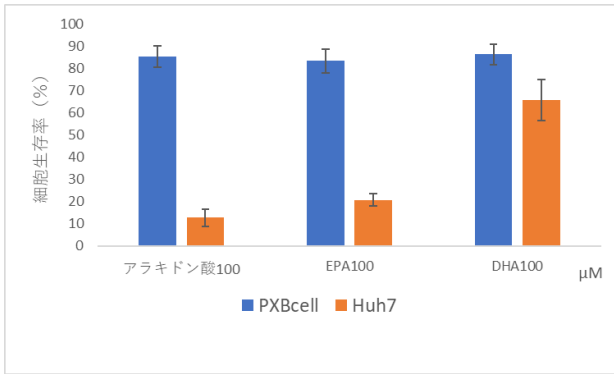


図9. 大腸の炎症関連遺伝子発現

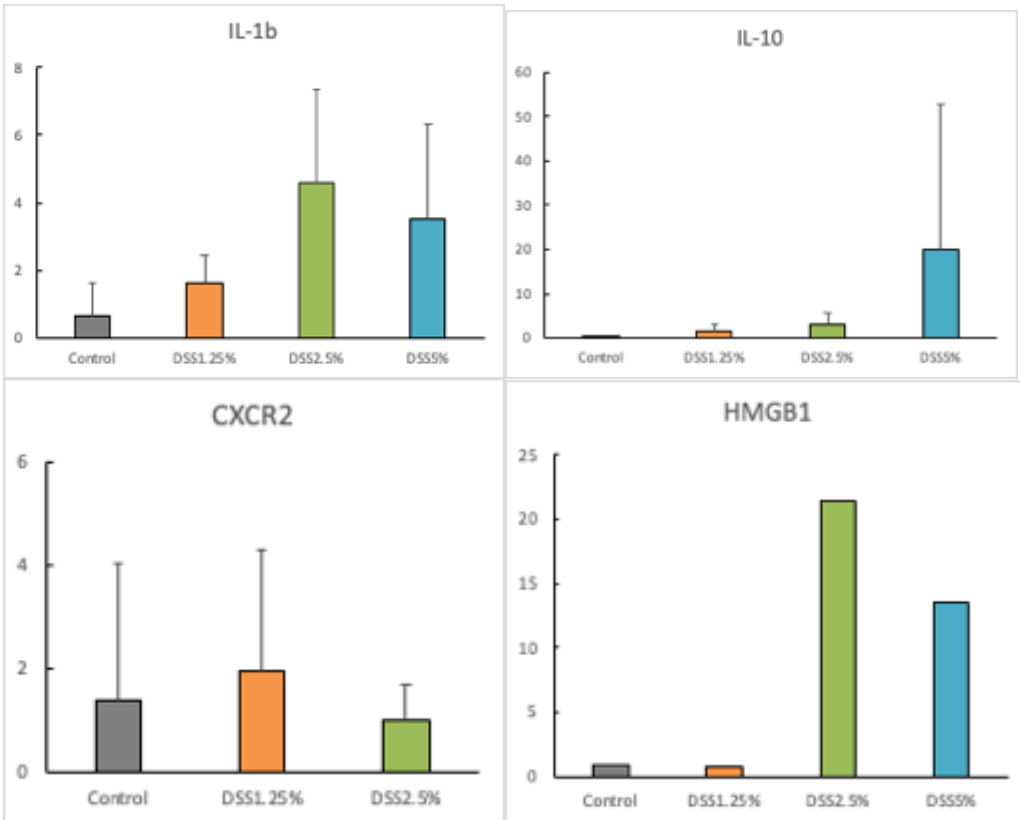


図10. マウス腸管由来オルガノイド MIP-2の遺伝子発現

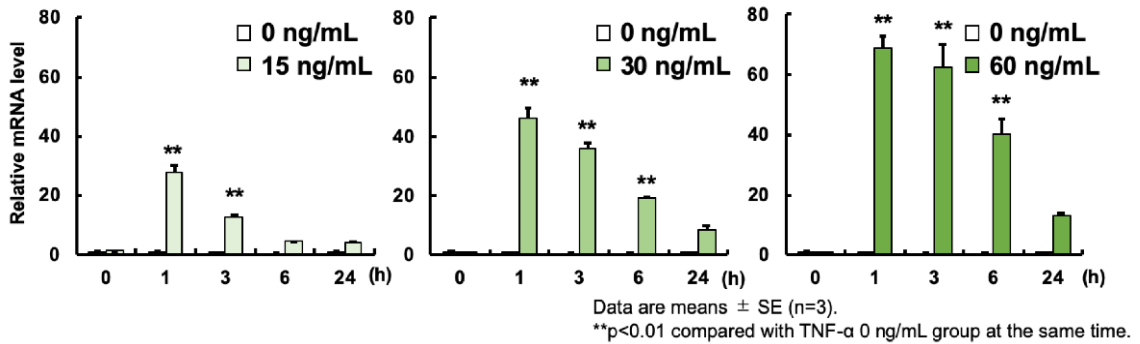


図 1 1. マウス腸管由来オルガノイド e-Cadherin の免疫組織化学染色

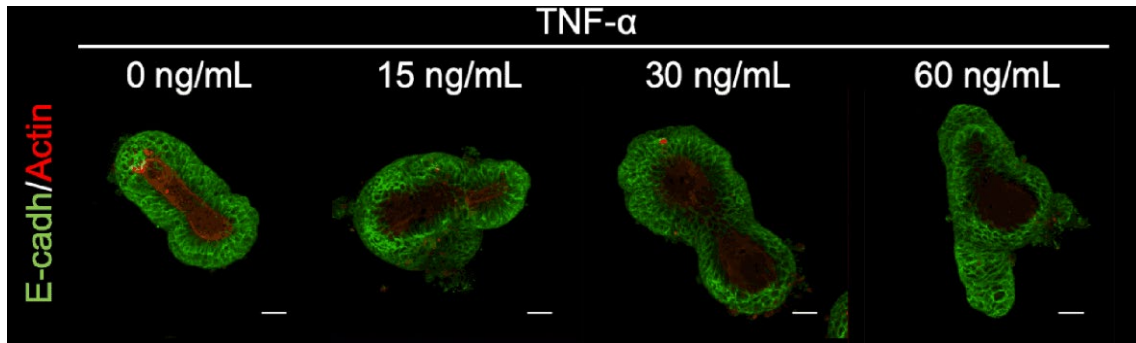
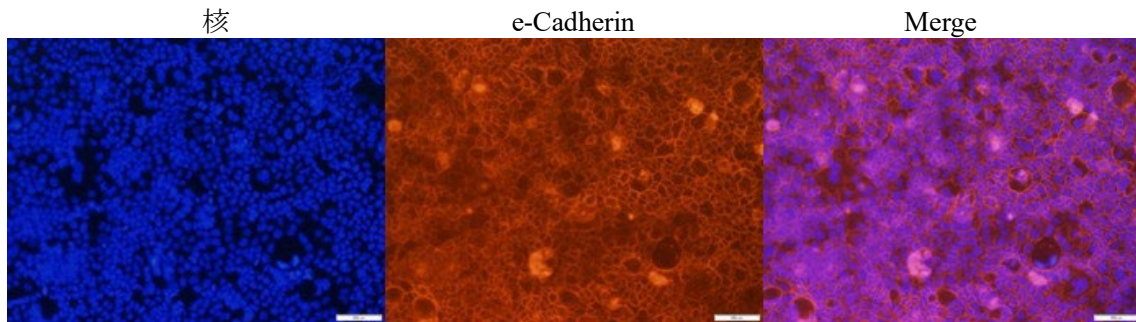
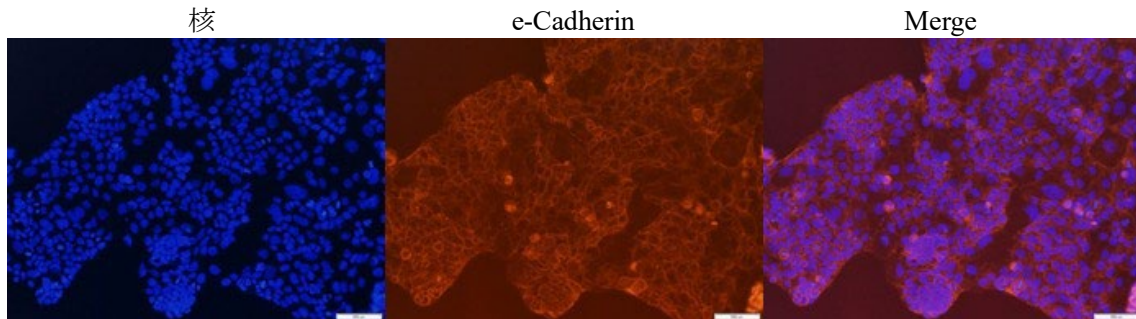


図 1 2. Caco-2細胞 e-Cadherinの免疫組織化学染色

Control



DSS 1%



厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

発がん性試験のIATA及び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病理部 部長
研究協力者 西川秋佳 国立医薬品食品衛生研究所病理部 客員研究員

研究要旨

2016年に経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）において、非遺伝毒性発がん物質の統合的評価手法の確立を目標とした integrated approach to the testing and assessment (IATA) of non-genotoxic carcinogens (NGTxC) の専門家グループが立ち上げられた。非遺伝毒性発がん性の機序に関連する事象を抽出し、それぞれの事象を主に *in vitro* の試験系で評価する方法とその妥当性について、議論が継続されている。本研究では、当該 IATA 開発に協力すると共に、発がん性の有害転帰経路（Adverse Outcome Pathway: AOP）の開発、並びに生体における発がん機序に関する調査研究を実施し、化学物質のヒト発がん性に関する適切な評価を推進し、以て、日本の厚生労働行政に資することを目的としている。

げっ歯類における化学物質誘発鼻腔発がんの網羅的解析結果からは、各種鼻腔腫瘍の前駆病変は、遺伝毒性の有無に関係なく、腫瘍発生部位における化学物質誘発性の細胞毒性と関連している可能性があると考えられた。また、分子開始イベント後の経路は、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質の間で大きく重複している可能性が示唆された。

OECD 専門家グループの cell proliferation のサブグループにおいては、細胞増殖の評価に関する *in vitro* / short term *in vivo* アッセイの適応・留意点・限界などを内容とする論文ドラフト案についてメール及び web 会議にて議論した。細胞増殖の評価では、*in vitro* アッセイのみならず、短期や慢性の *in vivo* 毒性試験における、バイオマーカーを用いた詳細な検討も有用であることが議論された。

2023年2月17日には、各ブロックの進捗状況について、web 会議にて情報共有を行い、全体の取り纏めが図られた。IATA 開発においては、新規アッセイ法の有用性について注視すると共に、アッセイ系の評価が適切になされるよう、引き続き協力を続ける必要があると考えられた。

A. 研究目的

2016年に経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）において、非遺伝毒性発がん物質の統合的評価手法の確立を目標とした

integrated approach to the testing and assessment (IATA) of non-genotoxic carcinogens (NGTxC) の専門家グループが立ち上げられた。非遺伝毒性発がん性の機序に関連する事象を抽出し、それぞれの事

象を主に *in vitro* の試験系で評価する方法とその妥当性について、議論が継続されている。本研究では、当該 IATA 開発に協力すると共に、発がん性の有害転帰経路 (Adverse Outcome Pathway: AOP) の開発、並びに生体における発がん機序に関する調査研究を実施し、化学物質のヒト発がん性に関する適切な評価を推進し、以て、日本の厚生労働行政に資することを目的としている。

B. 研究方法

B-1. 発がん性の AOP 開発

研究協力者西川が主体となり、ホルムアルデヒド誘発鼻腔発がん機序に関する論文に引き続き、各種化学物質暴露による鼻腔発がん全般の AOP に関する論文作成を実施した。ラット、マウス、ハムスターに鼻腔腫瘍を誘発する化学物質について、PubMed の文献に加えて、NTP、IARC、日本バイオアッセイ研究センターのデータベースを使用して情報収集した。誘発された鼻腔腫瘍について、動物種、投与経路、組織型を分類し、更には、関連する非腫瘍性病変及び遺伝毒性のデータについても抽出し、腫瘍発生経路の推定を取り纏め、投稿した。

B-2. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力

非遺伝毒性発がん性 IATA 開発専門家の web 会議に参加し、開発方針に関する議論及び最新の評価方法に関する webinar に参加した。全体会合に加えて、当該 IATA における 13 のアッセイブロックの内 2 つまたは 3 つを分担し、そのサブグループ会議にも参加し、候補となるアッセイの利用に関する考え方など論文化について議論した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

C-1. 発がん性の AOP 開発

網羅的に情報収集した鼻腔発がん物質のうち 40 種の吸入暴露による発がん物質 (ラット 38 物質、マウス 11 物質、ハムスター 5 物質) 及び 38 種の非吸入暴露による発がん物質 (ラット 36 物質、マウス 5 物質、ハムスター 17 物質) について誘発された鼻腔腫瘍を、国際統一毒性病理用語・診断基準 (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria: INHAND) に基づいて分類した結果、扁平上乳頭腫、扁平上皮癌、腺腫、腺癌、腺扁平上皮癌、神経上皮癌、未分化癌、非特異的な癌、線維肉腫、血管腫、血管肉腫、粘表皮腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫が報告されていた。最も高頻度の鼻腔腫瘍は扁平上皮癌であり、投与経路に関係なく認められ、その前駆病変として、扁平上皮化生および/または扁平上皮乳頭腫と呼吸上皮過形成が示唆された。2 番目に多いのは腺癌であり、その前駆病変として主に嗅上皮過形成が示唆されたが、腺腫の前駆病変は呼吸上皮病変と考えられた。これらの経路はげっ歯類間で共通していると考えられるが、マウスまたはハムスターのデータは限定的であった。本内容について、論文化を進めた。

C-2. 非遺伝毒性発がん性の IATA 作成への協力

OECD で進められている非遺伝毒性発がん性の IATA 開発に協力した。2018 年 6 月の会議において、非遺伝毒性発がん性に係る試験・検査のパラメータを優先順位に関して 4 つのカテゴリーに分けることになった。また、候補となるアッセイを 13 のプロ

ックに分けて、分担してレビューしている。

IATA 開発について、小川研究分担者は cell proliferation 及び resistance to apoptotic cell death のサブグループに、西川研究協力者は cell transformation, indicator of oxidative stress 及び resistance to apoptosis cell death のサブグループに参画し、アッセイブロックの評価を行った。

Cell proliferation のサブグループにおいては、細胞増殖の評価に関する *in vitro* / short term *in vivo* アッセイの適応・留意点・限界などを内容とする論文ドラフト案についてメール及び web 会議にて議論した。小川研究分担者は、*in vivo* アッセイに関するセクションを担当し草案を作成した。

2023年2月17日には、各ブロックの進捗状況について、web 会議にて情報共有を行い、全体の取り纏めが図られた。

添付資料

Draft summary record of the teleconference of the expert group on the development of an IATA for non-genotoxic carcinogens (NGTxC)

D. 考察

D-1. 発がん性の AOP 開発

げっ歯類における化学物質誘発鼻腔発がんの網羅的解析結果から、各種鼻腔腫瘍の前駆病変は、遺伝毒性の有無に関係なく、腫瘍発生部位における化学物質誘発性の細胞毒性と関連している可能性があると考えられた。また、分子開始イベント後の経路は、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質の間に大きく重複している可能性が示唆された。

D-2. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への

協力

OECDの非遺伝毒性発がん性のIATA開発において、特に細胞増殖の評価では、*in vitro* アッセイのみならず、短期や慢性の*in vivo* 毒性試験における、バイオマーカーを用いた詳細な検討も有用であることが議論された。今後とも、新規アッセイ法の有用性について注視すると共に、アッセイ系の評価が適切になされるよう、引き続き協力を続ける必要があると考えられた。

E. 結論

E-1. 発がん性の AOP 開発

げっ歯類における化学物質誘発鼻腔発がんの網羅的解析は、化学物質によって誘発される鼻腔腫瘍の病因の包括的な理解に貢献し、細胞毒性から鼻腔腫瘍発生に至る AOPの解明、および非遺伝毒性発がん物質のIATA開発などのOECDの活動に資するものと考えられた。

E-2. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力

OECD の非遺伝毒性発がん性の IATA 開発の議論には、引き続き協力していく必要があると考えられた。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

該当なし

F-2 学会発表

1. 小川久美子、長野嘉介、小島 肇、福島昭治、西川秋佳. 鼻腔発がんの機序について-AOP的考え方. 第5回医薬品毒性機序研究会. 令和4年12月9日、東京.
2. 小川久美子. 「OECDテストガイドライン」と「バイオアッセイ」. 安全性評価技術「Bhas42CTA」の「医薬品、化学物質、電磁

場への社会実装」神奈川県・横浜国立大学 共同研究講座シンポジウム. 令和5年2月17日、横浜.

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

Draft summary record of the teleconference of the expert group on the development of an IATA for non-genotoxic carcinogens (NGTxC)

17 February 2023

Participants

Martin Paparella (Austria); Daniel Desaulniers (Canada); Pavel Babica (Czech Republic); Jochen vom Brocke (EC/ECHA); Kimmo Louekari (Finland); Marc Audebert, Paule Vasseur (France); Annamaria Colacci, Monica Vaccari (Italy); Kumiko Ogawa, Kiyomi Ohmori (Japan); Betty Hakkert, Mirjam Luijten (Netherlands); Maria Dusinska (Norway); Miriam Jacobs (UK); Paul Brown, Danica E. DeGroot, Suzanne Fitzpatrick, Abby Jacobs, Tim McGovern (US); Marco Corvaro, Maria Donner, Christian Strupp, (BIAC); Gina Hilton,

Donna Macmillan (ICAPO); Yusuke Oku (OECD Secretariat),

Invited experts: Iris Carrico (EC/JRC)

Introduction only: Raffaella Corvi (EC/JRC); Tomoko Aoyagi, Patience Browne, Nathalie Delrue (OECD Secretariat)

Objectives

The purpose of the teleconference was:

- To present the status of the work on the assay blocks with respect to the manuscripts close to publication for the Special Issue in the International Journal of Molecular Sciences (IJMS)
- To initiate the discussion on the regulatory framework of the NGTxCs IATA
- To agree on next steps.

Item 1. Introduction

- **Updates from the Secretariat**

The TC was opened by the Secretariat and updates provided on related activities. Nathalie Delrue (OECD) informed the group that the development of an IATA for NGTxC was highlighted as a priority at the last meeting of the Chemicals and Biotechnology Committee (i.e. the Committee overseeing the Chemical Safety Programme at the OECD). Tomoko Aoyagi (OECD) introduced the IATA Case Study Project and the current call for carcinogenicity IATA Case Studies. Following a pilot Case Study on carcinogenicity of agrochemicals (submitted by ICAPO/ReCAAP Consortium), the OECD is now calling for more Case Studies on Carcinogenicity for evaluating human carcinogenicity using a variety of approaches and in different chemical sectors. In this context, the Expert group was invited to submit the draft NGTxC IATA when ready to the IATA Case Study programme (CSP). Cooperation between Test Guidelines Programme and the IATA CSP is important and offers the opportunity to receive feedback on the draft NGTxC IATA from the IATA CSP before submission to the WNT. In addition, expert group members were invited to consult their networks and consider the submission of IATA Case Studies on human carcinogenicity within the next review cycles of the OECD Case Study Project.

- **Project progress**

Miriam Jacobs, chair/project lead (UK) provided an overview of the NGTxC IATA development project. The work was accepted, as a project on the OECD TGP workplan in 2016, with the identification of key mechanisms and promising assays for inclusion in the IATA. A framework where these assays would fit was designed, with the view to encompassing different theories on cancer and being applicable across sectors and jurisdictions. Several papers have been published in the literature, including a thought starter and an uncertainty analysis of the Rodent Cancer Bioassay. In 2018, the EG agreed on a general AOP like structured NGTxC IATA, including assay blocks, based on hallmarks of cancer. The EG then started conducting critical reviews of assays in the various blocks identified. Assessment criteria were developed tested and revised. Many of the reviews include the assays' appropriateness and readiness to enter the Test Guidelines Programme.

It was indicated that most of the subgroup reviews have been completed now and that the remaining ones will be completed this year (see also item 7).

Several AOPs developed/finalised in the AOP-Wiki can also be used and support the work. Examples were given in the presentation. The publication and the slides presented are available in the community site on Expertise in TG development.

The table below lists the various assay blocks identified for the IATA and the corresponding publications under way or completed (See the list of publication in the Annex).

Key hallmarks identified in the IATA	Manuscripts underway or completed in IJMS Special Issue or in other journals
Receptor binding CYP P450 induction	Receptor mediated CYP induction (publication in Front.Reg.Tox)
Cell proliferation*	Cell proliferation (Strupp <i>et al.</i> , in preparation)
Cell transformation*	CTA transcriptomics (2 papers) CTA historical review (Colacci <i>et al.</i> , submitted ¹)
Gap junction	Gap junction
Indicators of oxidative stress	
Immunosuppression and immunoevasion	Immunosuppression/evasion (in preparation, building upon the immunotoxicity DRP– will be presented at Eurotox 2023)
Gene expression and cell signalling pathways*	Gene and cell signalling (Oku <i>et al.</i> 2022)
Apoptotic cell death (manuscript in preparation)	Apoptosis (in prep)
Pathogenic angiogenesis and neoangiogenesis	deprioritised
Genetic instability	
Cellular senescence	Senescence (in prep)
Metastasis	deprioritised
Epigenetics mechanisms	Epigenetics (Desaulniers <i>et al.</i> 2020)
Others	Computational approach from Lhasa (publication in ALTEX)
	Regulatory framework (in prep for special Issue 2023)

* **In bold:** Presented/discussed at the TC

¹ Now published : <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/6/5659>

Item 2. Presentation of the paper on Cell signalling and transcriptomics (Yusuke Oku - Secretariat, Miriam Jacobs - UK, Federica Madia – JRC, Tim Mc Govern, US FDA)

Yusuke Oku (OECD) presented the review paper published in the IJMS last year on cell signaling and transcriptomics. The publication and the slides presented are available in the community site on Expertise in TG development [[Link](#)]. The authors have reviewed assays in Block 7 and examined how the omics tools and resources that are currently available, can be utilised to pre-screen the changes in cell signalling pathways possibly leading to Key Event (KE) precursor steps of the carcinogenic phenotypic outcome. The group proposed that the whole transcriptomics combined with pathway analyses such as Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) can be used as a pre-screening tool of the biological assays for each biological process. The manuscript also describes elements to be considered for the regulatory use of transcriptomics for pre-screening in the IATA, e.g., the use of relevant cell lines, the duration of exposure and concentration.

Item 3. Update on Cell proliferation paper (Christian Strupp, Marco Corvaro - BIAC, Kumiko Ogawa-Japan)

Christian Strupp (BIAC) presented the manuscript in preparation on cell proliferation, for submission in IJMS. The manuscript provides the outcome of the cell proliferation assay review by the subgroup, as discussed over the last years, with the participation of additional experts in the field. A ranking of the various types of assays is proposed in relation to their readiness for future development and validation i.e. A for proliferation markers (in vivo), B for in vitro proliferation in primary cells and C for assays addressing only cell number. In addition, it addresses some common misunderstanding related to cell proliferation.

The technical part of the manuscript is now completed; the authors now are seeking guidance and input from the whole group on how to integrate these assays in the IATA. It was suggested that the paper could include basic recommendations the expert group could build upon at a later stage when considering the various manuscripts. Basic recommendations have been provided by the chair and ECHA colleagues, and include the use of proliferation markers from acute and chronic in vivo studies as part of existing information, and in the MIE and early to mid KEs of the IATA.

Specifically in relation to (i) screening level and identification of the target organ and (ii) more definitive mechanistic studies, i.e., to confirm a Mode of action hypothesis. The authors will continue to work on the manuscript, finalise and submit it.

Miriam Jacobs (UK) informed the group that a figure mapping of the different recommended tests, their readiness and where they could fit in the IATA is in preparation and would support the next steps, i.e. building the IATA.

Item 4. Update on Cell transformation assay historical review paper (Annamaria Colacci - Italy, Raffaella Corvi-JRC, Paule Vasseur, Kiyomi Ohmori) – (different from evaluation of CTA)

Annamaria Colacci (Italy) presented a historical review of the Cell Transformation Assay (CTAs) and how mechanistic insight has been gained in the recent years, which could facilitate the uptake of the CTAs in the future IATA for NGTxC. The work was recently submitted for publication in IJMS. It was noted that this is different from the subgroup review of CTAs, which was conducted separately. It was explained that the main reason the CTAs were not adopted as Test Guidelines at the OECD 10 years ago was the lack of mechanistic understanding at that time. During the period that followed, what might be called ‘the omics era of CTAs’, omics have been used to better understand CTA mechanism, highlighting the role of immune-mediated inflammation pathways towards onco-transformation.

Further work still needs to be done to improve the reproducibility of CTAs and to reproduce the work that has been done on omics. Miriam Jacobs (UK) suggested that there could be opportunities in PARC for more validation, or under auspices of the OECD via the submission of project proposals (SPSFs). Resources will be needed and it was mentioned that the OECD recently sent an open call to grant-making institutions in member countries for an urgent mobilisation of national and regional resources to support validation. This will hopefully encourage funders to support future CTA validation related initiatives.

Item 5. NGTxC IATA draft Regulatory framework – initial considerations and plans

Kimmo Louekari (Finland) presented a preliminary proposal for a Modular testing strategy (MOST) for the testing and assessment of NGTxC. It is organised in modules and was developed with the view to be flexible enough but not too flexible.

The structure of the modules is the following:

- Module A – Available information (Existing (regulatory) data, e.g. endocrine activity screening, systematic toxicity, carcinogenic literature, omics, structural and read across information, QSARs, exposure)
- Module B – Initial Key Event (MIE) and metabolism
- Module C – Mechanistic assays (inflammation, immune response, mitotic signalling, cell injury (gap junction inhibition))
- Module D – Cell proliferation and cell transformation
- Module E – Late adverse outcome, non-adaptative, non-transient
- Module F – Conclusion through weighing the evidence

It was noted that it would be useful to draw a conclusion at the end of each module. We don't know under which legislation the IATA GD will be used when approved but as an example, conclusion of Module C could include several scenarios, e.g.:

Scenario 1: If no evidence on any on the 4 endpoints of module C, and no other indication of toxicity from previous modules → modular strategy stopped and no need for further testing

Scenario 2: Some of the studies are positive → weight of evidence recommended based on the module C assay results and other information available

Scenario 3: Contradicting data from Module C → run the weight of evidence analysis and figure out if further testing / prioritisation for further work is needed.

The presentation was well received. Further discussion is needed by the EG and it was thus proposed to organise a dedicated TC in the near future on the regulatory framework. It can be organized as soon as the other pieces discussed previously are consolidated e.g., cell proliferation; subsequent steps the cell transformation can address etc. Other aspects will be considered too such as new work on ICH (S1B), ReCAAP.

Item 6 – International perspectives – participants will be invited to present other related international initiatives for information and cooperation purposes, e.g. PARC in Europe

Daniel Desaulniers (Canada) reported that his group recently published an experimental paper on the DNA methylation changes in Syrian hamster fetal cell transformation by benzo[a]pyrene ([Desaulniers D et al. 2023 Toxicology](#)).

Item 7. Overarching discussion and planning for next steps

The EG was informed of upcoming webinars (in February – March - display available) organised by PCRM/ICAPO on New Approach Methodology (NAM) Use for Regulatory Application (NURA).

In addition, the following opportunities to meet were proposed:

- Webinar like teleconferences through the year to discuss relevant topics such as:
 - Developed AOPs of interest, e.g., AOP on breast cancer
 - New experimental work on SHE (see item 6)
 - EPAA work
- TC on project proposals for PARC in view of a deadline in May 2023 (proposals for projects to start next year)
- **TC on the development of regulatory framework**, plus considerations of the evolution in various regulatory jurisdictions (to be organised shortly)
- Satellite meeting at the Eurotox meeting (September 2023): discussion of immunoevasion – opportunity for those who will join to meet in person
- **OECD face to face**, if we are ready in Autumn 2023.

There was support for these meeting options. Regarding the face-to-face meeting, the primary objective of it will be to discuss with the entire group the outcome of the subgroup assay reviews that were initiated following the EG meeting in 2018 and integration into the IATA. This would include the reviews that have been subject to the development of a manuscript.

Early summer, in advance of the meeting, a document will be prepared compiling all the evaluations conducted so far. This document will be circulated and will serve as a basis for the discussion of the EG on assay priorities. It will also help identifying potential gaps, making sure all the assays within a block have been considered (it was noted for example that for the oxidative stress, the ToxTracker is not the only assay and furthermore it is developed primarily to provide mechanistic insight for genotoxicants, not for NGTx, however there are aspects of cross-over).

In addition to the assay evaluation, other objectives of the face-to-face meeting would also be to (i) consolidate a pragmatic IATA, (ii) agree on what sort of case studies could be initiated. It was noted that assay priority setting should be considered and assays that are close to validation should be proposed for OECD TGs development via the preparation of SPSFs at an appropriate time. The draft Guidance Document on the IATA should be initiated in parallel to the proposals for TG development since both activities would support each other.

Annex: Links to published IJMS Special Issue papers

Sovadinová, I.; Upham, B.L.; Trosko, J.E.; Babica, P. Applicability of Scrape Loading-Dye Transfer Assay for Non-Genotoxic Carcinogen Testing. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(16), 8977; <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/16/8977>

Desaulniers, D.; Vasseur, P.; Jacobs, A.; Aguila, M.C.; Ertych, N.; Jacobs, M.N. Integration of Epigenetic Mechanisms into Non-Genotoxic Carcinogenicity Hazard Assessment: Focus on DNA Methylation and Histone Modifications. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(20), 10969; <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/20/10969>

Ohmori, K.; Kamei, A.; Watanabe, Y.; Abe, K. Gene Expression over Time during Cell Transformation Due to Non-Genotoxic Carcinogen Treatment of Bhas 42 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(6), 3216; <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/6/3216>

Pillo, G.; Mascolo, M.G.; Zanzi, C.; Rotondo, F.; Serra, S.; Bortone, F.; Grilli, S.; Vaccari, M.; Jacobs, M.N.; Colacci, A. Mechanistic Interrogation of Cell Transformation In Vitro: The Transformics Assay as an Exemplar of Oncotransformation. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(14), 7603; <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/14/7603>

Oku, Y.; Madia, F.; Lau, P.; Paparella, M.; McGovern, T.; Luijten, M.; Jacobs, M.N. Analyses of Transcriptomics Cell Signalling for Pre-Screening Applications in the Integrated Approach for Testing and Assessment of Non-Genotoxic Carcinogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23(21), 12718; <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/21/12718>

Colacci, A.; Corvi, R.; Ohmori, K.; Paparella, M.; Serra, S.; Da Rocha Carrico, I.; Vasseur, P.; Jacobs, M.N. The Cell Transformation Assay: A Historical Assessment of Current Knowledge of Applications in an Integrated Approach to Testing and Assessment for Non-Genotoxic Carcinogens. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(6), 5659; <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/6/5659>

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

発がん性試験における AOP 及び TG の実験データ支援

研究分担者 豊田武士

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 室長

研究要旨

本研究では、腎発がん物質検出における γ -H2AX の感度・特異度の検証を目的とする。令和4年度は、腎発がん物質6種および腎毒性/非発がん物質2種を用いたラット28日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における γ -H2AX 形成の免疫組織化学的解析を行った。腎発がん物質はいずれも、尿細管上皮細胞における γ -H2AX 形成を有意に増加させた。腎毒性/非発がん物質である Carboxin は、発がん性試験で用いられた用量（0.04%）では γ -H2AX 形成の増加を示さなかった一方、短期試験の最大耐量（0.2%）では γ -H2AX 陽性率を有意に増加させた。以上の結果から、 γ -H2AX 免疫染色によりラットにおける腎発がん性と用量との関係を適切に評価し得ると考えられた。

A. 研究目的

近年、化学物質の安全性評価の効率化・迅速化および実験動物福祉（3R）の観点から、長期がん原性試験をより短期間の試験で代替する手法の開発が求められている。我々はこれまでに、DNA 損傷マーカーである γ -H2AX が、化学物質の膀胱発がん性早期検出に有用な指標となり得ることを報告してきた。一方で、主要な毒性標的臓器である肝臓および腎臓への応用を検討する必要があると考えられる。腎臓を対象とした評価をこれまでに16物質について実施した結果、 γ -H2AX 免疫染色は膀胱と同様、腎発がん物質の早期検出にも有用である可能性が示唆された。

そこで本研究では、腎発がん物質早期検出における γ -H2AX 形成の感度および特異度を検証することを目的とする。具体的には、新規の被験物質を用いた28日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における γ -

H2AX 形成の定量解析を行う。また、過去に実施した28日間反復投与試験で得られた腎臓についても同様に検討し、 γ -H2AX 形成を指標とした腎発がん物質検出法の妥当性を評価する。

B. 研究方法

令和4年度に検索する新規被験物質として、腎発がん物質6種：Lead (II) acetate trihydrate (LAT)、1-Amino-2-methylanthraquinone (Disperse orange)、3-(4-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (Monuron)、Nitrofurantoin (NFT)、Phenolphthalein (Phph) および Quercetin、ならびに腎毒性/非発がん物質2種：Carboxin (CBX) および Fradiomycin sulfate (Neomycin) を、6週齢の雄 F344 ラットに28日間混餌投与した（各群5匹）。腎毒性/非発がん物質の投与濃度は、報告されている長期がん原性試験および短期試験で用いられた最大耐量として、

CBX はそれぞれ 0.04%/0.2%、Neomycin は 0.04%/1%の 2 用量を設定した。腎発がん物質については、短期試験における最大耐量として 0.8% LAT、0.24% Disperse orange、0.2% Monuron、0.25% NFT、5% Phph および 4% Quercetin に設定した。

投与期間終了時に解剖し、腎臓および肝臓の重量を測定した。腎臓の病理組織学的検索を実施するとともに、免疫組織化学的手法による γ -H2AX 形成の定量解析を実施した。右腎横断面において皮質および髓質外層外帯の特定部位を顕微鏡下 (x400) でそれぞれ 4 か所撮影し、尿細管上皮細胞の総数ならびに γ -H2AX 陽性細胞をカウントすることで陽性細胞率を測定した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

対照群および各被験物質投与群の、体重・摂餌量・被験物質摂取量を表 1 および 2 に示す。投与期間終了時点で、Disperse orange・Monuron・NFT・Quercetin 投与群において有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量は NFT 投与群で低値の傾向を示した。

各群における臓器重量を表 3 および 4 に示す。0.2% CBX・LAT・Monuron・NFT・Quercetin 投与群では腎相対重量の有意な増加が、0.04% CBX・1% Neomycin 投与群では腎相対重量の減少が、Disperse orange 投与群では腎絶対重量の減少が認められた。また、Disperse orange 投与群で肝絶対・相対重量の増加、Monuron・Phph・Quercetin 投与群で肝相対重量の増加、NFT 投与群で肝

絶対重量の減少、1% Neomycin 投与群では肝絶対・相対重量の減少が観察された。

各群における腎臓の病理組織学的検索結果を表 5 および 6 に示す。LAT・Monuron 投与群では、尿細管上皮細胞における核の大型化が認められた。Disperse orange・CBX 投与群では再生尿細管の形成がみられ、0.2% CBX 投与群ではさらに尿細管上皮の変性壊死および髓質における鉍質沈着が認められた。Monuron・NFT 投与群では尿細管の変性壊死が認められ、NFT 投与群ではこれに加えて近位尿細管上皮細胞における好酸性顆粒の沈着が認められた。Phph・Quercetin 投与群では、再生尿細管の散発的な増加がみられたものの、発生頻度の有意な増加は示さなかった。Neomycin 投与群では、明らかな腎病変は観察されなかった。

各群の腎尿細管上皮細胞における γ -H2AX 形成を免疫組織化学的に検討した結果、対照群では陽性細胞は稀であったのに対し、腎発がん物質投与群では皮質および (Quercetin 投与群を除く) 髓質外層外帯のいずれにおいても γ -H2AX 陽性率の有意な増加が認められた (図 1)。腎毒性/非発がん物質投与群では、0.2% CBX 投与群の髓質外層外帯において γ -H2AX 形成の有意な増加がみられたのに対し、0.04% CBX 投与群では対照群と同じレベルにとどまった (図 2)。一方、Neomycin 投与群では 0.04%/1% いずれの用量においても γ -H2AX 形成の誘導は認められなかった。

D. 考察

令和 4 年度は、新規被験物質として腎発がん物質 6 種および腎毒性/非発がん物質 2 種についてラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における病理組織学的検索および γ -H2AX 形成の免疫組織化学的解析を行った。

その結果、6種の腎発がん物質はいずれも、腎尿細管上皮細胞での γ -H2AX形成を有意に増加させることが明らかとなった。腎発がん物質の早期検出において、 γ -H2AXを指標とした本手法の感度の高さが示唆された。

腎毒性/非発がん物質の検索では、CBXは短期試験の最大耐量(0.2%)を投与した群では腎臓に種々の病理組織学的所見が観察され、 γ -H2AX陽性細胞の有意な増加が認められた。一方、がん原性試験での用量(0.04%)を投与した群では、腎臓の病理所見は比較的軽微であり、 γ -H2AX形成の程度も対照群と同程度であった。以上の結果は、 γ -H2AX免疫染色はラットがん原性試験における腎発がん性の結果を、用量に応じて適切に予測し得る指標であることを示唆している。

Neomycinは1%の混餌投与により、ラットに腎病変を誘導することが報告されているものの(動物用医薬品評価書、2018年、食品安全委員会)、試験結果は非公表であり、詳細は確認できなかった。本研究では病理組織学的所見・ γ -H2AX形成のいずれも認められなかったことから、本試験条件下ではNeomycinはラット腎臓に毒性影響を及ぼさないことが示唆された。

E. 結論

これまでの検討結果を総合すると、腎発がん物質20種のうち、19物質(感度:95.0%)が γ -H2AX陽性細胞の有意な増加を示した一方、非腎発がん物質は検索した9種のうちCBXを除く8物質(特異度:88.9%)が陰性であった。以上より、 γ -H2AX免疫染色を用いることで、腎発がん物質の早期検出が可能であることが示唆された。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Toyoda T, Sone M, Matsushita K, Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, Ogawa K. Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX. *J Toxicol Sci.* (in press)
2. Toyoda T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals. *J Toxicol Pathol.* 2022; 35: 283-298.
3. Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from *o*-toluidine and *o*-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci.* 2022; 47: 457-466.
4. Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol.* 2023; 175: 113702.
5. Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci.* 2022; 189: 51-61.
6. Akane H, Toyoda T, Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *J Appl Toxicol.* 2022; 42: 1603-1617.
7. Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S,

Yoshioka Y, Toyoda T, Ogawa K, Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic homo- and hetero-dimers of *o*-toluidine, *o*-anisidine, and aniline formed by *in vitro* metabolism. *Chem Res Toxicol*. 2022; 35: 1625-1630.

8. Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage. *Nat Commun*. 2022; 13: 5854.

F-2 学会発表

1. Toyoda T, Yamada T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023.3)
2. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京 (2023年1月)
3. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子. 化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程における γ -H2AXの役割. 第81回日本癌学会学術総会、横浜 (2022年9月)
4. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発. 第49回日本毒性学会学術年会、札幌 (2022年7月)
5. 孫雨晨, 齋藤公亮, 牛木淳人, 安部光洋, 齋藤好信, 柏田建, 堀益靖, 弦間昭彦,

巽浩一郎, 服部登, 津島健司, 荒川憲昭, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, 佐藤元信, 高松一彦, 森和彦, 西矢剛淑, 泉高司, 大野泰雄, 斎藤嘉朗, 花岡正幸. 新規薬剤性間質性肺疾患バイオマーカーとしてのキヌレニン及びキノリン酸の同定並びに検証. 日本薬学会第143年会、札幌 (2023年3月)

6. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. 結晶子径6 nmの超微小粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性. 日本薬学会第143年会、札幌 (2023年3月)
7. Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023.3)
8. Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors and promoters of thyroid hormone metabolism. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, Nashville (2023.3)
9. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 渡邊正悟, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆかり, 若林敬二, 三好規之. 単環芳香族アミンの新規尿中代謝物はラット膀胱上皮におけるALDH1A1の発現を誘導する. 日本農芸化学会2023年度大会、Web開催 (2023年3月)
10. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武

- 士、小川久美子. ナノサイズ酸化チタンの90日間反復経口投与による毒性研究. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2023年1月）
11. 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2023年1月）
 12. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割とCD44との関連. 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会、東京（2023年1月）
 13. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害の慢性化病変におけるCD44陽性尿細管の病態生理学的意義. 第5回医薬品毒性機序研究会、東京（2022年12月）
 14. 岡本悠佑、福井千恵、赤根弘敏、豊田武士、梶山健次、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価. 第44回日本バイオマテリアル学会、東京（2022年11月）
 15. 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対するMEKインヒビターの治療効果の検討. 第33回日本消化器癌発生学会総会、東京（2022年11月）
 16. 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ナノサイズ二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性. 第59回全国衛生化学技術協議会年会、川崎（2022年11月）
 17. 赤根弘敏、豊田武士、小川久美子. ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出. 第81回日本癌学会学術総会、横浜（2022年9月）
 18. 赤木純一、豊田武士、小川久美子. γ -H2AXとの組み合わせによる肝発癌物質検出のためのバイオマーカーとしてのEpCAMおよびアミノペプチダーゼNの有用性. 第81回日本癌学会学術総会、横浜（2022年9月）
 19. 増田寛喜、豊田武士、宮下知治、吉田寛、瀬戸泰之、野村幸世. ラット外科的逆流モデルにおけるバレット食道に対するMEKインヒビターの治療効果の検討. 第81回日本癌学会学術総会、横浜（2022年9月）
 20. Kobayashi T, Toyoda T, Yoshioka Y, Murai N, Kishimoto S, Matsushita K, Yamada T, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. Cytotoxic metabolites of *o*-toluidine and *o*-anisidine induce ALDH1A1 in rat bladder epithelium. 13th International Conference on Environmental Mutagens, Ottawa (2022.8)
 21. 岡本悠佑、福井千恵、赤根弘敏、豊田武士、梶山健次、権英淑、神山文男、小川久美子、伊豆津健一、山本栄一、野村祐介. コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価. 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京（2022年8月）
 22. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索. 第8回次世代を担う若手の

- ためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京（2022年8月）
23. 小林琢磨、豊田武士、吉岡泰淳、岸本真治、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之。細胞毒性を有する*o*-Toluidineと*o*-anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する。第29回日本がん予防学会総会、京都（2022年7月）
 24. 赤根弘敏、豊田武士、松下幸平、森川朋美、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子。甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較。第49回日本毒性学会学術年会、札幌（2022年7月）
 25. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いたCD44の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証。第49回日本毒性学会学術年会、札幌（2022年7月）
 26. 赤木純一、水田保子、赤根弘敏、豊田武士、小川久美子。ナノサイズ酸化チタン(IV)の毒性研究。第49回日本毒性学会学術年会、札幌（2022年7月）
 27. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子。AKIからCKDへの移行におけるCD44の役割とバイオマーカーとしての応用。第65回日本腎臓学会学術総会、神戸（2022年6月）
 28. 森川朋美、豊田武士、赤根弘敏、松下幸平、小川久美子。ラットを用いたオリゴガラクチュロン酸の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験。日本食品化学学会第28回総会・学術大会、東京（2022年5月）

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

表 1. 腎発がん物質投与群における体重・摂餌量・被験物質摂取量。

Table 1. Body weights, food consumption, and chemical intake

Treatment	Body weight (g)		Food consumption (g/rat/day)	Chemical intake (mg/kg/day)
	Initial	Day 28		
Control	113.1 ± 4.7	229.8 ± 7.7	14.8	-
Disperse orange	112.8 ± 4.5	192.2 ± 9.1**	11.9	177
Monuron	113.1 ± 4.5	198.5 ± 6.6**	12.6	150
NFT	112.7 ± 7.4	165.2 ± 13.4**	9.5	166
Phph	112.9 ± 8.7	222.9 ± 16.9	15.6	4198
Quercetin	112.7 ± 5.2	205.4 ± 7.4**	14.6	3451

*, **; $P < 0.05$ and 0.01 vs. Control by t -test, respectively.

Disperse orange, 1-amino-2-methylantraquinone; Monuron, 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea; NFT, nitrofurantoin; Phph, phenolphthalein.

表 2. 腎毒性/非発がん物質および LAT 投与群における体重・摂餌量・被験物質摂取量。

Table 2. Body weights, food consumption, and chemical intake

Treatment	Body weight (g)		Food consumption (g/rat/day)	Chemical intake (mg/kg/day)
	Initial	Day 28		
Control	120.0 ± 4.3	219.0 ± 9.7	13.9	-
CBX (low)	120.2 ± 4.6	226.8 ± 10.3	15.4	32.8
CBX (high)	119.9 ± 4.7	210.5 ± 4.1	13.7	154.2
Neomycin (low)	119.9 ± 5.9	228.7 ± 6.9	14.1	29.7
Neomycin (high)	119.9 ± 6.3	215.6 ± 12.5	13.6	747.5
LAT	120.1 ± 5.2	213.5 ± 9.5	13.5	607.3

CBX, carboxin; Neomycin, fradiomycin sulfate; LAT, lead(II) acetate trihydrate.

表3. 腎発がん物質投与群における腎および肝重量。

Table 3. Liver and kidney weight data for male F344 rats

Treatment	Kidney weight		Liver weight	
	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	1.54 ± 0.129	0.67 ± 0.04	7.7 ± 0.58	3.37 ± 0.15
Disperse orange	1.35 ± 0.061*	0.70 ± 0.04	9.7 ± 0.75**	5.04 ± 0.21**
Monuron	1.54 ± 0.078	0.77 ± 0.03**	7.9 ± 0.18	3.99 ± 0.11**
NFT	1.42 ± 0.168	0.86 ± 0.04**	5.6 ± 0.71**	3.36 ± 0.18
Phph	1.52 ± 0.162	0.68 ± 0.02	8.3 ± 0.79	3.71 ± 0.10**
Quercetin	1.52 ± 0.069	0.74 ± 0.03*	7.5 ± 0.27	3.65 ± 0.21*

*, **; $P < 0.05$ and 0.01 vs. Control by t -test, respectively.

Disperse orange, 1-amino-2-methylantraquinone; Monuron, 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea; NFT, nitrofurantoin; Phph, phenolphthalein.

表4. 腎毒性/非発がん物質およびLAT投与群における腎および肝重量。

Table 4. Liver and kidney weight data for male F344 rats

Treatment	Kidney weight		Liver weight	
	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)
Control	1.48 ± 0.08	0.68 ± 0.01	7.58 ± 0.61	3.46 ± 0.19
CBX (low)	1.45 ± 0.08	0.64 ± 0.02**	7.91 ± 0.42	3.49 ± 0.07
CBX (high)	1.47 ± 0.06	0.70 ± 0.02*	7.85 ± 0.41	3.73 ± 0.18
Neomycin (low)	1.49 ± 0.08	0.65 ± 0.02	7.52 ± 0.33	3.29 ± 0.11
Neomycin (high)	1.34 ± 0.11	0.62 ± 0.02**	6.29 ± 0.58**	2.92 ± 0.14**
LAT	1.54 ± 0.12	0.72 ± 0.03*	7.43 ± 0.57	3.48 ± 0.12

*, **; $P < 0.05$ and 0.01 vs. Control by t -test, respectively.

CBX, carboxin; Neomycin, fradiomycin sulfate; LAT, lead(II) acetate trihydrate.

表5. 腎発がん物質投与群における腎臓の病理組織学的所見。

Table 5. Histopathological evaluation in the kidney of male F344 rats treated with renal carcinogens for 28 days

	Control	0.24% Disperse orange	0.2% Monuron	0.25% NFT	5% Phph	4% Quercetin
<i>Findings</i>						
Regenerative tubule (±, +, ++)	0	4* (0, 1, 3)	0	0	2 (2, 0, 0)	3 (2, 1, 0)
Inflammation, interstitial (±)	0	3	0	0	1	2
Degeneration/necrosis (±, +)	0	1 (0, 1)	5** (5, 0)	5** (5, 0)	1 (1, 0)	2 (2, 0)
Eosinophilic granule (±, +)	0	0	0	5** (0, 5)	0	3 (1, 2)
Karyomegaly (+)	0	0	5**	0	0	0

* and **: significantly different from control at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

±, +, and ++: slight, mild, and moderate, respectively.

Disperse orange, 1-amino-2-methylantraquinone; Monuron, 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea; NFT, nitrofurantoin; Phph, phenolphthalein.

表6. 腎毒性/非発がん物質およびLAT投与群における腎臓の病理組織学的所見。

Table 6. Histopathological evaluation in the kidney of male F344 rats treated with renal toxicant and carcinogen for 28 days

	Control	0.04% CBX	0.2% CBX	0.04% Neomycin	1% Neomycin	0.8% LAT
<i>Findings</i>						
Regenerative tubule (±, +, ++)	1 (1, 0, 0)	5* (3, 2, 0)	5* (0, 0, 5)	1 (1, 0, 0)	0	0
Inflammation, interstitial (±)	0	1	2	1	0	0
Degeneration/necrosis (±)	0	0	4*	0	0	0
Calcification, medulla (+)	0	0	5**	0	0	0
Karyomegaly (+)	0	0	0	0	0	5**

* and **: significantly different from control at $P < 0.05$ and 0.01 , respectively.

±, +, and ++: slight, mild, and moderate, respectively.

CBX, carboxin; Neomycin, fradiomycin sulfate; LAT, lead(II) acetate trihydrate.

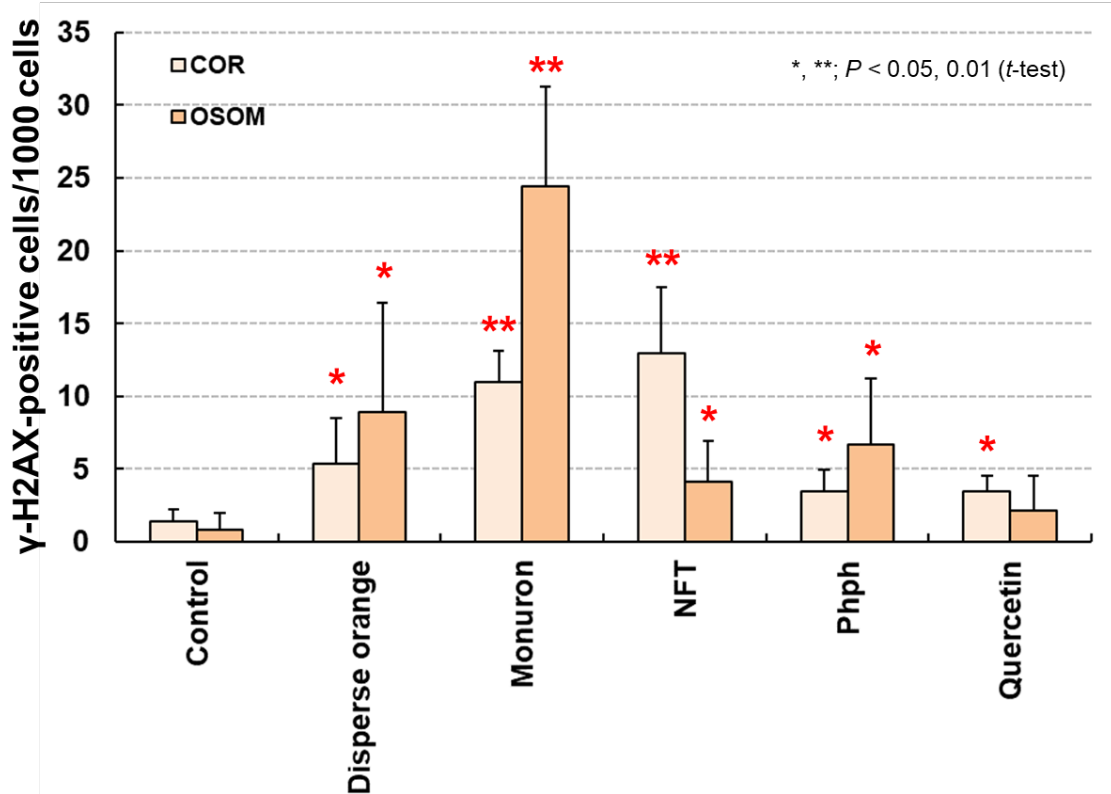


図1. 腎発がん物質投与群における γ -H2AX 陽性率。COR：皮質、OSOM：髄質外層外帯。

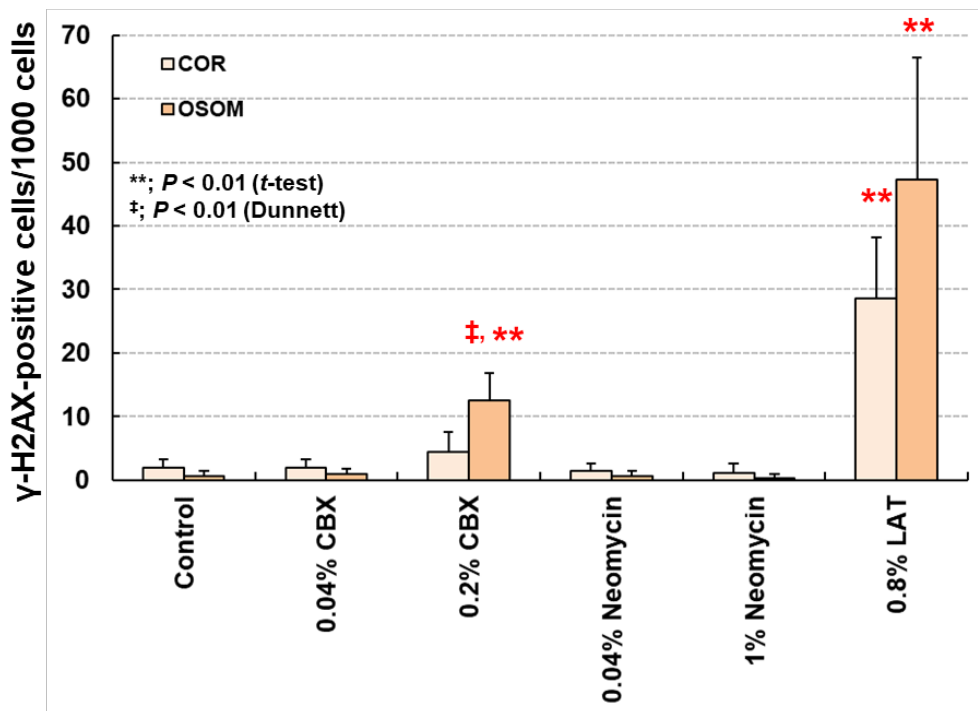


図2. 腎毒性/非発がん物質およびLAT投与群における γ -H2AX 陽性率。COR：皮質、OSOM：髄質外層外帯。

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

遺伝毒性のAOP開発

研究分担者 堀端 克良

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 変異遺伝部 室長

研究要旨

発がん性（遺伝毒性）の AOP への組み込みを想定し、遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムの構築を試みた。遺伝毒性初期応答反応の検出にはクロマチン免疫沈降法（Chromatin immunoprecipitation; ChIP）を応用し、定量的 PCR を用いた DNA 損傷応答の分子生物学的解析を実施した。昨年度に実施した RPA194、 γ H2AX、または Ku80 を ChIP の標的タンパク質とした解析結果から、本手法が DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答を定量・定性的かつ早期に検出できることが示されており、加えて、今年度は LIG4 を ChIP の標的タンパク質とした解析を行った。また、ChIP に適用できる抗体にはポリクローナル抗体の市販品が多いが、将来性を見据え、市販のモノクローナル抗体を用いた ChIP の適用性を検証した。これらの結果から、LIG4 は DNA 損傷依存的に RPA194、 γ H2AX、または Ku80 の局在と類似した DNA 上の分布を示すことを明らかにした。また、DNA 損傷応答に関わるタンパク質の内、6 種の市販モノクローナル抗体の適用性を確認した結果、全てが不適合であることが明らかになった。

A. 研究目的

化学物質の生体曝露から遺伝毒性発現（遺伝毒性 AOP）に至る流れを全体的に捉えると、図 1 で示す経路で示すことができる。すなわち、化学物質に曝露後、場合によっては代謝を経たのちに DNA 上に付加体や DNA 損傷が形成される。それに対し、DNA 修復や DNA 複製などの損傷応答を経由することで、最終的に突然変異、DNA 鎖切断または染色体異常といったエンドポイントとしての遺伝毒性が発現する。したがって、遺伝毒性の発現結果そのものを検出する従来の一般的な遺伝毒性試験法では、結果を得るためにこれらの遺伝毒性発現サイクルが完了するまでの時間を要する。言い換えれば、バクテリアを用いる試

験では遺伝毒性発現サイクルが短いために短期間で試験が終了するが、トランスジェニック変異試験のような試験ではより長い期間を要する。

その一方で、これらの遺伝毒性発現の基本的な概念は、バクテリア、培養細胞、高等生物で普遍的であり、また一般的に曝露から損傷応答反応が生じる期間は遺伝毒性発現期間と比べて非常に短時間である。すなわち、この流れをタイミングよく効率的に捉えることで化学物質の遺伝毒性を短期間で検出することができる。そのためには特に、DNA 付加体や DNA 損傷そのものはそれ自体が最終的に遺伝毒性に結びつかないことがあるため、遺伝毒性に直接結びつく細胞内の応答反応を直接捉える

必要がある。以上を踏まえ、本研究では、発がん性の AOP への組み込みを想定し、遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムを構築することを研究目的とする。

B. 研究方法

遺伝毒性初期応答反応の早期検出システムを構築するため、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) および定量的 PCR を用いた DNA 損傷応答の分子生物学的解析を実施した。なお、一般的なコーディング DNA 領域と比べて、リボソーム DNA (ribosomal DNA; rDNA) は 1 細胞あたりヒトでは数百コピーから成るクラスターを形成しており、また、DNA 代謝反応である転写のメカニズムについての知見も豊富であることから、rDNA を ChIP および定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答解析の標的領域としている。

DNA 損傷の定量化が可能な紫外線 DNA 損傷を誘導した Flp-In 293 細胞を用いて、DNA 二本鎖切断修復の非相同末端結合経路中において二本鎖切断を結合する ATP 依存性 DNA リガーゼとして知られる LIG4 を標的としたポリクローナル抗体を用いた ChIP を実施し、LIG4 が局在する DNA 画分を調製した。加えて、ポリクローナル抗体は市販の在庫量に限りがあるため、将来にわたる利用可能性を見据え、モノクローナル抗体を用いた ChIP の適用性を検証した。モノクローナル抗体は、昨年ポリクローナル抗体で標的とした RPA194、 γ H2AX を認識するモノクローナル抗体に加えて、DNA 損傷応答や DNA 修復に関わることが知られる REV1、CSB、XPA、MSH2 および LIG4 を標的とするモノクローナル抗体をそれぞれ使用した。

これらの抗体を用いて ChIP により得られた DNA 画分を鋳型 DNA とし、rDNA unit

を転写領域および非転写領域を含む領域に分けてそれらを標的とした 9 つのプライマーセット (H1~H42.9、図 2A) を用いた定量的 PCR により、DNA 損傷誘導時における各標的タンパク質の rDNA 上での位置的相対量変化を解析することで、DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答の定量・定性的検出を実施した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

遺伝毒性初期応答反応の早期検出システム構築に用いた rDNA unit 上のプライマーセット H1~H42.9 の内、H1~H13 は転写領域、H18~H42.9 は非転写領域を検出することができる。DNA 損傷を誘発しない条件において、ポリクローナル LIG4 抗体の共沈 DNA 中には rDNA unit 全領域の H1~H42.9 が均一に存在しているが、紫外線 DNA 損傷誘発時におけるポリクローナル LIG4 抗体の LIG4 共沈 DNA 中には H1~H42 がさらに多く存在し、その中でも特に H18 および H27 の DNA 領域が多く存在することが示された (図 2B)。

モノクローナル抗体 (RPA194、 γ H2AX、REV1、CSB、XPA、MSH2 および LIG4) を用いた ChIP については、全ての抗体共沈物中から DNA を検出することができず、また、定量的 PCR においても全く DNA が検出されなかった。

D. 考察

ポリクローナル LIG4 抗体を用いた ChIP および rDNA unit 領域の定量的 PCR の結果から、LIG4 は通常時には rDNA 領域に満遍なく存在している一方で、DNA 損傷誘導時には rDNA の非転写領域の上流

H18 および H27 に偏って局在することが示された。昨年度に実施した γ H2AX および Ku80 の ChIP 解析結果から、 γ H2AX および Ku80 は通常時には rDNA 領域にはわずかにしか存在せず、DNA 損傷誘導時に強く rDNA 領域に局在すること、特に、これらの局在は rDNA の非転写領域の上流 H18 および H27 に偏っており、この DNA 領域において γ H2AX および Ku80 が修復に関わるような DNA 損傷である DNA 鎖切断が生じていることを示唆する結果を得ている (図 2C と D)。LIG4 は DNA 二本鎖切断を結合することが知られており、今回の結果との高い相関性が明らかになった。

モノクローナル抗体を用いた ChIP では共沈 DNA そのものが得られなかった。これらの結果は、これらのモノクローナル抗体が ChIP に全く不適であることを示している。これらの抗体は全て特定の企業が販売しているものであり、ポリクローナル抗体の在庫量に限りがある問題を踏まえると、ChIP に最適なモノクローナル抗体を得るため、他社のモノクローナル抗体を用いた再解析が必要であると考えられる。

E. 結論

発がん性の AOP への組み込みを想定した遺伝毒性初期応答反応の早期検出システム構築の研究では、RPA194、 γ H2AX、Ku80 および LIG4 を標的とした ChIP および rDNA 領域の定量的 PCR を利用した DNA 損傷応答の解析結果から、本手法が DNA 上で直接的に生じている DNA 損傷応答を定量・定性的かつ早期に検出できることが示された。また、ChIP に用いる抗体をアレンジすることで解析の標的タンパク質を自在に設定することができるため、汎用性が高く、この試験法の発がん性・遺伝毒性 AOP 開発に対する高い有効性を示す

ことができると考えられる一方で、ポリクローナル抗体の在庫量に限りがある問題を踏まえると、ChIP に最適なモノクローナル抗体を探索して見つけ出すのは必須である。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Grúz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama KI. Potent mutagenicity of an azide, 3-azido-1,2-propanediol, in human TK6 cells. *Mutation Research* 876–877, 50347531, 2022
2. Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama KI, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of MutaTM Mouse. *Fundamental Toxicological Sciences* 9(2), 31-36, 2022
3. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K. Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan. *Toxicology Reports* 9, 1008-1012, 2022
4. Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S. In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture. *Genes and Environment* 44, 24, 2022
5. Murata Y, Natsume M, Takako I, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M: In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes and Environment*. in press, 2023

F-2 学会発表

1. 磯貴子, 村田康允, 重田善之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. Evaluation of the in vivo mutagenicity of Carbendazim. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30. 札幌)
2. 村田康允, 磯貴子, 重田義之, 広瀬望, 馬野高昭, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. The gene mutation test of styrene using the transgenic mouse. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30. 札幌)
3. Horibata K, Sugiyama KI. Detection of Genotoxic Reactions Through Directly Analyzing DNA Damage Responses on Chromatin Fraction. 13th International Conference on Environmental Mutagens and 53rd Annual Meeting of The Environmental Mutagenesis and Genomics Society (2022.8.27. Ottawa, Canada)
4. Gruz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama KI. Potent mutagenicity of azidoglycerol in human TK6 cells. 7th Asian Conference on Environmental Mutagens and the 19th Conference of Chinese Environmental Mutagen Society (2022.11.5. Qingdao, China & On line)
5. 堀端克良, 木本崇文. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 81 回定例会 (2022.11.14. 広島)
6. 堀端克良, 杉山圭一. クロマチン分画上の DNA 損傷応答解析による遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11.15. 広島)
7. グルーズ ピーター, 清水雅富, 台蔵彩子, 川田憲一, 山田雅巳, 本間正充, 堀端克良, 杉山圭一. Dietary lipids as a source of etheno-DNA damage. 日本環境変異原ゲノム学会第 51 回大会 (2022.11.15. 広島)

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

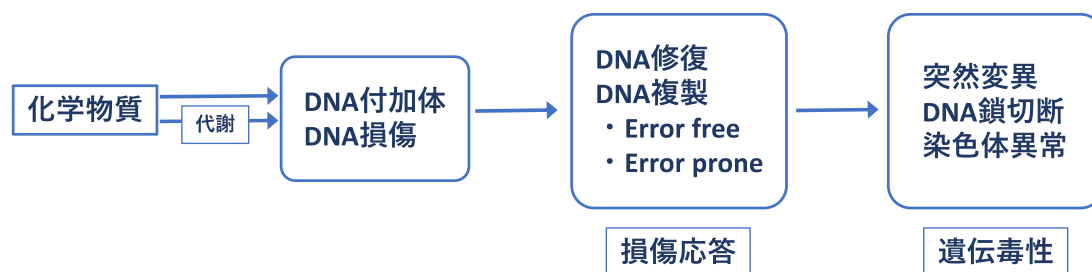
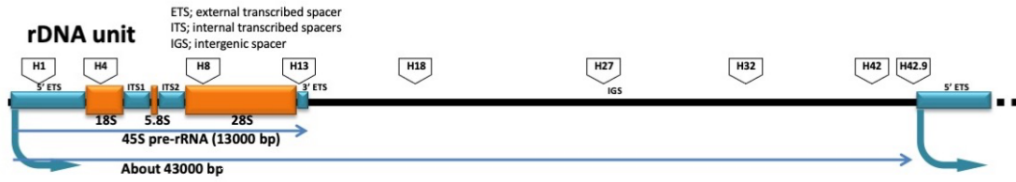
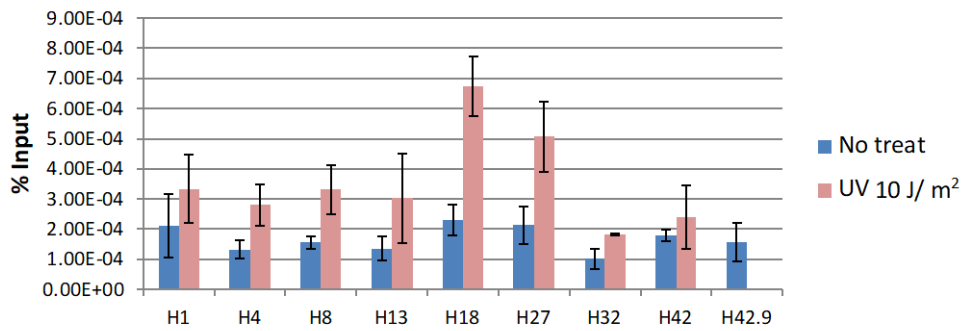
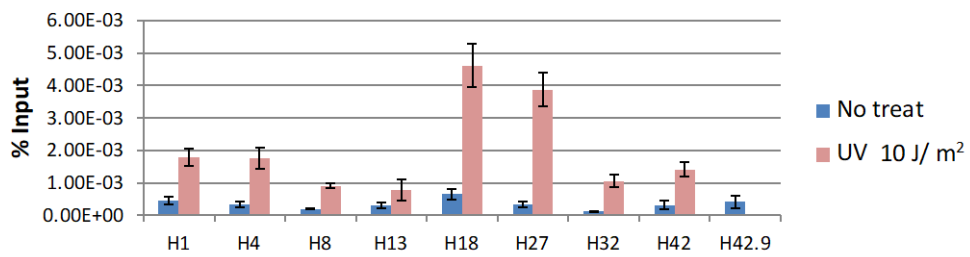
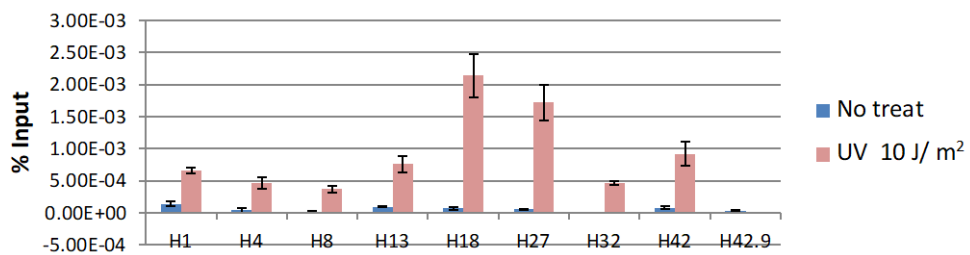


図 1. 化学物質の曝露から遺伝毒性発現まで

A**B****DNA Ligase IV****C****H2A.X****D****Ku80**

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

免疫毒性のAOP及びTG開発

研究分担者 足利太可雄

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部 室長

研究要旨

日本免疫毒性学会 AOP 検討小委員会とともに、免疫毒性に関する5種の有害性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）の開発を行った。AOP313, 314 及び 315 については、コーチ制による内部レビューを受けている。AOP313 については指摘事項対応を行い、外部 review に進むかどうかも含め、コーチと今後の進め方を検討中である。AOP314 については汎用性の低さから外部 review を断念し、総説としての Toxicology letter 誌の掲載を目指し原稿の作成を行った。AOP315 については内部レビューが終了し、外部レビューとして ALTEX 誌掲載に向け原稿の見直しを行った。AOP277 については、外部 review に相当する scientific review に進み、コメント対応を行った結果、外部 review が終了の見通しとなった。また OECD に feasibility study としての SPSF が承認された in vitro 免疫毒性試験である IL-2 Luc LTT については、国際 peer review を開始した。

A. 研究目的

免疫毒性は化学物質の安全性を評価するうえで重要な項目であり、その複雑さから IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) による総合的な評価が必要と考えられている。IATA 確立のためには、免疫毒性に関する複数の AOP (Adverse Outcome Pathway)を開発し、ネットワーク化する必要がある。免疫毒性に関する各種 AOP を日本主導で開発することにより、将来の IATA 開発に大きく貢献するだけでなく、免疫毒性試験代替法を OECD テストガイドライン化することで、当該分野における日本の研究活動を世界にアピールすることを目的とする。

B. 研究方法

B-1. AOP 開発

日本免疫毒性学会会員をメンバーとする同学会試験法委員会 AOP 検討小委員会に免疫毒性 AOP の開発を委託している（研究分担者も本委員会のメンバー）。文献調査の結果に基づいて、MIE (Molecular Initiating Event)、AO (Adverse Outcome)及びその間に介在する KE (Key Event)を定め、OECD に指定された外部（または scientific）レビュアー及びコーチの指摘事項に対応することで4つの AOP 開発を進めた。

B-2. 国際 Peer review

免疫毒性 in vitro スクリーニング試験 IL-2 Luc LTT assay の国際 peer review を担当した。免疫毒性の専門家5名を reviewer に任命し、対面形式も含め毎月会議を行って本

試験法とバリデーション結果を review した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

C-1. AOP 開発

C-1-1. 「TLR (Toll-like receptor) 7/8 への結合による乾癬様皮膚疾患の増悪:AOP313」は、樹状細胞に存在する TLR (Toll-like receptor) 7/8 への結合が、樹状細胞の成熟と IL-23 の産生、Th17 による IL-17 の過剰発現を誘導し、最終的に乾癬様の皮膚疾患を生じさせるという AOP である。本 AOP については、コーチの指摘事項への対応方針（汎用性向上のために、関連する AOP の KE とネットワークを構築できるよう KE および KER の修正など）をコーチに伝えた上で AOPwiki の修正を行った。

C-1-2. 「免疫細胞に存在する ER (Estrogen Receptor)の活性化による全身性リテマトーデス(SLE)の増悪:AOP314」は、さまざまなタイプの免疫細胞に存在する ER の活性化が Th2 タイプのサイトカイン(IL-4)の過剰発現を誘導し、自己抗体産生 B 細胞の誘導から最終的に自己免疫疾患である SLE を増悪させるという AOP である。本 AOP については、KER をサポートする実験情報の少なさや、AO の特殊性から AO および KE の大幅な見直しを検討したが、コーチからの指摘に対応するための情報が不足していることから、外部 review を経た OECD AOP wiki への掲載を断念し、一般の総説として Toxicology letter 誌の掲載を目指し原稿の作成を行った。

C-1-3. 「JAK3 の阻害による T 細胞依存的抗体産生抑制:AOP315」は、非受容体型チロシンキナーゼの 1 つである LAK3 の阻害により IL-4 産生が抑制され、最終的に TDAR

の阻害となるという AOP である。本 AOP については、コーチによる内部 review が終了しており、外部 review の進め方についてコーチを介して OECD に確認したところ、OECD と MOU を締結したジャーナルかメンバー国等による外部 review のどちらか選択すべきと回答があった。そこで OECD と MOU を締結した ALTEX (Alternatives to Animal Experimentation) 誌に投稿の意向を伝えたところ、代替法開発につながる AOP かどうか不明という指摘があった。これに対し、TDAR のような免疫抑制を in vitro 試験で置き換えるには、IL-2, 4 といったサイトカインの産生を指標にする試験法の組み合わせが有効であると OECD の免疫毒性 in vitro 試験に関する Detailed Review Paper に記載があり、本 AOP の KE3 が IL-4 の抑制であることから将来 IL-4 産生を指標とする in vitro 免疫毒性試験法の開発につながることを指摘する予定である。また、外部レビューとして ALTEX 誌掲載に向け原稿の見直しを行った。

C-1-4. 「IL-1 receptor 結合阻害:AOP277」については、昨年度より本分担研究に追加されたものであり、IL-1b のレセプター結合阻害により T cell の活性化が抑制され、最終的に易感染性となるという AOP である。本 AOP はすでに OECD による外部 review (scientific review)に入っており、scientific review report における主な推奨事項は、IL-1R シグナルを阻害するストレッサーに特異抗体だけでなく化合物/医薬品を加えること、AP-1 など NF-κB が関与しない経路も考慮すること、T cell のタイプを明確にすること、増加する感染のタイプを明確にすることなどであった。これらの指摘に対し、対応案を作成し、AOP wiki の大幅な修正を行った。特に大きな変更点は、AO を measurable な指標である TDAR (日本で

開発され、すでに OECD で承認された AOP154 の AO と共有)に変更したことである。こうした対応の結果、scientific review としての外部 review は終了の見通しとなった。

C-2. 国際Peer review

IL-2 Luc LTT assay の国際 peer review については、以下に示す 5 名の免疫毒性の専門家を reviewer に任命し、本試験法およびバリデーション報告書について review report の作成を目指し、評価を行った。

Henk van Loveren (Maastricht University),
Haley Neff-LaFord (Seattle Genetics, Inc.),
Barbara Kaplan (chair, Mississippi State University),
Takayuki Yoshimoto (Tokyo Medical University),
Chiyomi Kubo (Chugai Pharmaceutical)

その結果、validation report の修正が必要とされ、修正案を作成した。

D. 考察

開発中の AOP については、コーチおよび外部 reviewer のコメントに基づいて修正を検討している。既存の情報を収集することで対応できるものもあるが、汎用性拡大の観点から、ストレスナーになりうる化学物質数を増やすことや、特定の臓器における炎症を一般の炎症に拡大することが要求される場合、情報検索によっても適切な情報が得られないことが多く、一部の AOP については開発そのものの方向性を見直すこととなった。開発過程において得られたこうした知見を、今後新たな AOP 開発の際に活かしていきたい。また、IL-2 Luc LTT については、単独の試験法としての評価だけでなく、組み合わせが想定される IL-2 Luc assay との位置づけの明確化が重要であり、今後こうした IATA (Integrated Approach to

Testing and Assessment)を必要とする全身毒性試験代替法開発の際に参考とすべきと考えられた。

E. 結論

AOP313 および 314 については、コーチによる内部 review に対応してきたが、汎用性や確度の高い情報の不足から、一般的な総説として公表することも視野に入れ検討している。AOP315 については、外部 review に進んでおり、OECD と MOU を締結した ALTEX による review を受けるべく準備中である。AOP277 については、外部 review に対応して AOP wiki を大幅に修正した結果、scientific review としての外部 review が終了の見通しとなった。

今年度は OECD において免疫毒性 in vitro 試験に関する Detailed Review Paper が公開され、その中で AOP 開発の重要性が指摘されている。今後とも免疫毒性 in vitro 試験開発の理論的基盤となる AOP の開発および IL-2 Luc LTT の OECD テストガイドライン化に必要な peer review report の作成を進めていく。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

該当なし

F-2. 学会発表

1. 安部賀央里, 成田和人, 小林睦, 立花滋博, 村崎亘, 鈴木政晴, 頭金正博, 足利太可雄. 機械学習アプローチを用いた in silico モデルによるヘアカラー原料の皮膚感作性強度予測, 第 47 回日本化粧品学会 (2022.6.10, On line)
2. 足利太可雄. THP-1 細胞の活性化を指標にしたナノマテリアル(NM)の in vitro 免疫毒性試験法の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)

3. 村崎亘, 安部賀央里, 頭金正博, 山田隆志, 大野彰子, 足利太可雄. 機械学習アプローチによる皮膚感作性強度を予測する回帰モデルの開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.6.30, 札幌)
4. 飯島一智, 鈴尾美穂, 三浦結美, 西田明日香, 大野彰子, 足利太可雄. 未分化および分化 THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの免疫毒性評価, 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.1, 札幌)
5. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 広瀬明彦, 足利太可雄. THP-1 細胞への活性化に及ぼす二酸化チタンナノ粒子の物理化学的特性因子, 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022.7.2, 札幌)
6. 山本直樹, 平松範子, 加藤由布, 西川千恵子, 横井友香, 足利太可雄, 小島肇. 医薬品の生殖毒性試験代替法に有用なヒト由来 iPS 細胞レポーター細胞株の作製と評価に関する研究, 日本組織培養学会第 94 回大会(2022.7.7, 豊中, 大阪)
7. Ohno A, Nishida A, Iijima K, Hirose A, Ashikaga T: in silico elucidation of physicochemical properties factor on activation of THP-1 cells of TiO₂ NP, 264th ACS National Meeting & Exposition (2022.8.22, Chicago)
8. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 皮膚感作性の in vitro 試験法である KeratinoSens™ の結果を予測する機械学習モデルの構築, 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム(2022.8.26, 東京)
9. 足利太可雄, 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智. 皮膚感作性物質あるいは発熱性物質とナノシリカの混合曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究, 第 29 回日本免疫毒性学会学術年会(2022.9.12, 札幌)
10. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. ヒト気管支上皮細胞 /THP-1 細胞共培養系によるナノマテリアルの吸入毒性評価法の開発, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会(2022.11.19, 静岡)
11. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 化学構造情報からヒトの皮膚感作性を予測する機械学習モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会(2022.11.19, 静岡)
12. 荒井りおん, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. h-CLAT を用いたナノマテリアルのアジュバント効果の評価とメカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会(2022.11.19, 静岡)
13. 飯島一智, 鈴尾美穂, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄. THP-1 細胞を用いたナノマテリアルの抗原提示細胞活性化能評価における 新規指標の探索, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会(2022.11.19, 静岡)
14. 木下啓, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. 皮膚感作性評価における in vitro 試験法の効率化を目指した機械学習モデルの開発, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会(2022.11.19, 静岡)
15. 山城真輝, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智. THP-1 細胞を用いた二酸化セリウムおよび酸化亜鉛ナノ粒子の免疫毒性の評価, 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会(2022.11.19, 静岡)
16. Reinke EN, Corsini E, Ono A, Fukuyama T, Ashikaga T, Gerberick GF. Peer Review

Report of the EpiSensA Skin Sensitization Assay, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.21, Nashville, USA)

17. Ashikaga T, Ohno A, Nishida A, Iijima K. Development of toxicity evaluation method for nanomaterials using activation of THP-1 cell as an index, SOT 62nd Annual Meeting (2023.3.22, Nashville, USA)
18. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 足利太可雄. 様々なナノマテリアルを用いた THP-1 細胞の活性化に伴う指標の有効性評価, 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.27, 札幌)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

Bhas42細胞形質転換試験法のTG開発

研究分担者 大森 清美

神奈川県衛生研究所 理化学部 主任研究員

研究要旨

Bhas42細胞形質転換試験法（Bhas 42 CTA）は、化学物質の非遺伝毒性発がん性を遺伝毒性発がん性と区別して検出できる OECD 唯一の試験法（GD231）である。OECD では、化学物質の非遺伝毒性発がん性（NGTxC）検出を目的とした IATA（OECD NGTxC・IATA）開発が 2016 年から行われており、2020 年に Expert working group として NGTxC・IATA 構築の方針を国際合意したレビュー論文を公表した。Mode of action (MoA) を構成する各 Key event およびそれらに対応した 13 の Assay block において、各種試験法の選出、Assay description の作成および評価を実施し、Bhas 42 CTA を含む“Cell Transformation”（Block 3）および、わが国でも NGTxC 検出法として研究されてきた“Gap Junction”(Block 4) を担当し、Assay の選出および評価を行った。その結果、令和 3 年度までに Block 3 は Bhas 42 CTA を含む 3 種の Cell transformation assay (CTA) がランク A に評価され、Bhas 42 CTA のメカニズムに関する論文も公表した。Block 4 では、3 種の Assay はランク B またはランク C の評価となり、それらの Block の評価結果は NGTxC・IATA の全体会議で報告された。令和 4 年度には、NGTxC・IATA で評価された 3 種の Assay に関するメカニズムの論文が Special issue として掲載され、Bhas 42 CTA のメカニズムの論文も Article として収載された。さらには、Block 3 でランク A の 3 種 CTA（SHE CTA、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA）のレビュー論文を公表し、Bhas 42 CTA は NGTxC のメカニズム解明および NGTxC・IATA 構築における CTA の貢献を担う Assay としても重要な位置づけであることが示された。

A. 研究目的

Bhas 42 CTA は、神奈川県政策局の重点基礎研究事業として開発した細胞形質転換試験法であり、化学物質の非遺伝毒性発がん性を遺伝毒性発がん性と区別して検出できる OECD 唯一の試験法（GD231）である。OECD では、非遺伝毒性発がん性検出を目的とした IATA（OECD NGTxC・IATA）開発が行われており、NGTxC のメカニズムをもとに MoA が議論されている。そこで、

NGTxC 検出を目的として開発した Bhas 42 CTA の NGTxC・IATA 構築への貢献に基づき、Bhas 42 CTA の OECD テストガイドライン (TG) の開発に繋げることを目的とする。

B. 研究方法

OECD では、NGTxC・IATA の開発が 2016 年から行われている。NGTxC・IATA では MoA の議論に基づき IATA 構築の方針が

国際合意され、2020 年は Expert working group としてレビュー論文を公表した。NGTxC・IATA のレビューに従い、発がんモデルと AOP にもとづく 13 の Key event に対応する 13 の Assay block を立ち上げ、各 Block は定量的に評価可能な Assay を選出し、それらの詳細な情報を取りまとめ Assay description を作成および評価を行うこととした。各 Assay block における Assay の選出、Assay description の作成および評価は、以下の Step 1 および Step 2 により行った。Step 1 ではメンバーにより提案された Assay の中から定量的に評価可能な Assay を選出し、Assay ごとに詳細な情報を取りまとめた Assay description を作成した。続いて Step 2 では作成者以外のメンバーが Assay description の評価案を作成し、その評価案をもとに、Assay block のメンバー全体で協議し、合意したものを Assay block からの提案 Assay とその評価結果として Expert working group の全体会議に報告した。なお、当研究は、倫理審査および COI の指導・管理に該当しない。

C. 研究結果

令和 3 年度に論文公表した Bhas 42 CTA の細胞形質転換過程における経時的なトランスクリプトーム解析結果では、NGTxC による処理後 4 時点の経時的な RNA 解析において、陰性対照群と比較し有意に発現増大または減少した遺伝子はそれぞれ 2000 を超えていた。それらの遺伝子をパスウェイ解析した結果、Hallmark of Cancer に関連した因子に発現変動がみられた。よって、Bhas 42 CTA の細胞形質転換過程では、がんの特徴的なイベントと共通の因子が発現変動していることを提示した。本論文は、令和 4 年度に公表された NGTxC の Special Issue に Article として掲載された。また、

Block 3 で評価済みの 3 種の CTA (SHE CTA、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA) については、レビューを共著し公表した。Bhas 42 CTA については、陽性検出が報告されている 22 種の NGTxC を提示し、そのうち 8 化合物については Bhas 42 CTA におけるメカニズムの報告も示した。22 種の NGTxC は、発がん性が証明されているもしくは発がん性の可能性のある化合物であるが、Ames 試験およびその他の遺伝毒性で陰性または明確な陽性でなかった化合物を選出した。さらにそれら以外の Bhas 42 CTA 陽性物質 10 種以上についてメカニズムの解析中であることも示した。本レビューの結論においては、CTA は腫瘍形質転換のエンドポイントを提供する唯一の in vitro モデルであり、オミックス解析による CTA の in vitro 腫瘍形質転換につながる多段階プロセスのメカニズムは、人間での多段階発がんプロセスで説明されているメカニズムと一貫性および一致性のある重要なイベントである証拠を提供するものであることを示した。

D. 考察

令和 4 年度に公表された NGTxC の Special Issue に掲載されたメカニズムの論文は、NGTxC・IATA の Block 3 (CTA)、Block 4 (Gap junction) および Block 13 (Epigenetic mechanisms) で評価を受けた Assay を用いた NGTxC のメカニズムであり、今後は、他の Block における Assay の評価およびそれらの Assay による NGTxC のメカニズムの論文により、更なる NGTxC・IATA assay の候補の充実と NGTxC・IATA 構築が期待される。

E. 結論

NGTxC の Special Issue には、NGTxC・IATA

の評価を受けた Block 3 (CTA) の Balb 3T3 CTA および Bhas 42 CTA、Block 4 (Gap junction) の Scrape Loading-Dye Transfer、Block 13 (Epigenetic mechanisms) におけるメカニズムの論文により、これまで black box とされてきた NGTxC のメカニズムが提示されたことは大きな進歩である。また、Block 3 で A 評価である 3 種 CTA (SHE CTA、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA) のレビューでは、CTA が腫瘍形質転換のエンドポイントを提供する唯一の *in vitro* モデルであり、CTA の多段階プロセスのメカニズムは、人間での多段階発がんプロセスと一貫性と一致性のある重要なイベントであることを提示している。これらにより、Bhas 42 CTA は、NGTxC のメカニズム解明および NGTxC・IATA 構築への CTA としての貢献において、重要な位置づけにあることが示された。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Special Issue "Advances in Mechanism Based Toxicity and Hazard Assessment of NGTxC Chemicals", *Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 231470603.
2. Annamaria Colacci, Raffaella Corvi, Kyomi Ohmori, Martin Paparella, Stefania Serra, Iris Da Rocha Carrico, Paule Vasseur and Miriam Naomi Jacobs, The Cell Transformation Assay: A Historical Assessment of Current Knowledge of Applications in an Integrated Approach to Testing and Assessment for Non-Genotoxic Carcinogens, *Int. J. Mol. Sci.*, 2023:24(6), 5659.

F-2 学会発表

1. 志村岳流, 福田一徹, 大森清美, 白川真一, 福田 淳二, 内田和歌奈, 小沼泰子,

紀伊宏明, 宮本健司, Deep Learning による Bhas42 細胞形質転換試験法の画像判定, 日本動物細胞工学会2022年度大会

G. 知的財産権の出願・登録状況

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）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

光毒性の AOP 及び 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

光線過敏症とは特定の化学物質摂取後、太陽光への曝露によって惹起される皮膚および眼における異常反応である。光線過敏症は医薬品のみならず、食品および化粧品等が原因となる場合も報告されており、新規化合物ならびに製品開発における光毒性リスクの回避は重要な課題となっている。光毒性カスケードの上流においては、化合物の光エネルギー吸収に伴う種々の光化学的イベントが認められ、特に光によって励起された化合物の光化学反応性は光毒性リスクに直接的に関係していると考えられる。本研究では光化学的イベントに焦点を置いた AOP を新規に作成するとともに、AOP を基盤とした IATA の開発を行い、動物実験に依存しない光安全性保障システム構築を指向した。

A. 研究目的

地球上に降り注ぐ太陽光は生態系に多くの恵みを与え、太陽光のうち UVC 領域は DNA 損傷などの有害事象を惹起するものの、高エネルギーな短波長光を除けば本来は人体に対してほとんど無害である。しかし、ヒトに投薬された医薬品が体内で光と相互作用を起こすことによって、主に皮膚や眼において炎症、角質化、色素沈着などの有害反応を誘発することがあり、これを広義の光毒性と定義する。対象となるのが薬剤であった際にはこの有害事象を薬剤性光線過敏症と呼称するが、医薬品以外でもこれまでに多くの食品、化粧品等においても同様の光毒性反応が認められている。近年のオゾン層破壊に伴う紫外線量の著しい増加の背景もあって光毒性リスクへの注目が高まっており、光毒性発症機序解明ならびに評価系開発が精力的に進められている。ICH S10 ガイドラインでは、化合物の i) 光反応性および ii) 露光部位（皮膚や眼）への分布が光毒性発現に重要

な因子として明記されている。研究分担者らは先に光化学的評価方法として reactive oxygen species (ROS) assay を開発し、本データと皮膚内動態情報の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た。さらに ROS assay による光化学的特性および *in vitro* 皮膚内動態の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ことを検証し、その予測データを用いることで動物実験代替法の開発を指向した検討を実施してきた。これらの検証結果を基に光毒性に関する AOP ならびに光安全性評価に関する IATA 案構築を試みており、当該年度は AOP の最終化ならびに IATA 案提出ならびに当該領域専門家による review 結果に基づいて修正案作成に従事した。

B. 研究方法

B-1. 光毒性の AOP

研究分担者の尾上は、開発中の光毒性

AOP を専門家の意見に基づいて改変し、AOP wiki を更新した。

B-2. 光毒性 IATA

尾上は光毒性 IATA 案を作成するとともに、OECD expert group からのコメントに従って光毒性 IATA 案を修正した。

C. 研究結果

C-1. 光毒性の AOP

OECD の専門家会議で意見を求め、光毒性反応のうち光刺激性に限定した AOP 作成を推進した (Fig. 1)。体内に取り込まれた光毒性物質はまず皮膚組織に到達し、薬剤の分子内 chromophore、あるいは代謝によって獲得された chromophore が皮膚深部まで到達した光によって照射されると、基底状態の S_0 から励起一重項状態 S_1 に励起される。励起一重項状態の寿命は極めて短く、すなわち蛍光を発して直ちに基底状態 S_0 に戻るか、項間交差により励起三重項状態 T_1 に遷移する。励起三重項状態にある化合物はりん光を発して基底状態 S_0 に戻る。基底状態ではまったく化学反応をしない条件でも、高い光エネルギーを獲得した励起分子は、そのエネルギーを駆動力として結合の解裂や生成または組み換えな

どの化学反応を起こすことができる。そのような過程を光化学過程といい、ラジカル反応である Type I 反応と、一重項酸素反応である Type II 反応とに分けられる。酸素分子は励起エネルギーのアクセプターとして機能し、それに伴い産生された singlet oxygen や superoxide 等の活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) による生体内物質の酸化反応が薬剤性光線過敏症の発症原因の一つとして考えられている。これらの光化学反応の標的が細胞膜上の各種生体成分である場合には光刺激性を誘発し、また DNA の酸化あるいは塩基修飾によって光遺伝毒性や光がん原性が発現する。励起された薬物がハプテンとなりタンパク質と光付加物を形成した際には、免疫原性を示すことになり、最終的に光アレルギー反応を惹起するものと考えられる。いずれにせよ、薬剤性光線過敏症の機序を考えると、最も重要なトリガーとなるのは太陽光の吸収、そしてそれに伴う化合物の励起であろう。しかし、励起された全ての化合物が一様に光毒性を惹起するわけではなく、実質的な光化学的反応を引き起こす化合物が光毒性を誘発するものとする。この観点から「太陽光の吸収しやすさ」の指標である UV/VIS 吸収特性よりも、むしろ励起エネ

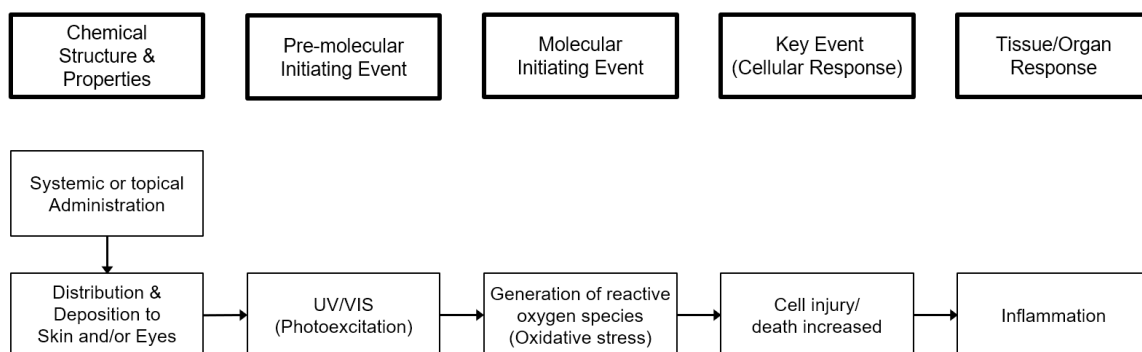


Figure 1. Flow diagram of the adverse outcome pathway and the intermediate steps associated with phototoxic responses.

ルギーによる光化学的反応性を直接評価するアプローチがより実質的な光毒性予測に寄与できる可能性がある。すなわち、光吸収に伴う化学物質の光反応が光毒性のトリガーであるとのコンセプトに基づき、UV/VIS 吸収とそれに伴った励起を *pre-MIE* として定義した。またそれに伴う *MIE* は励起化合物からの ROS 産生とし、次いで *cell injury* を *KE*、最終的な *Tissue response* を *inflammation* とした。

C-2. 光毒性 IATA

作成した AOP を基盤として、その枠組みのなかで *information sources* を網羅的にマッピングした。光毒性に関与する *elements* としては、(i) *Exposure consideration*、(ii) *Chemical descriptors*、(iii) *Skin penetration*、(iv) *Photoexcitation*、(v) *oxidative stress*、(vi) *cell injury* を定義し、それらに関わる *information sources* をリスト化した (Table 1)。具体的な *information sources* としては既にガイドライン化されているものはもちろんのこと、*validation study* が実施されていないアッセイ系でも光安全性保障におけるその有用性を考慮して記述した。

これまでに臨床における薬剤性光線過敏症診断としては *Photopatch test* や皮膚の *biopsy* 等が従来実施され、特に前者は *in vivo* 光感作試験として幅広く利用されている。一方、創薬においては、簡便に光安全性を評価する方法として *in vitro* 3T3 NRU *phototoxicity test* が代替試験法として利用されている。しかしながら創薬初期過程ではスクリーニングの更なる高効率化や異なる機序の光線過敏症リスク評価が求められ、これまでも数多くの評価系が開発・応用されている。これらは、*in silico* スクリーニングツールや、光化学的特性を中心とした分子物性評価、あるいは各種毒性反応に特異的な光生物化学的アッセイ方法などが含まれている。これらのアッセイ手法は創薬

のステージによってその利用方法や位置づけが異なっており、例えば *DEREK* や *HOMO-LUMO Gap* 等の *in silico* システムでは創薬支援として化合物が実際に合成される前段階で新規化合物の光安全性予測を行うことを目的で利用されている。一方、光化学的特性評価ツールは実際に合成された新規化合物の分子物性を指標とした光感受性分析を主体とし、必ずしも光安全性を直接的に評価可能なわけではないが、光毒性反応の誘発に寄与し得る光化学的反応の有無について高いスループットで示唆することが出来る。また、光刺激性評価のためのツールはこれまでも数多く開発されており、枯草菌、白血球や赤血球を用いたアッセイ系やヒト三次元培養皮膚モデルを利用した評価系が *in vitro* 光毒性試験法として有用である。これらの *in vitro* 試験、*in vivo* 試験のみならず、*in silico* や *QSAR* モデルも *information sources* に含めることとし、多様な光安全性評価を可能とした。

先に我々は、皮膚内動態情報と光反応性情報を統合することによって光安全性評価の予測精度を向上させることを明らかにしているが、皮膚内動態については被験物質の物理化学的特性からも部分的に予測可能であり、*ROS assay* データによる光反応性情報との組み合わせによって動物実験に依存しない光安全性保障システムの構築が可能になるものと考ええる。この観点から薬物動態に関係する各種因子についても網羅的に記述した。また、OECD 専門家会議メンバーによるレビューの結果、各 *information source* について *validation status* と *weight of importance* を加えるよう要望があり、これに基づいて当該情報を追記した。

Table 1. Elements and examples of information sources that can be used within defined approaches and IATAs for phototoxicity

Elements	Information sources addressing each element	Validation status/weight of importance
Exposure consideration	<ul style="list-style-type: none"> ● Applied dose ● Frequency of dosing ● Formulation effects ● Route of exposure ● Accumulation of compounds in the skin/eyes ● <i>In vitro</i> to <i>in vivo</i> extrapolation 	<p>– / mid-high</p> <p>– / mid</p> <p>– / mid</p> <p>– / mid-high</p> <p>– / high</p> <p>– / mid-high</p>
Chemical descriptors	<p>Chemical structure</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Structure alert ● QSAR model <p>Physicochemical properties</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Molecular weight ● pK_a ● Partition coefficient (log <i>P</i>, log <i>D</i>) ● Water solubility ● <i>in vitro</i> membrane permeability 	<p>– / mid-high</p> <p>– / mid-high</p> <p>– / mid</p> <p>– / low</p> <p>– / mid-high</p> <p>– / low</p> <p>Validated / high</p>
Skin penetration	<p>Non-testing methods</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Characterization of skin absorption with use of physiologically-based pharmacokinetic models <p>Testing methods</p> <ul style="list-style-type: none"> ● OECD TG 427 (Skin absorption: <i>in vivo</i> methods) ● OECD TG 428 (Skin absorption: <i>in vitro</i> methods) 	<p>Validated / high</p> <p>Validated / high</p> <p>Validated / high</p>
AOP Pre-MIE: Photoexcitation	<ul style="list-style-type: none"> ● UV/VIS absorption ● OECD TG 495 (ROS assay) ● Photostability testing ● Homo-Lumo gap calculation 	<p>Validated / high</p> <p>Validated / high</p> <p>– / low-mid</p> <p>– / low</p>
AOP MIE: Oxidative stress	<ul style="list-style-type: none"> ● Photohemolysis model ● Oxygen consumption in <i>Bacillus subtilis</i> ● Yeast growth inhibition assay ● DNA photocleavage assay 	<p>– / low-mid</p> <p>– / low</p> <p>– / low-mid</p> <p>– / low/mid</p>
AOP key event: Cell injury/death increased	<ul style="list-style-type: none"> ● OECD TG432 (3T3 NRU phototoxicity testing) ● OECD TG498 (<i>in vitro</i> reconstructed human epidermis phototoxicity test) 	<p>Validated / high</p> <p>Validated / high</p>

また、OECD 専門家会議における有識者の助言に従い、information source に対して詳細な記述を加えることとし、具体的には (1) Regulatory use、(2) Validation & regulatory acceptance status、(3) Potential role in the IATA、(4) Description、(5) Scientific basis including MoA、(6) Protocol available、(7) Strengths and weakness、(8) Applicability domain and

limitations、(9) Predictive capacity、(10) Reliability を各種文献情報やガイドラインを交えつつ追記した (Table 2)。全ての information sources に対してこれらの情報を入手するのは容易ではなく、それ故、情報が比較的入手しやすく、なおかつ重要度の高いガイドライン化された光安全性評価系に焦点をあてて記載を試みた。

Table 2. Description of the key elements of the IATA for phototoxicity

(a) UV/VIS absorption

Regulatory use	Identification on photoexcitability of test chemicals by spectroscopic determination of UV/VIS-absorbing properties
Validation & regulatory acceptance status	Validated and adopted as OECD TG 101; presented under guidance document ICH S10.
Potential role in the IATA	Absorption of sunlight by phototoxins, followed by photochemical reaction, is considered to be a key trigger for phototoxicity, because photo-excited chemicals may react with biomolecules, leading to phototoxic events. In this context, the UV-absorbing property of chemicals can be a potential indicator for phototoxic risk, and Henry, et al. demonstrated that chemicals with a molar extinction coefficient (MEC) of less than $1,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ showed low phototoxic risk.
Description	Each chemical is dissolved in distilled water or appropriate organic solvent at several concentrations (e.g., 0.001, 0.01 and 0.1 μM), and the final concentration can be reduced if the tested chemical is found to be an intense UV/VIS absorber. UV/VIS absorption spectra (290–700 nm) are recorded with a spectrophotometer interfaced to a PC for data processing. MEC values can be calculated from maximum absorbance at several concentrations.
Scientific basis including MoA	Absorption of light through the skin varies with wavelength: for example, light in the red region of the spectrum penetrates well into the subcutis layer; whereas at 300 nm or shorter wavelength, only an estimated 10% of incident light passes through the epidermis. When a chemical absorbs photon energy, electrons can be promoted from occupied orbitals (the ground state) to an unoccupied orbital (S_1 , S_2), depending upon the bond type and associated energy level. Unpaired singlet state electrons (opposite spin) may be converted to a triplet state (parallel spin) by inversion of the spin via intersystem crossing of the absorbed energy. Absorbed energy can be dissipated by internal conversion, fluorescence (from a singlet state), phosphorescence (from a triplet state) or via chemical reaction, giving rise to photoproducts and/or intermediates that are potentially reactive with other molecules, including various biomolecules, potentially leading to various

	phototoxic symptoms.
Protocol available	Experimental protocol was established by Henry, <i>et al.</i> and Bauer, <i>et al.</i>
Strengths and weakness	<p><u>Strengths</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - This <i>in chemico</i> test method offers rapid, reproducible and high-throughput (i.e., using 96-well method approaches) results. - Test chemicals that do not show significant absorbance (e.g. MEC >1000 M-1cm-1) may not need further photosafety evaluation <p><u>Weakness</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Some chemicals can be UV/visible light absorbers but do not pose phototoxicity hazard or risk, ‘positive’ prediction from this method needs to be further evaluated with subsequent testing methods. - Standardized conditions for determination of the MECs are critical. Selection of an adequate solvent is driven by both analytical requirements (e.g., dissolving power, UV-visible light transparency) and physiological relevance (e.g., pH 7.4-buffered aqueous conditions).
Applicability domain and limitations	<p><u>Applicability</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - The test method is applicable to substances. <p><u>Limitations</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - It may not be possible to evaluate poorly-water soluble chemicals in this <i>in chemico</i> test method. - The limitations of the chosen method need to be considered (e.g., linear range of the experimental set up). Potential artifacts (e.g., due to concentrations that are too high or precipitating) has to be carefully assessed. - For calculation of MEC, defined molecular weight of test chemical is needed, so that it is challenging to apply this test method to complex materials/chemical without defined molecular weight.
Predictive capacity	Henry, <i>et al.</i> demonstrated that all 35 phototoxins tested had absorbance intensities significantly above an MEC threshold of 1,000 L mol ⁻¹ cm ⁻¹ . Bauer, <i>et al.</i> verified the predictive performance of MEC threshold (1,000 L mol ⁻¹ cm ⁻¹) with 76 chemicals.
Reliability	When measuring MEC values of 76 chemicals in 6 laboratories, all chemicals were found to have agreement of classification between laboratories.

(b) ROS assay

Regulatory use	Identification on photoreactivity of test chemicals by determination of ROS generation from irradiated chemicals
Validation®ulatory acceptance status	Validated and adopted as OECD TG495; presented under Guidance Document ICH S10.

Potential role in the IATA	The primary event in any photosensitization process is the absorption of photons of the appropriate wavelength, which allows chromophore to reach an excited state. The excitation energy is often transferred to oxygen molecules, followed by generation of ROS: superoxide through type I reaction and singlet oxygen through type II reaction by photo-excited molecules. These appear to be the principal intermediate species in the phototoxic response. The ROS assay can monitor generation of ROS, such as singlet oxygen and superoxide, from photoirradiated chemicals; therefore, the ROS data can be used to evaluate the photoreactivity of chemicals.
Description	<p>In the ROS assay, generation of singlet oxygen was detected by spectrophotometric measurement of <i>p</i>-nitrosodimethyl aniline (RNO) bleaching, followed by decreased absorbance of RNO at 440 nm. Although singlet oxygen does not react chemically with RNO, the RNO bleaching is a consequence of singlet oxygen capture by the imidazole ring, resulting in the formation of a trans-annular peroxide intermediate capable of inducing the bleaching of RNO as follows;</p> $\text{Singlet oxygen} + \text{Imidazole} \rightarrow [\text{Peroxide intermediate}] \rightarrow \text{Oxidized imidazole}$ $[\text{Peroxide intermediate}] + \text{RNO} \rightarrow \text{RNO} + \text{Products}$ <p>The generation of superoxide could be determined by the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) as indicated below; NBT can be reduced by superoxide anion via a one-electron transfer reaction, yielding partially reduced ($2 e^-$) monoformazan (NBT^+) as a stable intermediate. Thus, superoxide can reduce NBT to NBT^+, whose formation can be monitored spectrophotometrically at 560 nm.</p> $\text{Superoxide} + \text{NBT} \rightarrow \text{O}_2 + \text{NBT}^+$
Scientific basis including MoA	In any type of phototoxic event, penetration and absorption of light in the skin, eyes, or other UV-exposed tissues can be a critical factor for triggering phototoxic cascades, and the absorption of photon energy by the phototoxin results in excitation of the molecule itself. Since molecular oxygen can act as the predominant acceptor of excitation energy, energy can be transferred from photo-excited chemicals to oxygen through type II photochemical reaction, resulting in the generation of singlet oxygen. Transfer of an electron or hydrogen could also lead to the formation of free radical species such as superoxide, peroxy radicals or reactive hydroxyl radical through a type I photochemical reaction. Thus, photo-excitation of chemicals tends to produce ROS, which may be one of major causative agents of phototoxic events.
Protocol available	OECD TG495
Strengths and weakness	<p><u>Strengths</u></p> <p>- This <i>in chemico</i> test method offer rapid and reproducible photosafety</p>

	<p>prediction.</p> <ul style="list-style-type: none"> - For this test method, UVB light source can be used, that is usually excluded in the cell-based photosafety testing. <p><u>Weakness</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - To avoid spectral interference of discoloring chemicals in ROS determination, an experimental control has to be employed upon exposure of tested chemical alone to simulated sunlight, to subtract control readings from sample readings. - In theory, the ROS assay can provide highly sensitive predictions (i.e., false positives), since it may capture all photochemically active substances. Some photolabile substances would be judged as positive in the ROS assay if they are potent ROS generators in their photodegradation pathways.
Applicability domain and limitations	<p><u>Applicability</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - The test method is applicable to substances. <p><u>Limitations</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - The poorly-water soluble chemicals might be untestable by this <i>in chemico</i> test method. In such a case, the mROS assay is available partly. In the mROS assay, Tween20 is added to solvent system, and the formed micelle can enhance the solubility of most test chemicals. - The chemicals with potent chromophores (e.g., rose bengal) might be untestable because of spectral interference.
Predictive capacity	<p>The validation study was previously undertaken to verify the applicability of different solar simulators and assay performance [43, 44]. In 7 participating laboratories, 2 standards and 42 coded chemicals, including 23 phototoxins and 19 non-phototoxic drugs/chemicals, were assessed by the ROS assay using two different solar simulators (ss-1 and -2). In both solar simulators, the intra- and inter-day precisions (coefficient of variation; CV) for quinine were found to be below 10%. The inter-laboratory CV for quinine averaged 15.4% (ss-1) and 13.2% (ss-2) for singlet oxygen and 17.0% (ss-1) and 7.1% (ss-2) for superoxide, suggesting high inter-laboratory reproducibility even though different solar simulators were employed for the ROS assay. In the ROS assay on 42 coded chemicals, some chemicals (ca. 19–29%) were unevaluable because of limited solubility and spectral interference. Although several false positives appeared with positive predictivity of ca. 76–92% (ss-1) and ca. 75–84% (ss-2), there were no false negative predictions in both solar simulators.</p>
Reliability	<p>Multi-center validation study on the ROS assay demonstrated satisfactory transferability, accuracy, precision, and predictivity, as well as the availability of other solar simulators.</p>

(c) 3T3 NRU phototoxicity testing

Regulatory use	Identification of phototoxicity potential of test chemicals using Balb/c 3T3 cultures
Validation®ulatory acceptance status	Validated and adopted as OECD TG 432; presented in ICH S10 guidance document
Potential role in the IATA	The 3T3 NRU PT assesses the cytotoxic effect of a test substance after exposure to a non-cytotoxic dose of UVA light compared with that in the absence of exposure, and the cytotoxicity is expressed as a concentration-dependent reduction of the uptake of the vital dye. Chemicals identified as positive in this test may be phototoxic <i>in vivo</i> , following topical application or systemic application and distribution to the UV-exposed tissues.
Description	The cells are exposed to a test chemical in the presence (+Irr) (dose of 5 J/cm ² of UVA) or absence (-Irr) of UVA light, and viability is assessed 24 hours later by spectrophotometric measurement of neutral red dye uptake by the compound treated cells compared to vehicle treated controls. Chlorpromazine is used as positive control, while Earle's Balanced Salt Solution or other buffered solution may be used as negative controls. The concentration of test article causing a 50% reduction in neutral red dye uptake (IC ₅₀) reflects cytotoxic potential. The phototoxic potential is also expressed through the use of two different indices: Photoirritancy Factor (PIF) and Mean Photo Effect (MPE). The PIF is determined by comparing the IC ₅₀ +Irr to the IC ₅₀ -Irr and by definition is only useful when IC ₅₀ values can be determined both with and without UVA exposure. The MPE is determined by comparing the two concentration response curves (-Irr and +Irr) over the range of active test article doses. With respect to phototoxicity prediction on the basis of the results from 3T3 NRU PT, three cases may be considered: 1) a test article with a PIF <2 or an MPE <0.1 predicts "no phototoxicity"; 2) a test article with a PIF >2 and <5 or an MPE >0.1 and <0.15 predicts "equivocal phototoxicity"; and 3) a test article with a PIF >5 or an MPE >0.15 predicts "phototoxicity".
Scientific basis including MoA	The 3T3 NRU PT is conducted using Balb/c 3T3 mouse fibroblasts to assess the phototoxicity potential of a test article. The assay quantitatively determines the cytotoxic potential of a test article by comparing the reduction in neutral red dye uptake in Balb/c 3T3 cultures exposed to the serial dilutions of a test article, to the neutral red dye uptake in control (the test article vehicle). Phototoxins can induce cell damage through formation of ROS and other mechanisms that lead to increased permeability of the lysosomal membrane, reduction in the pH gradient, and other changes that gradually become irreversible. Such changes brought about by the action of xenobiotics result in a decreased uptake and binding of neutral red dye. It is thus possible to

	distinguish between viable and damaged or dead cells.
Protocol available	OECD TG432
Strengths and weakness	<p><u>Strengths</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - The assay quantitatively determines the cytotoxic potential of a test chemical. - High throughput assay; can screen large numbers of test chemicals for phototoxicity potential - High negative predictivity (further photosafety testing is generally not warranted for test chemicals which are not predicted to have phototoxicity potential in this test method) <p><u>Weakness</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Highly sensitive assay. Detection level is far more sensitive than the magnitude of biological effect. - In the 3T3 NRU PT, a UVA light source with filter to attenuate UVB is used since 3T3 cells are not tolerant to higher doses of UVB light, so the 3T3 NRU PT may provide false-negative prediction for chemicals predominantly or solely absorbing in the UVB range.
Applicability domain and limitations	<p><u>Applicability</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - The test method is applicable to substances and mixtures. <p><u>Limitations</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - The poorly-water soluble chemicals might be untestable. - In the 3T3 NRU PT, UVB radiation is generally attenuated since cells were killed by UVB radiation; therefore, chemicals excited by only UVB exposure produce false-negative results in the assay.
Predictive capacity	In the validation study, 20 test chemicals were selected and assessed by 3T3 NRU PT. An almost perfect correlation of <i>in vitro</i> versus <i>in vivo</i> results was obtained (between 95% and 100%), when either PIF or MPE were used to predict the phototoxic potential.
Reliability	The 3T3 NRU PT was developed and validated under the auspices of ECVAM from 1992–1997, to establish a valid <i>in vitro</i> alternative to the various <i>in vivo</i> tests in use. A second validation study was also carried out in 1997 to evaluate the method specifically in terms of selected UV filter chemicals. ESAC subsequently endorsed the validity of the test with respect to these chemicals.

(d) *in vitro* reconstructed human epidermis phototoxicity test

Regulatory use	Identification of phototoxic potential of test chemicals using reconstructed human epidermis phototoxicity test (RhE PT)
Validation & regulatory acceptance status	Validated and adopted as OECD TG498; also presented in guidance document ICH S10
Potential role in the IATA	The <i>in vitro</i> RhE PT can be used to identify the phototoxic potential of a test chemical after topical application in RhE tissues in the presence and absence of simulated sunlight. Phototoxicity potential is evaluated by the relative reduction in viability of cells exposed to the test chemical in the presence as compared to the absence of simulated sunlight. Chemicals identified as positive in this test may be phototoxic <i>in vivo</i> following topical application to the skin, eyes, and other external light-exposed epithelia. Complementary to cell monolayer phototoxicity tests, this 3-D model allows the topical application of a large panel of chemicals with different physicochemical properties as water insoluble or extreme pH values chemicals, finished products or complex formulations.
Description	Several concentrations of test chemical prepared in a solvent are applied topically to RhE tissues and incubated at standard culture conditions for 18 to 24 hours to allow penetration into the living tissue. A positive control (e.g., chlorpromazine) and appropriate solvent controls are also applied topically to RhE tissues and tested in parallel. Half of the tissues in each treatment group are irradiated with 6 J/cm ² of simulated sunlight (+Irr) while the remaining half are held at room temperature in the dark (-Irr). After a post-exposure incubation period of 18 to 24 hours, relative viability is determined in both the irradiated (+Irr) and non-irradiated (-Irr) treatment groups by measuring the enzymatic conversion of the vital dye MTT into a blue formazan salt that is measured photometrically after extraction from the tissues. Phototoxic potential can be estimated by comparing the relative reduction in viability in each irradiated treatment group to that of the equivalent non-irradiated treatment group.
Scientific basis including MoA	The test chemical is applied topically to a three-dimensional RhE tissue, composed of human-derived epidermal keratinocytes that have been cultured to form a multilayered, highly differentiated model of the human epidermis. It consists of organized basal, spinous and granular layers, and a multilayered <i>stratum corneum</i> containing intercellular lamellar lipid layers representing main lipid classes analogous to those found <i>in vivo</i> . In comparison with monolayer culture system, the organic structure (multilayered and differentiated epidermis) and the presence of barrier function (<i>stratum corneum</i>) simulate more closely the <i>in vivo</i> situation and allow topical applications of a large panel of chemicals with different physicochemical properties.

Protocol available	OECD TG498
Strengths and weakness	<p><u>Strengths</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - The RhE tissues can also tolerate UVB exposure, in comparison with monolayer culture system. - Wide variety of chemicals can be testable in RhE PT.- Can also be used to evaluate risk (e.g., NOEL/C) <p><u>Weakness</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - In some countries, validated RhE tissue models are not available. - Quality control of the RhE model is required to meet defined production release criteria, among which those for viability, barrier function and morphology.
Applicability domain and limitations	<p><u>Applicability</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - The test method is applicable to substances, complex mixture, and formulations. <p><u>Limitations</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Test chemicals with potent UV absorption in the same range as MTT formazan, or test chemicals able to directly reduce the vital dye MTT may interfere with the cell viability measurements (however can be addressed using specific controls described in the TG).
Predictive capacity	An initial test method pre-validation reported in 1999 with a sensitivity of 86.7% and specificity of 93.3% (set of 10 chemicals tested twice independently in three laboratories). Assay performance of RhE PT was further supported by follow-up studies.
Reliability	The reliability and relevance of the in vitro RhE PT was evaluated in multiple studies.

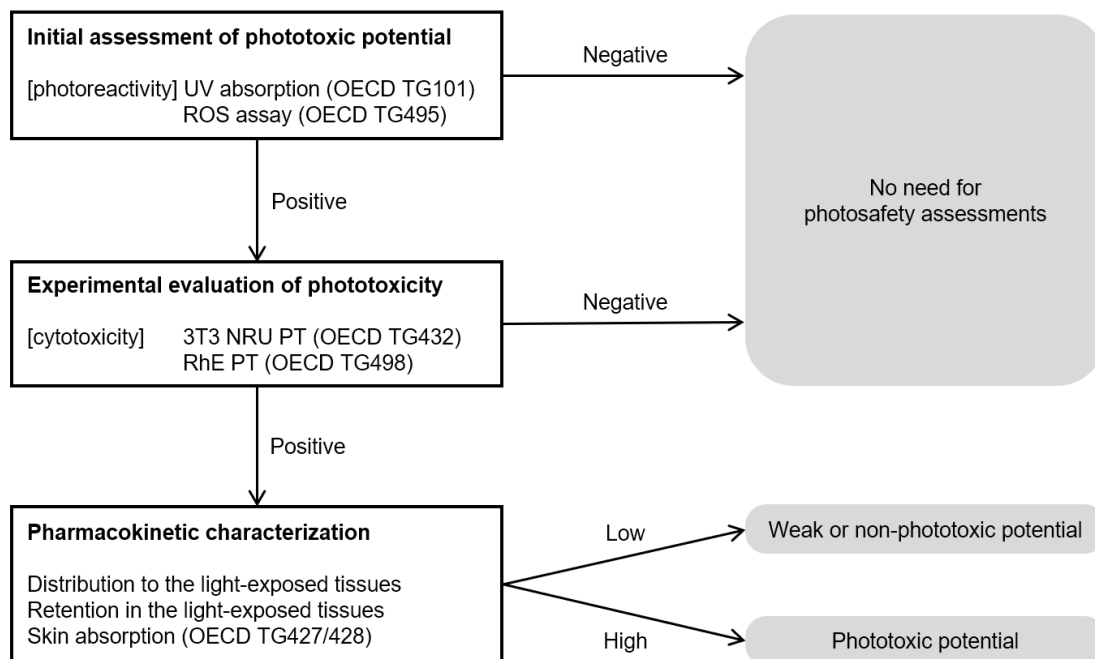


Figure 2: An example of integrated photosafety testing approach. In the 3T3 NRU PT, ‘equivocal phototoxicity’ prediction should be treated as positive.

また、これらの information sources を組み合わせた包括的光安全性評価に関して decision tree を新たに提案し、複数の評価系を組み合わせた光安全性評価の一例として IATA に記述した (Fig. 2)。

Decision tree は主に 3 つのカスケードによって構築され、(i) Initial assessment of phototoxic potential、(ii) experimental evaluation of phototoxicity、(iii) Pharmacokinetic characterization からなる。最初の光安全性評価は光化学的特性を指標としたものであり、主として UV/VIS 吸収特性や ROS assay から構築される。光安全性評価の初期段階でこれら光化学的特性を明らかにすることは ICH S10 と矛盾せず、高いスループットによって迅速に光毒性リスクを示唆することができる。これらが陰性であった場合にはそれ以降は

特に追加での光安全性評価を必要としないが、仮に光毒性リスクが疑われる結果であった場合にはフォローアップ試験として光生物学的アッセイ系によって更なる評価を行うことができる。この段階での光毒性リスク評価には 3T3 NRU PT あるいは RhE PT が用いられ、これらはより直接的な光毒性反応を示唆するものである。どちらの評価系を使用するかは特に規定しないが、被験物質の物理化学的特性や性状を考慮したうえで試験者が適切に選択することができる。このフォローアップ試験で陰性の場合には光安全性の懸念が特にないものとして判断することができる。一方、光毒性リスクが疑われる場合においては、更なるフォローアップ試験として薬物動態試験を実施し、経皮適用の場合には皮膚透過性・滞留性や蓄積性を、そして全身投

与の場合には皮膚移行性や皮膚滞留性等を精査することによって、実質的な光毒性リスクを検証することができる。ただし、体内動態に関する一定の閾値を設定することは難しく、被験物質毎に光反応性、光生物学的特性や投与量を考慮した上で適切な判断が求められ、さらに評価の妥当性については科学的合理性が許容される種々の実験データをもって評価者自身によって証明される必要がある。

D. 考察ならびに結論

信頼性の高い光安全性保障システム構築を指向して AOP ならびに IATA 作成に従事した。既に wiki に入力した AOP 案をさらに推敲し、光刺激性に関する毒性カスケードに焦点を当てたものに作り直し、外部評価に資するものに結実させた。この AOP をもとに IATA をアップデートするとともに、information sources に関する情報を多く加え、そして decision tree を新規に設定した。改訂した IATA 案はすでに専門機関内において commenting round に入ったので今後はコメントや指摘事項に対応して修正作業を行う予定である。

E. 研究発表

E-1. 論文発表

1. Ghosh A, Banik S, Suzuki Y, Mibe Y, Rikimura S, Komamoto T, Kuromi K, Yamada K, Sato H, Onoue S. Lysophosphatidylcholine-based liposome to improve oral absorption and nephroprotective effects of astaxanthin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **103(6)**: 2981–2988 (2023)
2. Ohtake H, Tokuyoshi Y, Iyama Y, Nukaga T, Nishida H, Ohtake T, Hirota M, Yamada K, Seto Y, Sato H, Kouzuki H, Onoue S. Reactive oxygen species (ROS) assay-based photosafety screening for complex ingredients: Modification of the ROS assay protocol. *Journal of Toxicological Sciences*, **47(11)**: 483–492 (2022)
3. Nakamura K, Kambayashi A, Onoue S. Quantitative assessment of disintegration rate is important for predicting the oral absorption of solid dosage forms containing poorly soluble weak base drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **180**: 23–32 (2022)
4. Halder S, Mibe Y, Rikimura S, Kuromi K, Sato H, Onoue S. Strategic application of liposomal system to R- α -lipoic acid for the improvement of nutraceutical properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **48**: 239–246 (2022)
5. Sato H, Yamane C, Higuchi K, Shindo T, Shikama H, Yamada K, Onoue S. Development of stabilized fuzapladib solution for injection: forced degradation study and pharmacokinetic evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*, **27(5)**: 565–571 (2022)
6. Banik S, Yamada K, Sato H, Onoue S. Development of poly(lipoic acid) nanoparticles with improved oral bioavailability and hepatoprotective effects of quercetin. *Molecular Pharmaceutics*, **19(5)**: 1468–1476 (2022)
7. Yamada K, Hayashi Y, Sasaki K, Higuchi K, Shindo T, Shikama H, Sato H, Onoue S. Nanocrystal solid dispersion of fuzapladib free acid with improved oral bioavailability. *Biopharmaceutics&Drug Disposition*, **43(3)**: 89–97 (2022)
8. Yamada S, Niiya R, Ito Y, Kato Y, Onoue S. Comparative characterization of β -adrenoceptors in the bladder, heart, and lungs of rats: Alterations in spontaneously hypertensive rats. *Journal of*

Pharmacological Sciences, **148(1)**: 51–55
(2022)

E-2 学会発表

1. 増井一樹, 山田幸平, 佐藤秀行, 尾上誠良「経皮適用化合物の光安全性評価:被験物質の光反応性と *in vitro* 皮膚内曝露の統合的解析」日本薬学会第 142 年会 (名古屋), 2022 年 3 月 26 日
2. 桑原菜摘, 袴田雅俊, 淺沼俊倫, 山下里恵, 山田幸平, 佐藤秀行, 尾上誠良「白びわ抽出物由来の機能性化粧品素材開発 –カフェ酸誘導体の光保護作用評価–」第 47 回日本化粧品学会 (東京), 2022 年 6 月 10 日
3. 尾上誠良「薬剤性光線過敏症のリスク回避に向けた国際ガイドラインの作成」第 8 回日本医薬品安全性学会学術大会 (オンライン), 2022 年 8 月 20–9 月 4 日
4. Satomi Onoue “Establishment and International Harmonization of Photosafety Testing Strategy (国際シンポジウム)” 日本動物実験代替法学会第 35 回大会 (静岡), 2022 年 11 月 18 日
5. 山田幸平, 上林敦, 佐藤秀行, 尾上誠良「*In silico* modeling & simulation による吸入毒性試験効率化を目指して」日本動物実験代替法学会第 35 回大会 (静岡), 2022 年 11 月 19 日

F. 知的財産権の出願・登録状況

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）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

発達神経毒性に起因する行動解析に関する情報収集

研究分担者 齊藤 洋克

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 毒性部 研究員

研究要旨

本研究は、化学物質やその混合物の安全性を評価するための国際的な合意を推進する経済協力開発機構（OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development）の試験法ガイドライン（TG: Test Guideline）プログラム各国調整官作業グループ（WNT: Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme）において、日本で開発された種々のTGやガイダンス文書（GD: Guidance Document）、毒性発現経路（AOP: Adverse Outcome Pathway）などの世界各国が必要とする成果物を公定化させるとともに、他国が提案するOECD大型プロジェクトに関与し、その成果物に日本の主張を反映させ、その成果を化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）や毒物及び劇物取締法（毒劇法）などの我が国の厚生行政に反映させることを目的とする。

分担研究として、昨年度に引き続き、これまでの国内外における発達神経毒性評価の現状について情報収集を行うとともに課題を抽出した。特に、発達神経毒性に関する文献における行動解析の利用頻度を把握するとともに、実験動物（げっ歯類）を対象とした発達神経毒性評価の現状や被験物質の種類、用いられる行動解析およびガイドラインとの関連について調査を行った。また、OECDで検討されている発達神経毒性のGDに関連する提案資料への意見募集にコメントすることにより、関連するGDの開発に寄与した。

A. 研究目的

本分担研究では、昨年度に引き続き、これまでの国内外における発達神経毒性評価の現状、特に行動解析および関連するガイドラインについて情報収集を行うとともに課題を抽出する。加えて、OECDで検討されている発達神経毒性のGDの開発に寄与することを目的とする。

情報収集を行った。発達神経毒性評価の現状についての文献調査には、医学・生物学分野の学術文献検索データベースであるPubMedおよびMEDLINEを用いた。また、収集した文献については、記載されている情報の整理を行った。

<文献検索に用いたキーワード>

mice, rats, rodents, neurodevelopmental, developmental, neurotoxicity, test guideline

B. 研究方法

B.1. 発達神経毒性評価のための行動解析に関する情報収集:

昨年度に引き続き、これまでの国内外における発達神経毒性評価の現状について情

報収集を行った。発達神経毒性評価の現状についての文献調査には、医学・生物学分野の学術文献検索データベースであるPubMedおよびMEDLINEを用いた。また、収集した文献については、記載されている情報の整理を行った。

(1) げっ歯類（マウス、ラット）を用いた

実験報告

- (2) 化学物質曝露による影響評価
- (3) 曝露時期、投与期間、用量等の実験条件や、解析に用いた行動試験の具体的な記載

B.2. OECD からの意見募集への対応：

JaCVAM 発達神経毒性 (DNT) 資料編纂委員会にオブザーバーとして参画するとともに、公定化に向けて進行中の *in vitro* DNT ガイダンス文書の提案資料に対して、OECD からの意見募集にコメントした。

(倫理面への配慮)

本研究は、動物を用いない調査研究である。

C. 研究結果

C.1. 情報収集：

文献検索の過程で、Mundy らの Review (Expanding the test set: Chemicals with potential to disrupt mammalian brain development, *Neurotoxicol. Teratol.*, 2015) をもとに、発達神経毒性に関する文献における行動解析の利用頻度を把握するため、その内容をまとめた。その結果、神経発達への影響を示すデータのある化学物質 (97 物質) において、組織学的な解析、あるいは神経化学的解析とともに、多くの文献では行動解析を採用し、それらの組み合わせにより評価していた。文献によっては行動解析が単独で用いられており、論文数に対する利用頻度は最も多かった (図 1)。

これまでガイドラインに準拠した化学物質の評価状況については、先行文献より、EPA 又は OECD TG 426 に準拠して DNT 試験が実施された農薬のうち、その試験成績が審査当局に提出されたものは、米国における 2008 年段階での承認農薬数は約 1150 有効成分、欧州においては 2020 年段階で 479 有効成分であるという情報を得

た (発達神経毒性の欧米での評価状況及び *in vitro* 発達神経毒性試験の検討状況調査) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部 2020 より)。

上記情報に加え、発達神経毒性評価に係る毒性情報として昨年度までに収集した文献 (95 報) について、被験物質の種類および行動解析の項目ごとに論文数の整理を行った。その結果、被験物質については、農薬 (16 報)、医薬品 (25 報)、産業化学物質 (52 報)、その他 (6 報) であった。行動解析の項目については、認知機能 (受動回避試験、モリス水迷路等) を用いた文献が最も多く (71 報)、次いで運動および感覚機能 (オープンフィールド試験、ロータロッド試験等) を用いたものが多かった (60 報)。上記 2 項目と比較すると数は少ないが、社会性 (超音波発声、ホームケージ、3 チャンバーテスト等) の行動解析を取り入れている文献も存在した (13 報) (図 2)。また、社会性の評価が可能な試験を取り入れている文献は、主に農薬のばく露影響を評価したものであった。これら収集した文献については、今年度追加した文献とともに順次情報の整理を行い、ガイドラインの使用実績を含め、最終年度へ向けたリスト化を行っている (計 122 報について実施中)。

C.2. OECD からの意見募集への対応：

JaCVAM 発達神経毒性資料編纂委員会オブザーバーとして委員会に参画するとともに、*in vitro* DNT ガイダンス文書 (Guidance on the Interpretation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) In-Vitro Testing Assays for Use in Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA)) に関して、再度 OECD 事務局に提出するコメント募集に応じた。昨年度と同様に、神経行動毒性の評価系、特に *in vivo* 試験を行っている立場から、本ガイドラインの改善点・

懸念点として、*in vitro* テストバッテリーにおいて観察された神経細胞の分化や神経突起の伸長への影響の生物学的な意味づけの限界、そして *in vivo* 試験において観察された行動異常との対応の限界について記載する必要性について強調した。

D. 考察

文献検索の過程で整理した、発達神経毒性に関する文献における行動解析の利用頻度から、行動解析が未だエンドポイントとしては強力なツールであり、重要な評価項目であると考えられた。また、ガイドラインに準拠した化学物質の評価状況について、先行資料から得られた情報をまとめると、既存の発達神経毒性試験は申請される有効成分において網羅的に実施されておらず、有効成分総数に対して換算すると、その実施割合は少ないことが予想された。

発達神経毒性に関して現在までに取得した文献については、OECD ガイドラインにも記載されている従来の運動機能や認知機能（特に学習・記憶）に加え、社会性（超音波発声、ホームケージ、3チャンバーテスト等）の評価を行っている文献も複数存在し、現行のガイドラインを補強する評価手法として、その重要性を示唆するものであると考えられた。そのため、昨年度および今年度追加で取得した文献情報については、ばく露時期の情報、被験物質、解析に用いる行動試験、ガイドラインへの準拠等、*in vitro* DNT ガイダンス文書への対応の参考となるような情報として提供できるようまとめる必要がある。特に、

- ・化学物質の種類による影響の差異（各行動試験の検出感度、共通性の抽出）
- ・新たな評価指標の把握（ガイドラインの補強）

に着目して整理する必要がある。

OECD からの意見募集（*in vitro* DNT ガイダンス文書）に関しては、前回のコメント募集の際に主張した本ガイダンスの改善点・懸念点について、記載の反映や改善がなされている箇所が多数見受けられた。一方で、現行の *in vivo* 試験との対応や、解決すべき課題についての記載については未だ不十分な部分があると考えられた。*in vivo* 試験と *in vitro* 試験で行われる評価手法と得られる結果のブリッジングについては、さらに議論を深める必要があることを強調する必要がある。

E. 結論

現在までの文献調査から、行動解析が未だエンドポイントとして重要な評価項目であることが考えられたが、現行の発達神経毒性試験について、その実施割合や関連ガイドラインへの準拠数を考えると、化学物質の潜在的な影響を検出するため、現行の発達神経毒性ガイドラインを用いることに課題が多いことが見受けられた。本研究で得られた発達神経毒性の文献情報や、OECD からの提案資料に対するコメント募集への参画による、国際貢献を通して得られた情報は、今後も OECD プロジェクトに日本の意見や結果を反映させるために重要であり、引き続き厚生労働行政に活用できるよう調査を進めていく必要があると考えられる。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. 高橋 祐次、齊藤 洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡：加圧式定量噴霧式吸入器（pMDI）製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発, *Jpn J Clin Toxicol.* 35, 255-59, 2022

2. Hirokatsu Saito*, Kentaro Tanemura*, Yusuke Furukawa, Takahiro Sasaki, Jun Kanno, Satoshi Kitajima (*co-first author): Behavioral effects induced by the oral administration of acetaminophen in male mice during the postnatal lactation period or adulthood. *J Toxicol Sci.* 48(4), 203-10, 2023
3. Takahiro Sasaki*, Hirokatsu Saito*, Yusuke Furukawa, Takashi Tominaga, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Kentaro Tanemura (*co-first author): Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice. *J Toxicol Sci.* 48(4), 211-19, 2023

フォーラム (2022.8.26、東京)

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

F-2 学会発表

1. 齊藤 洋克、種村 健太郎、菅野 純、北嶋 聡：アセフェート単回経口投与による雄マウスの情動認知行動解析-化学物質曝露影響から考える神経発達障害-、第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1、札幌)
2. 五十嵐 智女、松村 万里、小川 いつみ、矢川 千織、早川 孝彦、越智 美代子、齊藤 洋克、栗形 麻樹子、北嶋 聡：「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較、第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1、札幌)
3. 横田 理、齊藤 洋克、若山 友彦、北嶋 聡：ビタミンA過剰マウス精上皮周期に着目した精巣毒性評価法の開発、第62回日本先天異常学会学術集会 (2022.7.29、金沢)
4. 齊藤 洋克、菅 康佑、横田 理、阿部 裕、片岡 洋平、六鹿 元雄、種村 健太郎、北嶋 聡：キシレンの吸入曝露によるマウス行動影響解析、第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンス

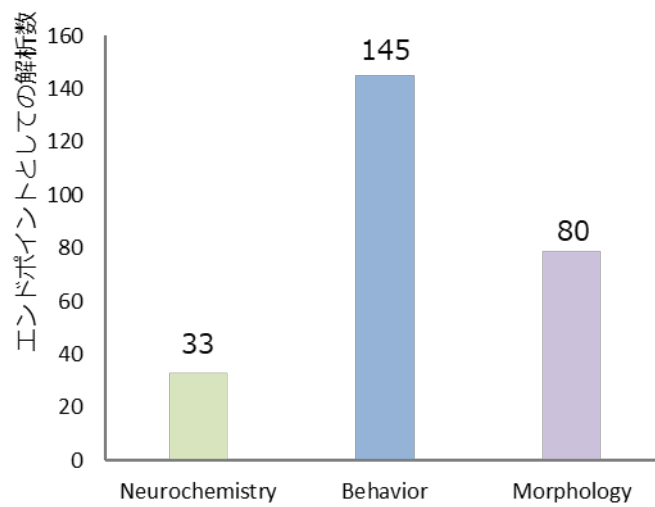


図1. 発達神経毒性に関する文献での行動解析の利用頻度 (Mundy et al., 2015 より)

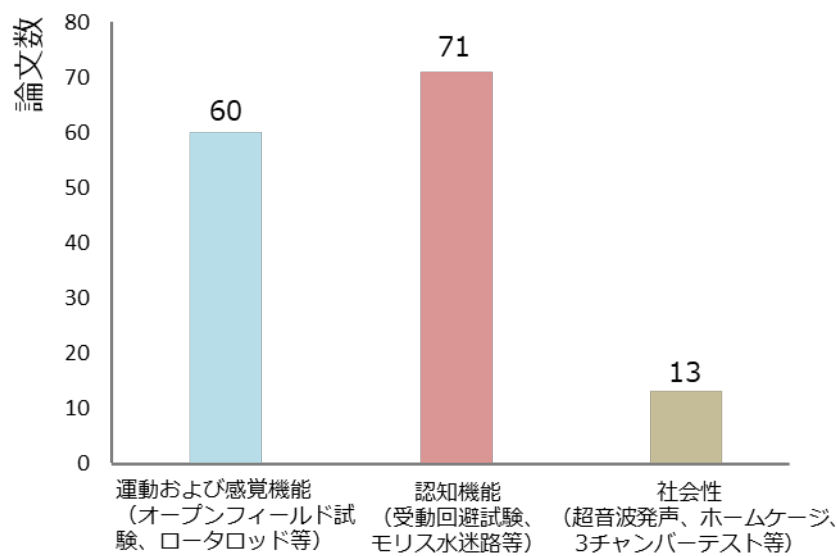


図2. 収集した発達神経毒性評価に係る文献における各行動解析項目を用いた文献数

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

腎障害・線維化の分子メカニズムに関する研究

研究分担者 松下 幸平

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 主任研究官

研究要旨

腎障害が生じた後に尿細管の再生異常が生じた場合、線維化を伴う不可逆的な慢性腎臓病へと移行する。我々はこれまで再生異常の生じた尿細管には CD44 が発現することを明らかにしており、尿細管の再生異常を Key Event、CD44 を測定可能なエンドポイントとした腎障害・腎線維化の AOP 作製に資するデータを得ることを目的として研究を進めている。本年度はアロプリノール（APL）誘発腎線維化モデルラットを用いて CD44 の役割及びバイオマーカーとしての可能性を検証した。

6週齢の雄性 SD ラットに 0、100 及び 150 mg/kg の APL を 28 日間反復強制経口投与した。100 及び 150 mg/kg 群において腎線維化が認められ、線維化病変の尿細管は拡張あるいは萎縮していた。免疫染色にて拡張/萎縮尿細管は CD44 に陽性を示し、近位尿細管の分化マーカーの発現減少及び間葉系マーカーの発現が認められ、基底膜に囲まれていた。拡張/萎縮尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取してマイクロアレイを行い、パスウェイ解析を実施した結果、CD44 は fibronectin 1 (*Fnl*) を含む線維化関連遺伝子の上流因子として抽出された。*in situ hybridization* では *Fnl* mRNA は拡張/萎縮尿細管の細胞質に確認されたが、免疫染色において fibronectin はこれらの尿細管の周囲間質に認められた。また APL 投与群では尿及び血清中の CD44 発現が上昇していた。

尿細管が基底膜に接着した状態で間葉系の表現型を獲得する現象を部分的上皮間葉転換 (pEMT) という。本実験結果から CD44 は pEMT の生じた尿細管において細胞外基質の分泌を誘導すると考えられた。また CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。これらの結果は尿細管の再生異常を Key Event とした腎障害・腎線維化の AOP における CD44 の測定項目としての妥当性を支持するものと考えられた。

A. 研究目的

腎障害が生じた後に尿細管の再生異常が生じた場合、線維化を伴う不可逆的な慢性腎臓病へと移行する。我々はこれまで尿細管の再生異常を Key Event とした腎障害・腎線維化の AOP 作製に資するデータ

を得ることを目的とし、研究を行ってきた。そのなかで、腎虚血再灌流障害モデルラットの腎臓では再生異常の生じた尿細管において CD44 が発現している可能性を明らかにした（厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）OECD プ

ログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究)。この結果から、CD44 を測定可能なエンドポイントとした AOP 開発の可能性を見出した。

昨年度は再生異常の生じた尿細管において発現する CD44 のエンドポイントとしての汎用性を検証するため、障害機序の異なる 3 種類の腎障害物質を用いて腎障害・腎線維化モデルラットを作製し、CD44 の発現を検索した。本年度はそのなかで強い線維化を誘発することのできたアロプリノール (APL) 誘発腎線維化モデルラットを用いて CD44 の役割及びバイオマーカーとしての可能性を検証した。

B. 研究方法

昨年度に実施した動物実験により得られた腎臓、血清及び尿サンプルを用いて解析を行った。その動物実験の概要及び解析方法を以下に示す。6 週齢の雄性 SD ラットを 3 群に配し (n=5)、媒体である 0.5%メチルセルロースもしくは APL を 100 及び 150 mg/kg の用量で 28 日間反復強制経口投与した。最終投与日に全例を代謝ケージに移し、解析用サンプルとして 4 時間採尿した後、さらに 20 時間採尿して尿量を測定した。最終投与 1 日後にイソフルラン深麻酔下において腹大動脈から採血した後、放血により安楽死させて剖検を行った。得られた血液サンプルを常温下で遠心して血清を分離した。剖検時に腎臓の一部を 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、残りの組織は液体窒素にて瞬間凍結もしくは OCT コンパウンドにて凍結ブロックを作製して、-80°Cにて保存した。

全群について 10%中性緩衝ホルマリンで固定した腎臓組織を用いて定法に従いパラフィン包埋、薄切 (4 µm) し、HE 染色及び膠原線維を赤色に染色するシリウス

レッド染色を施して病理組織学的検索を行った。免疫組織学的解析により CD44、 α -smooth muscle actin (α SMA)、aquaporin1 (AQP1)、N-cadherin、vimentin、collagen type IV、nidogen-1 及び fibronectin の発現を解析した。また CD44 と各種因子の局在を解析するため二重蛍光免疫染色を行った。同一宿主の 2 種類の抗体を用いる場合は、チラミッドシグナル増幅法により染色を実施した。さらに fibronectin1 (*Fnl*) の mRNA の局在を *in situ* hybridization 法により解析した。

また対照群及び 30 mg/kg 群の凍結ブロックを薄切 (16 µm) し、on ice で迅速 HE 染色を施した。対照群の正常尿細管及び 30 mg/kg の線維化病変内の尿細管をレーザーマイクロダイセクションにより採取した。得られたサンプルから total RNA を抽出して増幅処置を行い、マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析した。正常尿細管と比較して 30 mg/kg 群の線維化病変内の尿細管において発現の変動していた遺伝子群を抽出し、Gene ontology (GO) 解析及び Ingenuity® Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行った。

尿中タンパクを精製及び濃縮した後、ウエスタンブロッティング法により CD44 発現を解析した。また ELISA 法により血清中 CD44 値を測定した。また瞬間凍結した腎臓組織から total RNA を抽出し、total CD44 及び CD44 standard isoform に対するプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、遺伝子発現量を解析した。

統計学的解析として、各データについて一元配置分散分析 (ANOVA) を実施した後、Dunnett 法による多重検定を行った。また 2 つの因子の相関関係を解析するためスピアマンの順位相関係数を求めた。有意水準は 0.05 に設定した。

(倫理面への配慮)

動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の実験動物取扱い規定に基づき、動物の苦痛を最小限とするよう配慮して行った。

C. 研究結果

シリウスレッド染色及び α SMA 免疫染色では、それぞれの陽性面積が APL 投与群では対照群と比較して有意に増加していた (図 1A 及び B)。HE 染色標本を用いた病理組織学的解析において、APL 投与群における線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮していた。免疫組織学的解析ではこれらの尿細管は CD44 に陽性を示し、APL 投与群の CD44 陽性尿細管は対照群と比較して有意に増加していた (図 1C)。また、CD44 陽性尿細管の数はシリウスレッド陽性面積及び α SMA 陽性面積と正の相関を示した (図 1D 及び E)。蛍光二重免疫染色では、APL 投与群において CD44 陽性尿細管の周囲に α SMA 陽性反応が確認された。

マイクロアレイでは、正常尿細管と比較して拡張/萎縮尿細管では 1462 遺伝子の発現が上昇しており、1484 遺伝子の発現が低下していた。GO 解析では、拡張/萎縮尿細管において細胞外基質に関連する遺伝子群の発現が上昇しており、トランスポーター及び代謝といった尿細管の分化に関わる遺伝子群の発現が低下していた (図 2A)。パスウェイ解析では、CD44 は fibronectin の産生に関わる *Fnl* を含む線維化関連遺伝子群の発現を誘導していることが示された (図 2B)。

免疫染色により尿細管の分化マーカーの発現を検索した結果、拡張/萎縮尿細管では AQP1 及び N-cadherin の発現が減弱あるいは消失しており、これらの因子に陽性を

示す尿細管の数は APL 投与群において対照群と比較して有意に減少していた (図 3A 及び B)。また AQP1 及び N-cadherin に陽性を示す尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と負の相関を示した (図 3C 及び D)。蛍光二重免疫染色では、CD44 は AQP1 及び N-cadherin と排他的な発現を示した。間葉系マーカーの検索では、拡張/萎縮尿細管は vimentin 及び α SMA に陽性を示し、それぞれの陽性尿細管の数は APL 投与群において対照群と比較して有意に増加していた (図 4A 及び B)。また vimentin 及び α SMA に陽性を示す尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と正の相関を示した (図 4C 及び D)。蛍光二重免疫染色では、CD44 は vimentin 及び α SMA と同一の尿細管において発現していた。一方、基底膜マーカーである collagen type IV 及び nidogen-1 の免疫染色では、CD44 陽性を示す拡張/萎縮尿細管の周囲に軽度に肥厚した基底膜を認めた。

Fibronectin の免疫染色では拡張/萎縮尿細管の周囲間質に陽性反応が認められた。Fibronectin 陽性面積は APL 投与群において対照群と比較して有意に増加しており、CD44 陽性尿細管の数と正の相関を示した (図 5A 及び B)。蛍光二重免疫染色では、CD44 陽性尿細管の周囲に fibronectin の陽性反応が認められた。一方 *in situ* hybridization において、*Fnl* mRNA の発現は間質の線維芽細胞に加えて APL 投与群の拡張/萎縮尿細管においても認められた。

ウエスタンブロッティング法による CD44 の発現解析では、腎臓組織中及び尿中に CD44 特異的なバンドが確認された (図 6A 及び B)。APL 投与群では対照群と比較して尿量の有意な増加を認めたことから (図 6C)、尿の濃縮は生じていないと考えられた。また ELISA 法による解析では、血清中 CD44 値が APL 投与群において

対照群と比較して有意に増加しており、血清中 CD44 値は腎臓における CD44 陽性尿細管数及びシリウスレッド陽性面積と正の相関を示した (図 6D、E 及び F)。また定量 PCR により APL 投与群では CD44 standard isoform が高発現していることが示された (図 6G 及び H)。

D. 考察

APL 投与群の線維化病変内の尿細管は拡張あるいは萎縮しており、CD44 に陽性を示した。この結果は我々の腎虚血再灌流障害モデルラットを用いた先行研究と一致しており (Matsushita et al., *J Appl Toxicol*, 2021)、CD44 は再生異常の生じた尿細管に発現するという仮説を支持するものと考えられた。

CD44 の機能の一端を明らかにする目的でマイクロアレイを実施した。その結果、GO 解析では拡張/萎縮尿細管は間葉系の表現型を獲得していることが示唆され、またパスウェイ解析では CD44 はこれらの尿細管において線維化に関連する遺伝子群の発現を誘導していることが示された。間葉系の表現型に関する因子をさらに詳細に検索するため、免疫染色及び *in situ* hybridization を実施した。その結果、APL 投与群の CD44 陽性を示す拡張/萎縮尿細管では近位尿細管の分化マーカーである AQP1 及び N-cadherin の発現が低下しており、間葉系マーカーである vimentin 及び α SMA の発現が認められた。また *Fnl* の mRNA 発現は拡張/萎縮尿細管において亢進していたことに対し、fibronectin はこれらの尿細管周囲の間質に認められた。よって、拡張/萎縮尿細管は fibronectin を分泌しているものと考えられた。一方、CD44 陽性尿細管の周囲には明瞭な基底膜が観察された。

これまで上皮間葉転換 (EMT) の生じた尿細管は間質に遊走して筋線維芽細胞に分化すると考えられてきた。一方、近年の研究により尿細管が基底膜に接着した状態で間葉系の表現型を獲得する現象が明らかとなり、部分的上皮間葉転換 (pEMT) という新しい概念が提唱されるようになった。本実験結果から、CD44 は pEMT の生じた尿細管に発現し、細胞外基質の産生を誘導して腎線維化に寄与するものと考えられた。

ウエスタンブロッティング法及び ELISA の結果、APL 投与群の尿および血清中からも CD44 が検出された。定量 PCR の結果、腎臓に発現する CD44 は standard isoform であることが示された。CD44 standard isoform の分子量は約 82 kDa であるため、定量 PCR の結果はウエスタンブロッティング法により検出されたバンドの特異性を支持するものと考えられた。以上より、CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

今後は引き続き CD44 の機能解析およびバイオマーカーとしての可能性を検証するため、シクロスポリンによる腎線維化モデルラットの作製し、解析を進める予定である。

E. 結論

本研究により CD44 の腎線維化における役割の一端を明らかにすることができ、さらに腎線維化のバイオマーカーとなる可能性を示した。本結果は腎障害・腎線維化の AOP における尿細管の再生異常等の Key Event に対する CD44 の測定項目としての妥当性を支持するものと考えられた。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats. *Food Chem Toxicol*. In press.
2. Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci*. 2022; 47: 457-466.
3. Yamada T, Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Cho YM, Ogawa K. Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci*. 2022; 189: 51-61.
4. Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kijima A, Nohmi T, Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in *gpt* delta rats. *Food Chem Toxicol*. 2022; 168: 113365.
5. Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from o-toluidine and o-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci*. 2022; 47: 457-466.

F-2 学会発表

1. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. AKI から CKD への移行における CD44 の役割とバイオマーカーとしての応用, 第 65 回日本腎臓学会学術総会 (2022.6.1, 神戸)
2. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いた尿中 CD44 の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
3. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子. 甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
4. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX を指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
5. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索, 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26, 東京)
6. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 薬剤性腎障害の慢性化病変における CD44 陽性尿細管の病態生理学的意義, 第 5 回医薬品毒性機序研究会 (2022.12.8, 東京)
7. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割と CD44 との関連. 第 39 回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
8. 水田保子, 赤木純一, 赤根弘敏, 松下幸平, 豊田武士, 小川久美子. デキストラ

ン硫酸ナトリウム誘発ラット腸炎モデルにおけるナノポリスチレンの 28 日間反復経口投与毒性試験. 第 39 回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)

9. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX 免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発. 第 39 回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
10. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子. ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較. 第 39 回日本毒性病理学会学術集会 (2023.1.25, 東京)
11. 松下幸平. 薬剤性腎障害の可逆性を予測する新規バイオマーカーの探索. 日本薬学会第 143 年会. (2023.3.26, 札幌)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

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

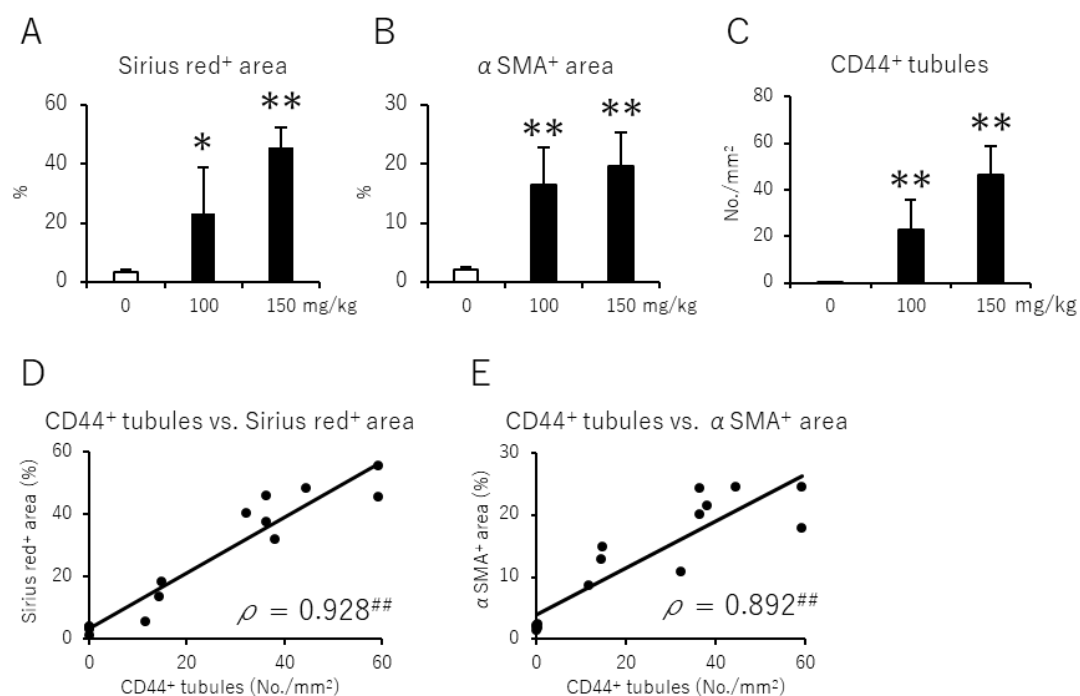


図1. **A**: シリウスレッド染色陽性面積. **B**: α-smooth muscle actin (αSMA) 陽性面積. **C**: CD44陽性尿細管数. **D**: CD44陽性尿細管数及びシリウスレッド染色陽性面積の相関. **E**: CD44陽性尿細管数及びαSMA陽性面積の相関. *, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 mg/kg. ##: $p < 0.01$.

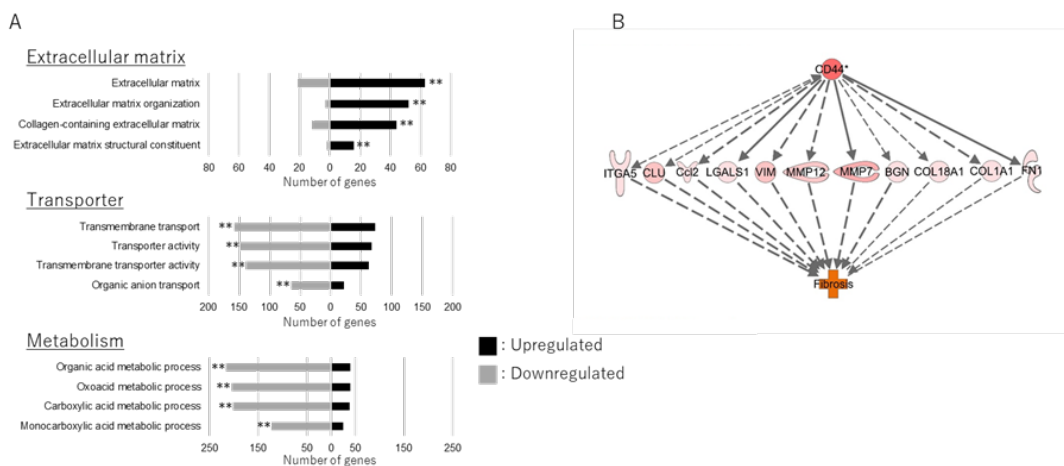


図2. マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析. **A**: Gene Ontology解析. **B**: Ingenuity Pathway Analysis. **: corrected $p < 0.01$ vs. normal tubule.

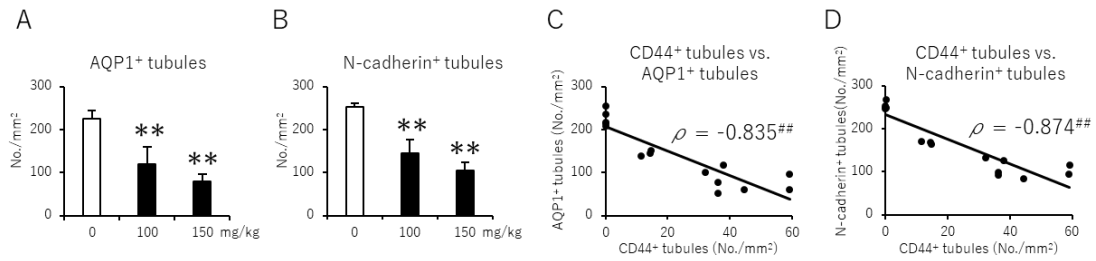


図3. **A:** Aquaporin-1 (AQP1) 陽性尿細管数. **B:** N-cadherin陽性尿細管数. **C:** CD44及びAQP1陽性尿細管数の相関. **D:** CD44及びN-cadherin陽性尿細管数の相関. **: $p < 0.01$ vs. 0 mg/kg. ##: $p < 0.01$.

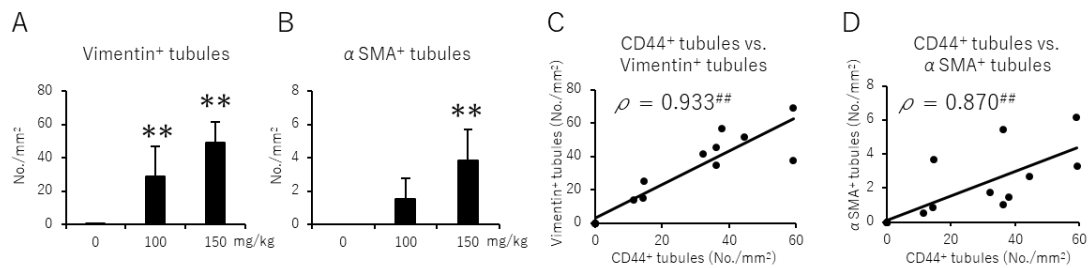


図4. **A:** Vimentin陽性尿細管数. **B:** α -smooth muscle actin (α SMA) 陽性尿細管数. **C:** CD44及びvimentin陽性尿細管数. **D:** CD44及び α SMA陽性尿細管数. **: $p < 0.01$ vs. 0 mg/kg. ##: $p < 0.01$.

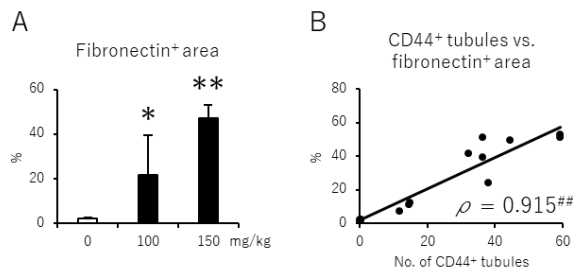


図5. **A:** Fibronectin陽性面積. **B:** CD44陽性尿細管数及びfibronectin陽性面積の相関. *, **: $p < 0.05, 0.01$ vs. 0 mg/kg. ##: $p < 0.01$.

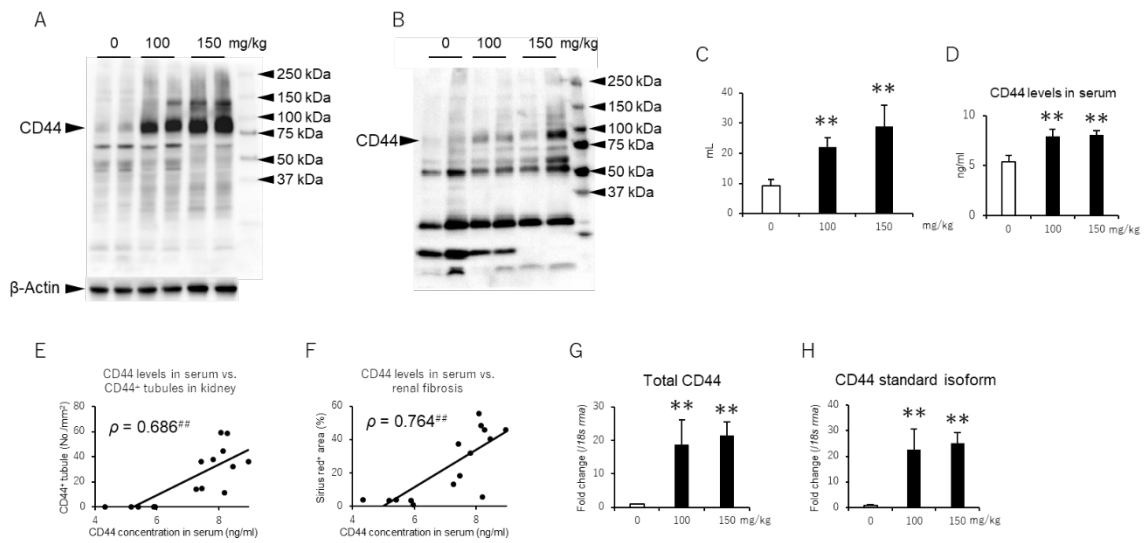


図6. 腎臓組織中 (A) 及び尿中 (B) CD44発現. C: 尿量. D: 血清中CD44値. E: 血清中CD44値及び腎臓におけるCD44陽性尿細管数の相関. F: 血清中CD44値及び腎線維化面積の相関. Total CD44 (G) 及びCD44 standard isoform (H) の遺伝子発現解析. **: $p < 0.01$ vs. 0 mg/kg. ##: $p < 0.01$.

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

令和4年度 分担研究報告書

毒性等情報収集調査

研究分担者 山田隆志

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部 室長

研究協力者 丸山多恵子

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 安全性予測評価部

研究要旨

近年 OECD では、AOP (Adverse Outcome Pathway) に基づいて *in silico*、*in vitro*、*in vivo* の情報を組み合わせて化学物質の有害性を評価する Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) および Defined Approach (DA) の開発が進められている。厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業においては化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究および化学物質の新たなリスク評価手法の開発に関する研究が進められており、その成果を十分に利活用するためには、世界的な IATA の進展やこれまでに蓄積された知見を考慮した上で、国内の状況に即した形で AOP の開発や代替試験法の公定化、IATA のコンセプトに基づいた化学物質のリスク評価の促進、規制・ガイドラインの新設や見直し等に反映させていくことが求められる。そのためには、AOP 情報を規制判断の支援や評価・試験の戦略を立てることが望まれるところである。そこで本研究では、OECD IATA Case Studies Project を対象に AOP を用いた IATA 実践例を調査し、今後の研究開発や行政導入の参考情報とするために、得られた知見を4点に整理した。

A. 研究目的

AOP は、既存の知見を基に、標的となる生体内分子への作用である Molecular initiating event (MIE) から始まり、そこから引き続く、いくつかの主要なイベント Key event (KE) を介して、最終的な有害影響である有害性発現 (Adverse outcome, AO) に至る因果関係を示す経路を記述したものである。

近年 OECD では AOP に基づいて *in silico*、*in vitro*、*in vivo* の情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する統合的アプローチ (IATA) の開発が進められている。その

ワークフローは、以下のように整理される。

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

IATA 実施において、AOP は種々の情報の因果関係を明確化し、結論の導出に必要な情報の同定に役立つと期待されている。

さらに OECD では、より透明性と客観性が高く標準化された IATA を構築することを目的として確定的アプローチ (DA) の検討が進められている。DA に必要なデータやその重みづけをサポートするのが AOP であると考えられている。

国際的には、IATA や DA の行政的な実運用へ向けて、種々のケーススタディを実施して、得られた経験・教訓を整理してガイドランスの開発が進められている。今後は、動物実験への依存度を軽減しつつ、化学物質が発現しうるヒトへの毒性を効率的かつ高精度で予測するために、IATA や DA に基づいてヒト健康リスク評価のストラテジーを進化させる必要がある。厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業では、化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究、新たなリスク評価手法の開発に関する研究を推進し、成果をあげてきた。今後、これらの成果を十分に利活用するためには、世界的な IATA の進展やこれまでに蓄積された知見を考慮した上で、国内の状況に即した形で、AOP の開発や代替試験法の公定化、IATA のコンセプトに基づいた化学物質のリスク評価の促進、規制・ガイドラインの新設や見直し、さらには日常生活に利用される種々の化学物質のリスク評価等に反映させていくことが求められる。そのためには、規制判断の支援や評価・試験の戦略を立てることが望まれるところである。

そこで、本研究では、OECD で実施されている IATA のケーススタディを調査することで、AOP を活用した IATA の方法論について知見を収集、整理し、IATA のコンセプトに基づいた安全性評価・審議の支援、評価・試験戦略の策定に必要な情報収集の効率化や AOP 開発に役立てることを目的とする。

B. 研究方法

B-1. OECD IATA Case Studies Project ケーススタディの調査

OECD IATA Case Studies Project における事例研究の公開資料^{*1} から、幾つかを題材として、AOP の IATA への活用に関する調査を行った。提出されたケーススタディと、対応するレビューコメントの内容を対象とした。

^{*1}<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>

2019 年に提出されたケーススタディ「AOP に基づく *in vitro* 試験とリードアクロスによるデグエリンのパーキンソン病リスクの評価」、「ミトコンドリア複合体 III を介したアゾキシストロビンの神経毒性 - 他のストロビルリンによるリードアクロス」、2019-4: 「IATA を用いて p-アルキルフェノールのリードアクロスに情報を提供：反復投与毒性」、2018 年に提出された「エストロゲン受容体活性物質のスクリーニングのための IATA に関するケーススタディ」の計 4 件のケーススタディを対象に調査を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果および考察

C-1. AOP ネットワークを用いた IATA の実例と課題

OECD IATA Case Studies Project では、AOP を全身毒性評価の IATA へ活用した事例の提案が増えつつある。AOP は、リードアクロスなどに毒性機序に基づく類似性仮説の構築に有用であることは、広く認識されている。AOP を構成する Molecular

initiating event (MIE) や各 Key event (KE) を測定する *in vitro* 試験は、毒性予測の不確実性を減少させ、信頼性を高める上で有効であると考えられている。

本年は4件のケーススタディについて調査した。

ケーススタディ「AOPに基づく *in vitro* 試験とリードアクロスによるデグエリンのパーキンソン病リスクの評価」は、OECDに登録、公開されているAOP (No.7, 2018, doi: 10.1787/b46c3c00-en) に基づき、ミトコンドリア阻害剤であるデグエリンについて、類似物質ロテノン参照したアナログアプローチによるリードアクロスで、パーキンソン病リスクを評価している (図1)。このケーススタディのレビューにおける評価は総じて高かった。AOPの多くのKEに対応する試験系を用い、多様な側面から一貫性があり不確実性を低減するエビデンスを提示した。

ケーススタディ「ミトコンドリア複合体IIIを介したアゾキシストロビンの神経毒性 - 他のストロビルリンによるリードアクロス」は、ミトコンドリア阻害剤アゾキシストロビンについて、トキシコフォアが共通する複数のストロビルリン系物質が神経毒性を示さないことから、リードアクロスにより、アゾキシストロビンも神経毒性がないという評価を導出した。レビューにおいては、実際の規制上、試験免除に足るかという点では否定的ではあったものの、曝露量に焦点を置いたことや丁寧な議論が評価された。優先順位を下げるためにリードアクロスを用いる点も興味深い。

「IATAを用いて p-アルキルフェノールのリードアクロスに情報を提供：反復投与毒性」は日本から提出されたケーススタディで、p-アルキルフェノール類の反復投与毒性について、反応性代謝物の生成に側鎖

の反応性や構造的な高さが影響するという仮説に基づき、肝毒性を示すNOAEL値の推定を行った。代謝物生成の有無によるカテゴリー分けに基づき、定量的な結論を導出した点が興味深い。

2018年に提出されたケーススタディ「エストロゲン受容体活性物質のスクリーニングのためのIATAに関するケーススタディ」は、近年、特に米国が重視している内分泌かく乱物質のDAによるスクリーニング系を開発したものである (図2)。約1,800の物質を使用し、84-93%の精度が実現できた。各KEについて、対応する複数のアッセイ候補から選択でき、自由度や適用領域が広い点、また、精度の高さ、簡便で専門知識が不要なDAである点などが評価された。特定のOECD試験ガイドラインを代替するものとして開発したという点も興味深い。

以上の事例から、得られた知見を以下に整理する。

- (1) AOPにおけるすべてのKEを *in vitro* や *in silico* で評価することは難しいものの、重要度の高いKEを同定し、それらを複数統合して最終的な評価を導くことと、重要度の低いKEについてその根拠を説明できることにより、KEの選択による不確実性を低減できると考えられる。
- (2) AOPに基づきリードアクロスを実施する場合、標的物質と参照物質の各KEでの応答に一貫性があり、類似性が認められる場合には信頼性が高いといえる。
- (3) また、AOPが不完全であっても、代謝物生成など特定のKEの毒性発現への寄与度が高い場合には、限られたKEのデータからの評価が可能と捉え

られたことは、実際的な評価の方向性に示唆を与えるものである。

- (4) 毒性発現の経路は複数ある可能性があるので、陽性の評価は単一の AOP から下すことができるが、陽性の強弱や陰性については、一つの AOP だけでは証明に不十分であることは注意すべき点である。

AOP を IATA に活用していくためには、上記を含む様々な経験や情報を関係者が共有することが有用である。AOP の研究は日々進められており、IATA への活用事例も蓄積されつつある。これらの情報は、わが国における評価手法の実用化に貢献することと期待している。今後も IATA Case Studies Project のさまざまな事例の調査を進め、AOP による毒性評価の優位性や課題、ノウハウを明らかにしていく。

D. 結論

OECD IATA Case Studies Project から、AOP を用いたケーススタディを取り上げ、その優位性や課題を整理した。この成果は、AOP の確立と AOP を用いた毒性評価の行政導入の検討に資するものであると期待している。

E. 研究発表

E-1. 論文発表

1. Murayama N, Yamada T, Yamazoe Y. Application of CYP1A2-Template system to understand metabolic processes in the safety assessment. *Food Safety*. 10(4), 129-139, 2022.
2. Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Miura M, Ohata H, Katsutani K, Matsumoto M, Hirose A. Formation and evaluation of mechanism-based chemical categories for regulatory read-across assessment of repeated-dose toxicity: a case of

hemolytic anemia. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 136, 105275, 2022.

3. Yamada T, Katsutani K, Maruyama T, Kawamura T, Yamazaki H, Murayama N, Tong W, Yamazoe Y, Hirose A, Combined risk assessment of food-derived coumarin with *in silico* approaches. *Food Safety*. 10(3), 73-82, 2022.
4. 山田 隆志 : Cefic LRI/ILSI Europe Joint Workshop での Carcinogen Dose Response Database for Threshold of Toxicological Concern (TTC) の概要ならびに TTC に関する近年の国際動向. *イルシー*. 150, 4-12, 2022.
5. Murata Y, Umamo T, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Masumura K, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VIII) *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 140, 54-60, 2022

E-2 学会発表

1. Yamada T, Meiseki Y, Watanabe-Matsumoto S, Yamamoto S, Katsutani N, Yoshida K, Constructing a database of parameters for physiologically based kinetic modeling to predict toxicokinetics of inhalation exposure to industrial chemicals, Society of Toxicology 62nd Annual Meeting (2023.3.21, Nashville)
2. 山田 隆志 : 次世代リスクアセスメント (NGRA) のケーススタディの開発と行政受入へ向けた考慮事項, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.20, 静岡)
3. 山田 隆志, 辻井 伸治, 三浦 稔, 齊藤 亮子, 川村 智子, 丸山 多恵子, 勝谷 成男, 広瀬 明彦 : IATA による化学物質の神経毒性評価を補完する *in silico* アプローチ : 神経毒性に関連する部分構造と物理化学的および生化学的パラメータを用い

たカテゴリーの精緻化, 日本動物実験代替法学会第35回大会 (2022.11.19, 静岡)

4. Yamada T, Tsujii S, Miura M, Saito A, Kawamura T, Maruyama T, Katsutani N, Hirose A, *In silico* approach that supports neurotoxicity assessment of chemical substances by IATA: Refining categories by using substructures and physicochemical and biochemical parameters related to neurotoxicity, 11th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (2022.10.20, Chapel Hill)
5. 山田 隆志: ヒト用医薬品の環境リスク評価を支援する生態毒性データベースと予測の不確実性を考慮した*in silico* アプローチの開発, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
6. 山田 隆志, 勝谷 成男, 丸山 多恵子, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦: ピロリジジナルカロイドの肝毒性評価への New Approach Method (NAM) の適用, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
7. 勝谷 成男, 山田 隆志, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦: 食品中に含まれるクマリンの肝毒性リスク評価についての *in silico* アプローチ, 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)

E-3 シンポジウム/講習会/Work Group での発表

1. 山田 隆志: ヒト健康影響に係る化学物質安全性データベースの開発および情報科学技術の導入によるリスク評価の迅速化へ向けた課題. 化学物質の安全管理に関するシンポジウム—Society 5.0 実現に向けた化学物質管理に係るデータ利活用の推進—, 化学物質の安全管理に関するシ

ンポジウム実行委員会主催, 内閣府等共催 (2022.12.21, Online)

2. Yamada T, Maruyama-Komoda T, Furuhama A. QSAR evaluation trial based on the checklist -Case study on prediction of Ames mutagenicity using two QSAR models-, OECD Meeting of the QSAR Assessment Framework Working Group (2022.11.15, Paris)
3. 山田 隆志: ヒト健康影響に関連した QSAR とリードアクロス. 令和 4 年度 QSAR/リードアクロス講習会, 独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター主催, 環境省 大臣官房環境保健部後援 (2022.10.17, Online)
4. Yamada T, Read-across case studies for repeated-dose toxicity of chemicals: Lessons learned from the OECD IATA Case Studies Project. The 9th European Food Safety Authority (EFSA) Read-across Work Group Meeting. (2022.9.28, Parma-Online Hybrid)

F. 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

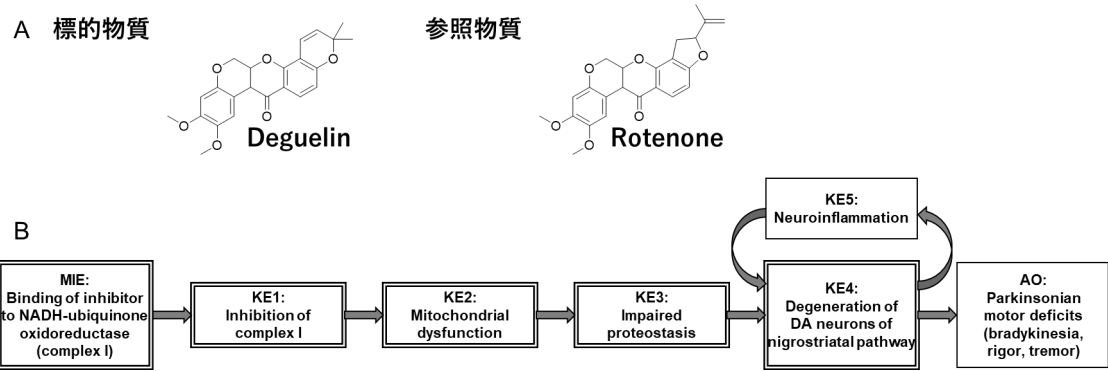


図1 パーキンソン病に繋がるミトコンドリア複合体I阻害に関するAOP
 A. 標的物質と参照物質。 B. AOP。 二重線：ケーススタディ内で評価を行ったイベント、
 一重線：評価を行わなかったイベント。

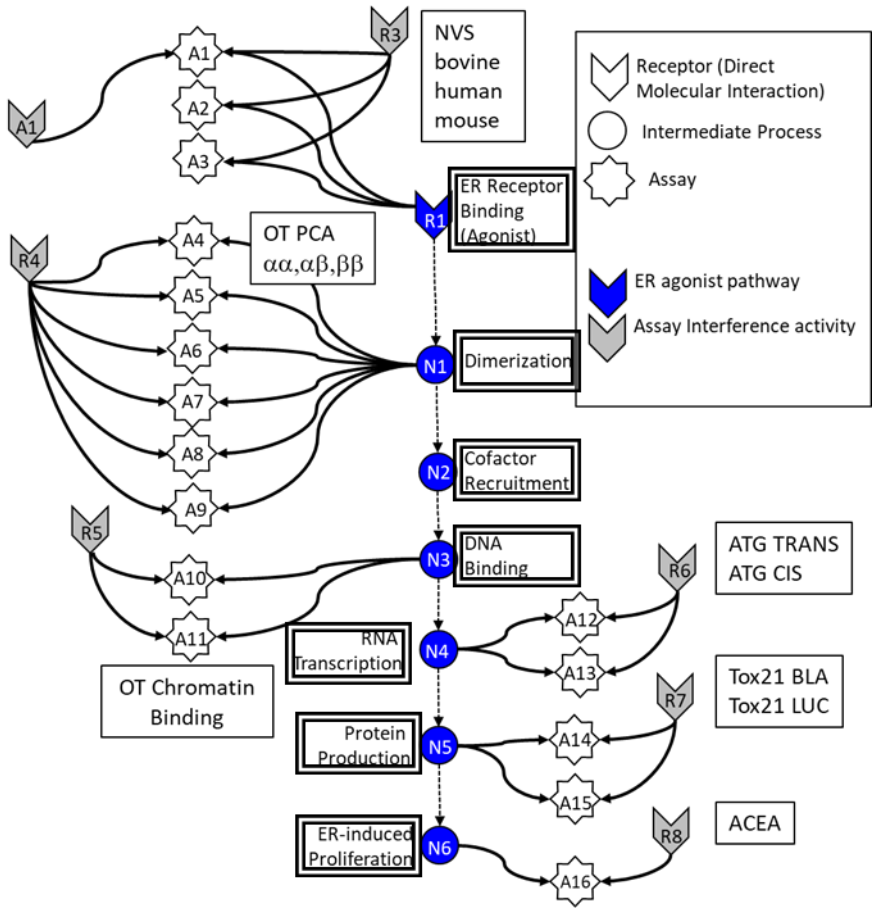


図2 AOPに基づくエストロゲン受容体活性物質のスクリーニングワークフロー
 A1-A16：各イベントを評価するアッセイ、 二重線：ケーススタディで評価されたイベント。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	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
Ono R, Yoshioka Y, Furukawa Y, Naruse M, Kuwagata M, Ochiya T, Kitajima S, <u>Hirabayashi Y</u>	EV (Extracellular Vesicle)-associated miRNAs as Biomarkers of Toxicity	Saura C. Sahu	Genomic and Epigenomic Biomarkers of Toxicology and Disease: Clinical and Therapeutic Actions	Wiley	USA	2022	37-62

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
Yuda M, Aizawa S, Tsuboi I, <u>Hirabayashi Y</u> , Harada T, Hino H, Hirai S	Imbalanced M1 and M2 Macrophage Polarization in Bone Marrow Provokes Impairment of the Hematopoietic Microenvironment in a Mouse Model of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis	<i>Biol Pharm Bull</i>	45	1602-1608	2022
JPMA 課題対応チーム (13名), ICH S6 対応研究班 (5名)	核酸医薬品の非臨床安全性評価における疑問と考え方について	<i>医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス</i>	53 (3)	211-218	2022
Kimura Y, Yasuno R, Iwaki T, Fujimura C, Ohmiya Y, Nakajima Y, Omori T, Corsini E, Inoue T, Rogen EL, <u>Kojima H</u> , Aiba S.	An international validation study of the interleukin-2 luciferase leukocyte toxicity test (IL-2 Luc LTT) to evaluate potential immunosuppressive chemicals and its performance after use with the interleukin-2 luciferase assay (IL-2 Luc assay)	<i>Toxicol In Vitro.</i>	88	105535	2022
Imamura M, Yamamoto Y, Fujita M, Wanibuchi S, Nakashima N, <u>Kojima H</u> , Ono A, Kasahara T	Applicability of ADRA (4 mM) for the prediction of skin sensitization by combining multiple alternative methods to evaluate key events	<i>J Appl Toxicol.</i>	42(7)	1159-1167	2022

Yamamoto Y, Fujita M, Watanabe S, Yamaga H, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kawakami T, Kojima K, Sozu T, <u>Kojima H</u> , Kasahara T, Ono A	Within- and between-laboratory reproducibility and predictive capacity of amino acid derivative reactivity assay (ADRA) using a 0.5 mg/mL test chemical solution: Results of the study for reproducibility confirmation implemented in five participating laboratories	<i>J Appl Toxicol.</i>	42(6)	1078-1090	2022
Fujita M, Yamamoto Y, Wanibuchi S , Watanabe S, Yamaga H, Wakabayashi K, Tahara Y, Horie N, Fujimoto K, Takeuchi K, Kamiya K, Kawakami T, Kojima K, SozuT, <u>Kojima H</u> , Kasahara T, Ono A	The within- and between-laboratories reproducibility and predictive capacity of Amino acid Derivative Reactivity Assay using 4 mM test chemical solution: Results of ring study implemented at five participating laboratories	<i>J Appl Toxicol.</i>	42(2)	318-333	2022
Piersma AH, Baker NC, Daston GP, Flick B, Fujiwara M, Knudsen TB, Spielmann H, Suzuki N, Tsaion K, <u>Kojima H</u>	Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity	<i>Current Research in Toxicology</i>	3	100074	2022
Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, <u>Kojima H</u> , et al	Emerging technologies and their impact on regulatory science.	<i>Exp Biol Med (Maywood)</i>	247(1)	1-75	2022
<u>小島肇</u> , <u>渡辺美香</u>	一般財団法人食品薬品 安全センターにおける 代替法研究	<i>秦野研究所年 報</i>	45	8-17	2022

Uno K, <u>Miyajima K</u> , Toma M, Suzuki-Kemuriyama N, Nakae D	CD44 expression in the bile duct epithelium is related to hepatic fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis rats induced by a choline-deficient, methionine-lowered, L-amino acid diet	<i>J Toxicol Pathol.</i>	35(2)	149-157	2022
<u>Toyoda T</u> , <u>Ogawa K</u>	Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX: a review from analyses of 100 chemicals	<i>J Toxicol Pathol.</i>	35	283-298	2022
<u>Toyoda T</u> , Kobayashi T, Miyoshi N, <u>Matsushita K</u> , Akane H, Morikawa T, <u>Ogawa K</u>	Toxicological effects of two metabolites derived from <i>o</i> -toluidine and <i>o</i> -anisidine after 28-day oral administration to rats	<i>J Toxicol Sci.</i>	47	457-466	2022
Yamada T, <u>Toyoda T</u> , <u>Matsushita K</u> , Akane H, Morikawa T, Cho YM, <u>Ogawa K</u>	Persistent γ -H2AX formation and expression of stem cell markers in <i>N</i> -butyl- <i>N</i> -(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats	<i>Toxicol Sci.</i>	189	51-61	2022
Akane H, <u>Toyoda T</u> , Mizuta Y, Cho YM, Ide T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, <u>Ogawa K</u>	Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats	<i>J Appl Toxicol.</i>	42	1603-1617	2022
Kobayashi T, Kishimoto S, Watanabe S, Yoshioka Y, <u>Toyoda T</u> , <u>Ogawa K</u> , Watanabe K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N	Cytotoxic homo- and hetero-dimers of <i>o</i> -toluidine, <i>o</i> -anisidine, and aniline formed by <i>in vitro</i> metabolism	<i>Chem Res Toxicol.</i>	35	1625-1630	2022

Arakawa N, Ushiki A, Abe M, Matsuyama S, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Miyashita K, Saito K, Nakamura R, <u>Toyoda T</u> , <u>Ogawa K</u> , Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M	Stratifin as a novel diagnostic biomarker in serum for diffuse alveolar damage	<i>Nat Commun.</i>	13	5854	2022
Grúz P, Yasui M, Ukai A, <u>Horibata K</u> , Honma M, Sugiyama KI	Potent mutagenicity of an azide, 3-azido-1,2-propanediol, in human TK6 cells	<i>Mutation Research</i>	876-877	50347531	2022
Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, <u>Horibata K</u> , Masumura K, Sugiyama KI, Matsumoto M, Hirose A	Absence of <i>in vivo</i> mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfo nohydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse	<i>Fundam. Toxicol. Sci.</i>	9(2)	31-36	2022
Honma M, Yamada M, Yasui M, <u>Horibata K</u> , Sugiyama KI, Masumura K	Genotoxicity assessment of food-flavoring chemicals used in Japan	<i>Toxicology Reports</i>	9	1008-1012	2022
<u>Horibata K</u> , Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S	In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture	<i>Genes and Environment</i>	44	24	2022

Ohtake H, Tokuyoshi Y, Iyama Y, Nukaga T, Nishida H, Ohtake T, Hirota M, Yamada K, Seto Y, Sato H, Kouzuki H, <u>Onoue S</u>	Reactive oxygen species (ROS) assay-based photosafety screening for complex ingredients: Modification of the ROS assay protocol	<i>J. Toxicol. Sci</i>	47(11)	483-492	2022
Nakamura K, Kambayashi A, <u>Onoue S</u>	Quantitative assessment of disintegration rate is important for predicting the oral absorption of solid dosage forms containing poorly soluble weak base drugs	<i>Eur J Pharm Biopharm</i>	180	23-32	2022
Halder S, Mibe Y, Rikimura S, Kuromi K, Sato H, <u>Onoue S</u>	Strategic application of liposomal system to R- α -lipoic acid for the improvement of nutraceutical properties	<i>Drug Dev Ind Pharm</i>	48	239-246	2022
Sato H, Yamane C, Higuchi K, Shindo T, Shikama H, Yamada K, <u>Onoue S</u>	Development of stabilized fuzapladib solution for injection: forced degradation study and pharmacokinetic evaluation	<i>Pharm Dev Technol</i>	27(5)	565-571	2022
Banik S, Yamada K, Sato H, <u>Onoue S</u>	Development of poly(lipoic acid) nanoparticles with improved oral bioavailability and hepatoprotective effects of quercetin	<i>Mol. Pharm</i>	19(5)	1468-1476	2022
Yamada K, Hayashi Y, Sasaki K, Higuchi K, Shindo T, Shikama H, Sato H, <u>Onoue S</u>	Nanocrystal solid dispersion of fuzapladib free acid with improved oral bioavailability	<i>Biopharm Drug Dispos</i>	43(3)	89-97	2022
Yamada S, Niiya R, Ito Y, Kato Y, <u>Onoue S</u>	Comparative characterization of β -adrenoceptors in the bladder, heart, and lungs of rats: Alterations in spontaneously hypertensive rats	<i>J. Pharmacol. Sci.</i>	148(1)	51-55	2022

高橋祐次, 齊藤洋克, 栞形麻樹子, 北嶋聡	加圧式定量噴霧式吸入器 (pMDI) 製剤のげっ歯類を対象とした鼻部ばく露装置の開発	<i>Jpn J Clin Toxicol.</i>	35	255-259	2022
Kuroda K, Ishii Y, Takasu S, <u>Matsushita K</u> , Kijima A, Nohmi T, Umemura T	Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in <i>gpt</i> delta rats	<i>Food Chem Toxicol.</i>	168	113365	2022
Murayama N, <u>Yamada T</u> , Yamazoe Y	Application of CYP1A2-Template system to understand metabolic processes in the safety assessment	<i>Food Safety</i>	10(4)	129-139	2022
<u>Yamada T</u> , Kawamura T, Tsujii S, Miura M, Ohata H, Katsutani K, Matsumoto M, Hirose A	Formation and evaluation of mechanism-based chemical categories for regulatory read-across assessment of repeated-dose toxicity: a case of hemolytic anemia	<i>Regul. Toxicol. Pharmacol.</i>	136	105275	2022
<u>Yamada T</u> , Katsutani K, Maruyama T, Kawamura T, Yamazaki H, Murayama N, Tong W, Yamazoe Y, Hirose A	Combined risk assessment of food-derived coumarin with <i>in silico</i> approaches	<i>Food Safety</i>	10(3)	73-82	2022
<u>山田 隆志</u>	Cefic LRI/ILSI Europe Joint Workshopでの Carcinogen Dose Response Database for Threshold of Toxicological Concern (TTC) の概要ならびにTTCに関する近年の国際動向	<i>イルシー</i>	150	4-12	2022
Murata Y, Umamo T, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Inoue K, <u>Yamada T</u> , Masumura K, Matsumoto M	Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VIII)	<i>Bull. Natl. Inst. Health Sci.</i> ,	140	54-60	2022

Fujita M, Nakashima N, Wanibuchi S, Yamamoto Y, <u>Kojima H</u> , Ono A, Kasahara T	Assessment of commercial polymers with and without reactive groups using amino acid derivative reactivity assay based on both molar concentration approach and gravimetric approach	<i>J Appl Toxicol</i>	43(3)	446-457	2023
Uno K, <u>Miyajima K</u> , Ogawa S, Suzuki-Kemuriyama N, Nakae D	Effects of Siraitia grosvenorii extract on nonalcoholic steatohepatitis-like lesions in Sprague Dawley rats fed a choline-deficient, methionine-lowered, l-amino acid-defined diet	<i>J Toxicol Pathol</i>	36(1)	1-10	2023
Colacci A, Corvi R, <u>Ohmori K</u> , Paparella M, Serra S, Carrico IR, Vasseur P, Jacobs NM	The Cell Transformation Assay: A Historical Assessment of Current Knowledge of Applications in an Integrated Approach to Testing and Assessment for Non-Genotoxic Carcinogens	<i>Int. J. Mol. Sci.</i>	24(6)	5659	2023
<u>Matsushita K</u> , <u>Toyoda T</u> , Akane H, Morikawa T, <u>Ogawa K</u>	A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats	<i>Food Chem Toxicol.</i>	175	113702	2023
Ghosh A, Banik S, Suzuki Y, Mibe Y, Rikimura S, Komamoto T, Kuromi K, Yamada K, Sato H, <u>Onoue S</u>	Lysophosphatidylcholine-based liposome to improve oral absorption and nephroprotective effects of astaxanthin	<i>Journal of the Science of Food and Agriculture</i>	103(6)	2981-2988	2023
<u>Saito H</u> , Tanemura K, Furukawa Y, Sasaki T, Kanno J, Kitajima S	Behavioral effects induced by the oral administration of acetaminophen in male mice during the postnatal lactation period or adulthood	<i>J Toxicol Sci.</i>	48(4)	203-210	2023

Sasaki T, <u>Saito H</u> , Furukawa Y, Tominaga T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K	Exposure to bisphenol A or its phenolic analogs during early life induces different types of anxiety-like behaviors after maturity in male mice	<i>J Toxicol Sci.</i>	48(4)	211-219	2023
Murata Y, Natsume M, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, <u>Horibata K</u> , Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M	In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung	<i>Genes and Environment</i>	45(1)	12	2023
<u>Toyoda T</u> , Sone M, <u>Matsushita K</u> , Akane H, Akagi J, Morikawa T, Mizuta Y, Cho YM, <u>Ogawa K</u>	Early detection of hepatocarcinogens in rats by immunohistochemistry of γ -H2AX.	<i>J Toxicol Sci.</i>	in press		2023
<u>Matsushita K</u> , Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K	A 13-week subchronic toxicity study of heme iron in SD rats.	<i>Food Chem Toxicol.</i>	in press		2023

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター・センター長

(氏名・フリガナ) 平林 容子・ヒラバヤシ ヨウコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品添加物部・特別研究員

(氏名・フリガナ) 小島 肇・コジマ ハジメ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 東京農業大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 江口 文陽

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 応用生物科学部食品安全健康学科・教授
(氏名・フリガナ) 美谷島 克宏 (ミヤジマ カツヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京農業大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 OECD プロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・部長
(氏名・フリガナ) 小川 久美子 ・ オガワ クミコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・室長
(氏名・フリガナ) 豊田 武士・トヨダ タケシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター変異遺伝部第二室・室長
(氏名・フリガナ) 堀端 克良・ホリバタ カツヨシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター安全性予測評価部第二室・室長
(氏名・フリガナ) 足利 太可雄・アシカガ タカオ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 神奈川県衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 多屋 馨子

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 神奈川県衛生研究所 理化学部・主任研究員
(氏名・フリガナ) 大森 清美 ・ オオモリ キヨミ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 静岡県立大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 尾池 和夫

次の職員の令和 4 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 静岡県立大学 薬学部 教授
(氏名・フリガナ) 尾上 誠良 (オノウエ サトミ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	静岡県立大学動物実験委員会	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・研究員

(氏名・フリガナ) 齊藤 洋克・サイトウ ヒロカツ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 OECD プロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究 (21KD2003)
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター病理部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 松下 幸平・マツシタ コウヘイ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター安全性予測評価部第四室・室長

(氏名・フリガナ) 山田 隆志・ヤマダ タカシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。