

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3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) 及び Defined Approach (DA) の開発が進められている。厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業における化学物質の有害性評価の迅速化・高度化・標準化に関する研究及び化学物質の新たなリスク評価手法の開発に関する研究の成果を、AOP の開発や代替試験法の公定化、IATA のコンセプトに基づいた化学物質のリスク評価の促進、規制・ガイドラインの新設や見直し等に反映させていくためには、当該研究事業で取得された新規有害性評価系のデータをとりまとめ、化学物質情報や毒性情報などとともに統合して利活用することが求められる。そこで本研究では、平成 30 年度に開始された厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業公募型研究 4 課題について様々な観点から整理する。また、OECD IATA Case Studies Project を対象に AOP を用いた IATA 実践例を調査する。以上を今後の研究開発や行政導入の参考情報とする。

### 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

#### A. 研究目的

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、規制・ガイドラインの新設や見直し、さらには日常生活に利用される種々の化学物質のリスク評価等に反映させていくためには、当該研究事業で開発された新規有害性評価系のデータを、化学物質情報や関連物質の毒性情報などとともに統合して活用することが求められる。そのためには、各研究課題の成果を整理してデータを集積するとともに、体系的にデータを解析し、不足する情報の同定や研究事業で開発された評価系の有効利用による規制判断の支援や評価・試験の戦略を立てることが望まれるところである。

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

## B. 研究方法

### B.1. 化学リスク研究事業総合報告書の調査

以下の平成 30 年度開始の厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業 [公募型] 計 4 課題の令和 2 年度報告書を入手して\*1、

毒性エンドポイントと解析の対象化学物質、評価系の構築状況ならびに試験結果を精査して Excel 形式で整理した。さらに、各研究課題の分担研究について、AOP の構築とテストガイドライン化へ向けた位置づけを整理した。

\*1<https://mhlw-grants.niph.go.jp/>

1) 令和 2 年度 化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づく Multi-ImmunoTox assay (MITA) による予測性試験法の確立と国際標準化 (H30-化学-一般-001)

2) 令和 2 年度 家庭用品化学物質が周産期中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究 (H30-化学-一般-003)

3) 令和 2 年度 生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案 (H30-化学-一般-004)

4) 令和 2 年度 血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価に資する研究 (H30-化学-一般-002)

### B.2. OECD IATA Case Studies Project ケーススタディの調査

AOP を構成する Molecular Initiating Event (MIE) や Key Event (KE) に基づく *in vitro* 試験バッテリーによる前身毒性予測事例など、AOP の IATA への活用に関する調査を行った。調査には、主に OECD IATA Case Studies Project における事例研究の公開資料\*2を使用した。

\*2<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>

(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. 研究結果及び考察

### C.1. 各研究事業における新規有害性評価系の開発状況と AOP 開発へ向けた課題

各研究事業の分担研究ごとに、各分担研究課題、目的、研究対象物質、材料と方法、結論、の項目を設定し情報を整理した。さらにそれらを総合して AOP 開発へ向けた位置づけを整理し、課題を考察した。

1) “化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づく Multi-ImmunoTox assay (MITA) による予測性試験法の確立と国際標準化”においては、化学物質の免疫毒性評価法を 2 つ作出した。IL-2 Luc assay に関しては validation、peer review を経て、2020 年 11 月に SPSF を OECD に提出した。IL-1 Luc assay も validation を行い、report を作成した。また、上記の評価法の確立の過程で得た免疫毒性データを収集しデータベースを構築した。なお、本 assay と免疫毒性を関連付ける AOP は、“OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究”で開発を進めた。

2) “家庭用品化学物質が周産期中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究”では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦（胎児）や小児を対象に、低用量暴露による遅発性の中枢神経系への影響を検討した。令和 2 年度は、アセフェート、塩化トリブチルスズ、ビスフェノール類などによる成熟後の行動、中枢神経系、脳回路機能への影響などを体系的に解析したほか、影響されるノンコーディング RNA を探索した。また、液性因子、DNA メチル化などの評価手法の構築を進めた。さらに、行動影響と海馬の遺伝子発現様式についてデータベース化を行ったほか、ガイドライン作出に向け、OECD や JaCVAM の協力のもと、標準プロジェクト

化への調整を行った。

3) “生体影響予測を基盤としたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の提案”では、二酸化チタンのナノ粒子を被験物質として、(1) ナノマテリアルの *in vitro* 安全性評価法の高度化として評価準備を行った。また、(2) AOP の確立に向けて、新規評価項目を見出した。(3) 毒性試験データベースの構築に向けては、試験データや *in silico* 予測に用いる情報項目の性差を行った。さらに、(4) *in silico* 生体影響予測を組合せたナノマテリアルの統合的健康影響評価方法の構築を目指し、機械学習に用いる実測データの条件を決定した。

4) “血液中の核酸をバイオマーカーに用いた化学物質の高感度な有害性評価に資する研究”では化学物質の「次世代型」有害性評価による迅速化、高度化及び標準化に向け、化学物質ばく露後のマウスの血液中のエクソソーム RNA の網羅的解析により、標的臓器を特定し、更に毒性発現機序の解明を目指した。昨年度までに確立した標準化プロトコルを用いて、四塩化炭素投与による肝毒性を検出する新規バイオマーカーとして、エクソソーム中の small RNA の網羅的スクリーニングを行い、1318 個の新規バイオマーカー候補を得た。

また、5 種類のベンゾトリアゾール類それぞれに特異的なバイオマーカー候補となる 476 個の新規 small RNA を単離し、クラスタリングを行った結果、ベンゾトリアゾール 5 種を 2 群に層別できた。

今回、エクソソーム RNA を指標とした次世代型安全性評価法により、迅速かつ高感度に肝臓毒性を検出でき、評価法の有効性が確かめられた。

いずれの研究課題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。しかし、共通の課題として、*in vivo* 毒性との関連付けと、分子開始イベント (MIE) 情報の不足が挙げられる。MIE は化学物質と生体分子との相互作用により、毒性発現に至る最初の引き金となる反応である。OECD での AOP 開発においては必須の情報であり、例えば”Histone deacetylase inhibition leading to testicular toxicity” (AOP212)のように、MIE に関する情報は AOP のタイトルに含まれる。AOP 開発の促進のためには、毒性発現に寄与する標的分子を効率的に同定する研究手法の開発が求められる。

## C.2. 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 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。

今回、2019 年に提出された「2-エチル酪酸の 90 日反復投与毒性予測」のケーススタディを題材として、AOP を活用する毒性予測の優位性と課題を調査した。本ケーススタディはリードアクロスにより 2-エチル酪酸の 90 日間経口曝露毒性を予測したもので、鎖長の異なる類似物質の毒性試験データと、提案中の AOP を統合した AOP ネットワークから選定した *in vitro* 試験と PBPK モデルの情報を総合的に判断して、肝臓の脂肪症リスクを導出している。使用された AOP は多因子の関与する複雑なネットワークを構成しており (図 1)、この内、

幾つかの MIE と KE の試験を使用した。

OECD の専門家レビューでも AOP により高い信頼性で機序を決定できたことが指摘されており、MIE の活性化だけでは有害事象を引き起こすと断定できないことを提示し、さらなる根拠として KE の *in vitro* 試験による裏付けを行った点は高く評価された。

一方で、複雑な AOP から *in vitro* 試験を選定した根拠の明示、提案中で承認されていない AOP についての補足などが課題として指摘された。

また、予測の不確実性に寄与するものとして、毒性試験データのない類似物質や代謝物の毒性を無視したこと、エンドポイントの種差、AOP が未承認であること、*in vitro* 試験による不確実性が挙げられた。

AOP を活用した IATA 事例から、複雑な AOP ネットワークを成す事象を論じる場合、全ての MIE と KE の測定は不可能かつ不要である可能性が指摘され、一方で、MIE だけでは経路全体が活性化されるか判断できないことが明らかとなった。選定した *in vitro* 試験が AOP をどの程度網羅しているかが不確実性につながるが、必須の KE の特定や AOP の根拠が示されることで低減できるとしている。また、未承認の AOP を用いたが、*in vitro* 試験により類似物質の実測データ (陽性/陰性) を正しく予測できたことで、その不確実性を低減できたと評価された。

このケーススタディでは、複数の AOP を結び付けて AOP ネットワークを形成すると、複雑なエンドポイントを評価するための共通の有害事象につながるさまざまな MIE/KE を検討でき、より適切な *in vitro* 試験を根拠とともに選定できることにより、高い信頼性で作用機序を決定することができたと考えられる。

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、本研究で蓄積された AOP に関する知見や評価手法の実用化に貢献することと期待している。今後は 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

厚生労働科学研究化学物質リスク研究事業の 4 課題を取り上げ、その進捗を整理して、AOP の構築に向けた課題を明らかにした。

また、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. 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, in press.
2. Petkov PI, Ivanova H, Honma M, Yamada T, Morita T, Furuhashi A, Kotov S, Kaloyanova E, Dimitrova G, Mekenyan O. Differences between in vitro and in vivo genotoxicity due to metabolism: The role of kinetics. *Comp. Toxicol.* 22, 100222, 2022.
3. Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, Hirose A, Yamada T. A physiologically based kinetic modeling of ethyl tert-butyl ether in humans—An illustrative application of quantitative structure-property relationship and Monte Carlo simulation. *J. Toxicol. Sci.* 47(2), 77-87, 2022.
4. Lee BM, Lee SH, Yamada T, Park S, Wang Y, Kim KB, Kwon S. Read-across approaches: Current applications and regulatory acceptance in Korea, Japan, and China. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 85(5), 184-197, 2022.
5. Yamada T, Kawamura T, Maruyama T, Kurimoto M, Yamamoto H, Katsutani N, Hirose A. Quantitative structure-activity relationship and a category approach to support algal toxicity assessment of human pharmaceuticals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 8, 195-204, 2021.
6. Yamada T, Miura M, Kawamura T, Ushida K, Inoue K, Kuwagata M, Katsutani N, Hirose A. Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J. Toxicol. Sci.* 46, 531-538, 2021.
7. Tanabe S, Hirose A, Yamada T. Adverse Outcome Pathway on histone deacetylase inhibition leading to testicular atrophy. *OECD Series on Adverse Outcome Pathways No. 17.*
8. Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VII). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* 139, 71-78, 2021.
9. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto

M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a threshold of toxicological concern concept for skin sensitization by in vitro/in silico approaches. Journal of Japanese Cosmetic Science Society (日本化粧品学会誌). 45(4), 331-335, 2021.

## E.2 学会発表

1. 山田 隆志 : Computational Toxicology の有効利用の実際と将来展望. 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021.11.11, 沖縄-Online Hybrid)
2. 山田 隆志 : New Approach Method (NAM) の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の構築へ向けた事例研究の開発. 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021.11.11, 沖縄-Online Hybrid)
3. Yamada T. Development and Improvement of in silico approaches for accelerating regulatory chemical risk assessment. The 9th congress of AsiaToxIV (2021.10.21, Hangzhou, China-Online Hybrid)
4. Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Ohata H, Matsumoto M, Katsutani N, Hirose A. Development of mechanism-based hematotoxicity categories for read-across assessment using an integrated toxicity database of chemical substances. 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2021.8.27, Online)
5. 山田 隆志, 栗本 雅之, 広瀬 明彦, Chihae Yang, James F Rathman : 化学物質の非発がんエンドポイントのTTCアプローチのための新しいデータベースの開発. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
6. 川村 智子, 山田 隆志, 辻井 伸治, 大畑 秀雄, 勝谷 成男, 広瀬 明彦 : リードアクロス評価のためのメカニズムに基づ

く血液毒性カテゴリーの開発と精緻化ー統合毒性データベースを利用した事例ー. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)

7. 川島 明, 井上 薫, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦 : ラットを用いた3-メチルペンタン、イソオクタン、イソノナンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
8. 井上 薫, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 川島 明, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦 : リスク評価の優先順位付けのための発がん性定量評価における各種毒性指標の適用について. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
9. Yamada T. Improvement of QSAR and Read-across for Chemical Risk Assessment and Efforts toward Regulatory Acceptance in Japan. 2021 Korean Society of Toxicology (KSOT)/ Korean Environmental Mutagen Society (KEMS) Toxicology Workshop & Spring International Symposium (2021.5.31, Online).

## 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

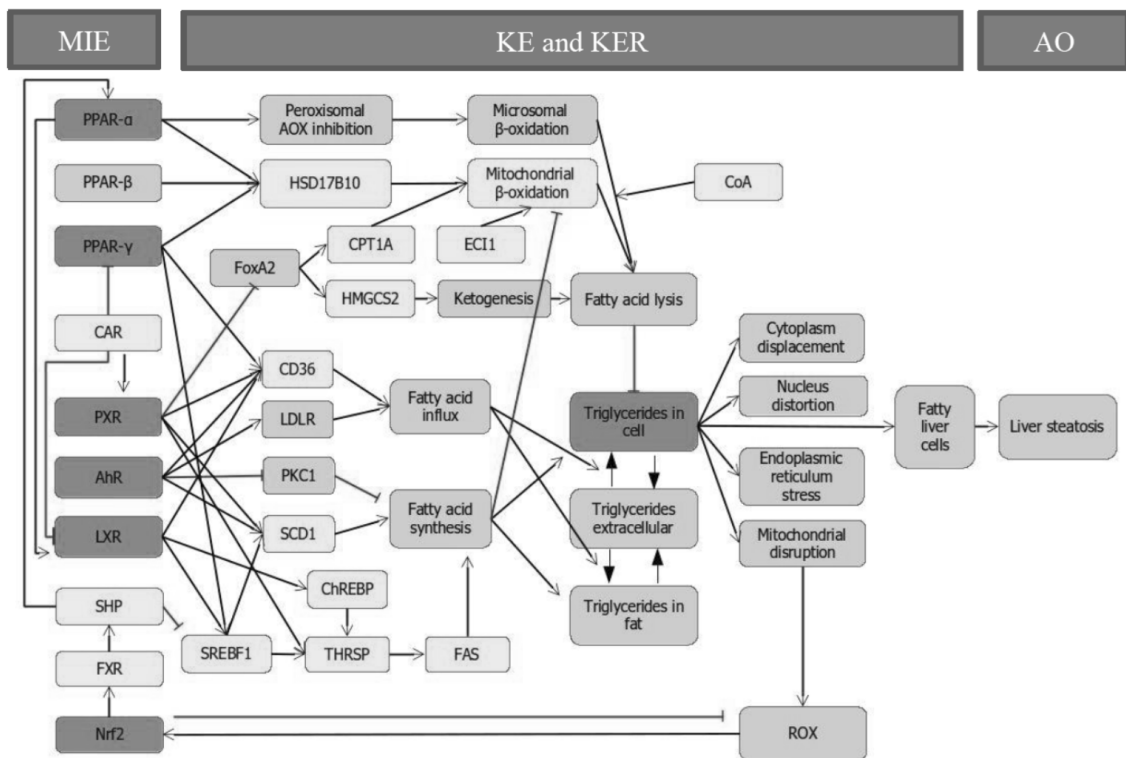


図1 肝脂肪症に関するAOPネットワーク