

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3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

本研究の目的は、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、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。

過去の研究班の成果として、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の成立、免疫毒性のAOP成立などに寄与し、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)や皮膚感作性の確定方式(DA: Defined Approach)の開発に協力してきた。

本研究班では、これまでの成果を生かし、免疫毒性や生殖毒性試験の総説(DRP: Detailed Review Paper)及び非遺伝毒性発がんや光毒性のIATAなどのGDの公定化に尽力する。本年度、AOPに関しては、「カルシニューリン阻害によるT細胞依存的抗体産生抑制:AOP154」がOECDにて正式に承認された。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の改定をなすことができた。同時に承認されたDefined Approach for Skin Sensitisationガイドライン497の開発にも寄与した。

上記したOECDで検討されている皮膚感作性の確定方式(Defined Approach)や発達神経毒性に関する大型プロジェクト等に参画して、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からの提案資料への意見募集に適切な意見を返した。

## 研究分担者

小島 肇

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性予測評価部 主任研究官

中江 大

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

本研究の目的は、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、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

分担研究者の小島は、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

研究分担者の小島と足利は、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AOP154, AOP313, AOP314, AOP315およびAOP277の開発を委託している。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) を定めて、OECD に指定された外部 (または scientific) 評価者及びコーチの指摘事項に対応することで開発を進めた。

#### B.1.2. 発がん性の AOP

研究分担者小川は、研究協力者西川の協力を得て、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、化学物質暴露による鼻腔発がん全般の AOP について論文化に必要な情報を収集し、解析した。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 Toxicology Program)、IARC (International Agency for Research on Cancer)、及び、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抽出し、誘発された鼻腔腫瘍について、動物種、投与経路、組織型などを分類した。また、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行った。

#### 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 AOP wiki に入力した。

### B.2. TG 及び DRP 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、協力研究者の笠原とともに、皮膚感作性試験代替法 *In Chemico* Skin Sensitisation、ADRA (Amino acid Derivative Reactivity Assay) の追加バリデーション報告書及び TG442C の改定案を作成した。

また、小島は協力研究者の相場とともに、IL-8 Luc assay TG442E の改定案を作成した。

小島と足利は、Defined Approach for Skin Sensitisation のプロジェクトに参加し、ガイドラインの成立に協力した。

#### 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 の承認を待って提出することを予定している IL-2 を指標とした免疫毒性試験の TG 案を作成した。

#### B.2.3. 生殖毒性試験の DRP

小島は、国際的な専門家とともに、*in vitro* 生殖発生毒性に関する DRP を作成した。

#### 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うとともに課題を抽出した。今年度は、発達神経毒性試験における動向を知るために、米国環境保護庁 (EPA: Environmental Protection Agency) 及び OECD の発達神経毒性 (DNT: Developmental neurotoxicity) に関する TG における、行動解析に関する情報について内容を確認し、比較を行った。加えて、PubMed を用い、発達神経毒性評価の現状について文献調査を行った。

また、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 の DRP に対して、OECD からの

意見募集に適切な意見を返した。

### B.3. IATA の開発

#### B.3.1. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力

##### 1) 発がん性 IATA 開発

小川と西川は、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。全体会合に加えて、当該 IATA における 13 の Assay Block 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、現存の試験法の利用に関する考え方などに関する論文化に向けて検討した。

##### 2) Bhas42 細胞形質転換試験法の TG 開発

Bhas42 細胞形質転換試験法 (Bhas42CTA) 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、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 mode of action (MoA) 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に提案した。

分担研究者の大森は、Block 3 の“Cell Transformation”と Block 4 の“Gap Junction”を担当し、Block 3 では Bhas 42 CTA のアッセイの利用に関する考え方を作成し、Balb 3T3 CTA の評価を担当した。また、Block 4 では、Dye Transfer Assay と Inhibition of Metabolic Co-operation Assay を提案するとともに、Metabolic Cooperation Assay with (HGPRT+&-) V79 Cells (using 6-TG) の利用に関する考え方の作成及び代謝活性化に関与しないアッセイについて評価案を作成した。

##### B.3.2. 光毒性 IATA

尾上と小島は、JaCVAM 資料編纂委員会の協力を得て、光毒性 IATA を作成した。

#### B.4. AOP 及び TG の実験データ支援

##### B.4.1. 光毒性

##### 1) ROS アッセイ

尾上らが既に公表している ROS アッセイ推奨プロトコルに基づき、acridine (ACD)、furosemide (FSM)、hexachlorophene (HCP)、8-methoxypsoralen (MOP)、norfloxacin (NFX) 及び promethazine (PMZ) について ROS アッセイを行った。

##### 2) *In vitro* 皮膚内動態実験

上記 5 種の被験物質について、フランツ型拡散セルを用いて人工膜 Strat-M における *in vitro* 皮膚透過性試験を実施した。ドナー側に被験物質 (各 1 mg/mL) を入れ、経時的に皮膚を透過したレセプター液中の被験物質の量を UPLC/ESI-MS にてモニタリングし、*in vitro* 皮膚透過性のデータを得た。得られたデータを基に定常状態における各被験物質の皮膚内濃度 ( $C_{ss}$ ) を算出した。得られた  $C_{ss}$  の値と光化学的特性データを併せて考慮することで光毒性予測を実施した。

### 3) ラット *in vivo* 光毒性試験

前日に腹部を剃毛した雄性ラットに各被験物質(10 mg/site)を塗布し、塗布後 3 時間で black light にて UVA(30 J/cm<sup>2</sup>)を照射した。照射終了後 24 時間に色差計にて皮膚表面の色調を計測し、光毒性の指標とした。

#### B.4.2. *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

分担研究者の中江らは以下に示す研究を実施した。

##### B.4.2.1. 表皮組織における代替法の検討：ヒト 3D 再構成系表皮及びヒト表皮角化細胞単層培養系を用いた folpet に対する経皮毒性

ヒト 3D 再構成表皮系としては、LabCyte EPI 24 モデル(株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)を、当該モデルに添付の培養液と共に用いた。単層培養系としては、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞を適宜継代して用いた。

被験物質としては、皮膚刺激性試験で陰性を示すものの 21 日間反復投与毒性を示す folpet(フタルイミド系殺菌剤)を使用した。

ヒト 3D 再構成表皮系を用いた実験は、OECD TG439 に従った皮膚刺激性試験(15 分曝露・42 時間後培養)と、24 時間曝露の 2 条件で、同じ濃度の folpet(0、100、300、1000、2000 µg/mL)による細胞毒性を(3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide: MTT)アッセイで比較評価した。また、24 時間曝露時における各種炎症性サイトカイン・バリア機能関連遺伝子発現を qPCR にて解析した。

HaCaT 細胞を用いた実験は、folpet を 0、

1、3、10、30、40、60、80、100、120 µg/mL 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.4.2.2. 肝臓における代替法の検討：正常または腫瘍肝細胞における脂肪毒性に対する検討

ラット正常肝細胞株 Clone 9 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.4.2.3. 腸管由来組織における代替法の検討

###### 1) 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた平面培養による検討

DSS(Dioctyl Sodium Sulfosuccinate: MP Biomedicals)を通常培地 (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)に後述する濃度%(w/v)で混じ、Caco-2 に 24 時間曝露した。

###### 1-1) 遺伝子発現解析

2 枚の 12-well plate の各 well に Caco-2 を  $4 \times 10^4$  cell/mL で播種して 2 日毎に培地交換を行い、コンフルエントになってから 5 日後に DSS をそれぞれの plate の 3well ずつに 1、3、5%及び 5、10、15%で曝露した。

DSS 10、15%においては RNA 量、cDNA 量共に測定できたにもかかわらず、内部標準遺伝子発現が僅かで、DSS 15%では内部因子を含めその他のターゲット遺伝子すべてに発現が見られなかった。従って DSS 10%以上の曝露は、評価に適さな

い状況にあるものと考えられた。

#### 1-2) 蛍光免疫組織学的染色

Cell culture slide (4-well タイプ) の各 well に Caco-2 を  $1.3 \times 10^5$  cell/mL で播種した。培地は 400  $\mu$ 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、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。

#### 1-3) 生細胞数測定 (WST-8 アッセイ)

96-well plate に Caco-2 を 8,000 cell/well で播種して 2 日毎に培地交換し、コンフルエントになってから 5 日後に 5、10、15、20、25、30% の濃度の DSS を曝露した後、Cell Counting Kit-8 (同人化学:富士フィルム和光純薬株式会社) を添加してインキュベートした。WST-8 試薬添加後のインキュベート時間も考慮して、1 時間経過ごとに 4 時間まで、マルチモードプレートリーダー (バイオテックジャパン) にて 450  $\mu$ m の吸光度測定を行った。

#### 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後述する濃度の DSS をインジェクションし、別のウェルでは培地に同濃

度の DSS を添加し比較解析した。それぞれ経時的に撮影し、DSS のオルガノイドに対する影響を検討した。

#### 2-1) 培地添加による曝露

5、10% DSS (in phosphate-buffered saline (PBS)) を調製し、24-well plate に 0.5、1% 濃度になるよう培地に添加した。Control 群においては PBS を 1% になるように添加した。培地容量は、PBS、DSS 共に、400  $\mu$ L/well とした。

#### 2-2) インジェクションによる曝露

15、30% DSS (in PBS) を調製し、オルガノイドにインジェクションした。オルガノイドの体積とインジェクションする液量の条件から、投与液は 30 倍希釈されることが明らかとなっている。そのため、インジェクション後オルガノイド中の DSS 濃度は、0.5、1% となった。Control 群には、PBS をインジェクションした。

#### B.4.3. 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 3 年度に検索する新規被験物質として、腎発がん物質 5 種<sup>1</sup>を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間混餌 (HCBd、ADBAQ、DMN) または飲水 (EHEN、AOM) 投与した (各群 5 匹)。各物質の投与濃度は短期試験における最大耐量として、300 ppm HCBd、10,000 ppm ADBAQ、500 ppm DMN、1,000 ppm EHEN 及び 40 ppm AOM に設定した。ただし EHEN 投与群については、顕著な体重増加抑制がみられたため、3 週目以降投与濃度を 500 ppm に変更した。

投与期間終了時に解剖し、腎臓及び肝臓

<sup>1</sup> Hexachlorobutadiene (HCBd)、1-Amino-2,4-dibromanthraquinone (ADBAQ)、

Dimethylnitrosamine (DMN)、N-Ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine (EHEN)、Azoxymethane (AOM)

の重量を測定した。腎臓の病理組織学的検査を実施するとともに、免疫組織化学的手法による  $\gamma$ -H2AX 形成の定量解析を実施した。右腎横断面から、皮質及び髄質外帯外層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  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞から陽性細胞率を計測した。

#### B.4.4. 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 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) 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 200~700 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 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た。

DNA 損傷の定量化が可能な紫外線照射による DNA 損傷を誘導した Flp-In 293 細胞を用いて、rDNA 上の転写装置である RNA polymerase I (RNAPI) の構成サブユニット RPA194、DNA 損傷応答マーカーであるヒストンバリエント  $\gamma$ H2AX、または DNA 損傷応答タンパク質の一つとして知られる Ku80 を標的とした ChIP を実施し、RNAPI、 $\gamma$ H2AX または Ku80 が局在する DNA 画分をそれぞれ調製した。これらの 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(H1~H4. 9)を用いた定量的 PCR により、DNA 損傷誘導時における RNAPI、 $\gamma$ H2AX または Ku80 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.4.5. 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、腎障害・腎線維化の AOP 作製に資するデータを得るため、障害機序の異なる3種類の腎毒性物質：アロプリノール (APL)、バンコマイシン (VAN) 及びピューロマイシン (PAN) を用いて腎線維化モデルラットの作出を試みた。

実験1：6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 体重 (5 mL/kg 体重) の用量で1日1回、28日間反復強制経口投与した。体重測定を週に1回行い、最新体重に基づいて投与容量を算出した。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。剖検時に腎臓を摘出して重量を測定した後、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た後、-80°Cにて保存した。得られた血液サンプルを常温下で遠心(3,000 rpm、15分)して血清を分離し、尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニン (sCre) の値を測定した。また、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。さらに免疫組織学的解析のため、組織標本を抗原賦活化処置としてクエン酸緩衝液(pH6.0)に浸漬してオートクレーブ処置し(121°C、15分)、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを除去した。引き続き、非特異反応を除去するため10%正常ヤギ血清を用いてブロッッキング処置を施した後、抗CD44抗体(ポリクローナル、x10,000、Abcam)を4°Cにて一晩インキュベートし、二次抗体(ポリマー法：ヒストファインシンプルステイン)を室温下で30分インキュベートした。ジアミノベンジジンにて反応を可視化し、ヘマトキシリンにより核染色を行った。統計学的解析として、体重、血液生化学的検査及び腎重量のデータについて一元配置分散分析(ANOVA)を実施した後にDunnnett法による多重検定を行った。有意水準は0.05に設定した。

実験2：6週齢の雄性SDラットを3群に配し(n=5)、媒体である生理食塩水もしくはVANを200及び400 mg/kg体重(10 mL/kg体重)の用量で1日1回、28日間反復腹腔内投与し、実験1と同様の測定及び解析を実施した。

実験3：6週齢の雄性SDラットを3群に配し(n=5)、媒体である生理食塩水もしくはPANを8及び12 mg/kg体重(5mL/kg体重)の用量で1日1回、28日間反復静脈内投与し、実験1及び2と同様の測定及び解析を行った。

#### 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。

#### B.6. 毒性等情報収集調査

分担研究者の山田は、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年度報告書入手して\*1、毒性エンドポイントと解析対象の化学物質、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TG化へ向けた位置づけを整理し、俯瞰する図をPowerPoint形式でまとめた。調査対象は以下の通りである。

- 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
- 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
- 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
- 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

さらに、AOPのIATAへの活用に関する調査を行った。主に、OECD IATA Case Studies Projectにおける事例研究から学んだ留意事項をまとめた公開資料\*2を使用した。

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

\*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

「AOP154: カルシニューリン阻害によるT細胞依存的抗体産生抑制」については、WNT/WPHA (Working Party of Hazard Assessment) に提出したのち、ドイツからコメントが提示されたという連絡があり、AOP Wiki の改訂作業を行った。ドイツからの主な指摘は、TDAR (T cell Dependent Antibody Response) アッセイの方法をガイドラインごとに詳細に記載すること、本AOPのみで免疫毒性試験が免除されることはなく、本AOPはIATA開発に利用されるべきであること、本AOPのEU地域での規制上の重要性についても記載することなどであった。指摘事項に対応し、OECD事務局に改訂完了の連絡と著者回答

ファイルを提出したところ、OECD事務局から、本AOPがWNT/WPHAで承認された。その後OECD事務局に著作権譲渡に関する著者全員の署名書類を提出し、令和3(2021)年10月15日にOECD Libraryにおいて公開された。

「AOP313: TLR (Toll-like receptor) 7/8 への結合による乾癬様皮膚疾患の増悪」については、コーチとのwebミーティングの指摘事項(測定結果だけでなく測定対象及び方法を記載すること、Taxonomic ApplicabilityはAOPが環境毒性からきているためにある項目であり、サポートするevidenceをKEやKERに記載すること、IL-23について構造だけでなく機能も記載すること、IL-17及びTh17にfocusするのであればそのことを明記することなど)に対応中である。

「AOP314: 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」については、AO及びKEの置き換えなど大幅な見直しを検討していることをコーチに連絡した。

「AOP315: JAK3の阻害によるT細胞依存的抗体産生抑制」については、コーチに改訂完了の連絡と著者回答ファイルを提出したところ、これに対するコーチコメントを受領した。対するAOP Wiki改訂作業を行い、再びコーチに改訂版を提出した。コーチからの主な指摘は、本AOPのAOがAOP154のAOと類似しているのと同じイベントの場合はAOP154のAO(KE984)にリンクさせ、別のイベントを作成した場合は全体を修正すること、KER3の定量的考察はデキサメタゾンがどのようにSTAT5のDNAへの結合を阻害するかをより詳細に説明すること、“biological plausibility of KERs”、“essentiality of KEs”

及び“empirical support for KERs”についてハンドブックに従って要約表を加えることなどであった。OECDより、外部評価に入れる AOP があればチェックリストを提出するよう要請を受けたコーチが、2021年11月8日にチェックリストを OECD に提出したことから、今後、外部評価に進むことが予想される。AOP154 の場合、外部評価が決まってから OECD に承認されるまで約1年半かかっており、AOP315 も同程度の期間内の承認を目指す。

「AOP277: IL-1 receptor 結合阻害」については、AOP 開発の引継ぎに関する web 会議を実施し、元の AOP 開発者である東北大学の相場節也先生、木村裕先生から説明を受けた。コーチとのweb会議が行われ、評価結果について説明を受けた。その後 OECD から scientific review report を受領した。その主な推奨事項は、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- $\kappa$ 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。現在これらの推奨事項に対応案を作成中である。

#### 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 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。一方、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。

#### C.1.3. 光毒性の AOP

令和元(2019)年6月に OECD TG495 としてガイドライン化された ROS アッセイを主軸として、新たに光安全性評価のための AOP 構築を進めている。既に OECD の専門家会議で意見を求め、光刺激性に絞った AOP 作成を進めることで同意を得た。

#### C.2. TG 及び DRP の開発

##### C.2.1. 皮膚感作性試験

小島は、協力研究者の笠原とともに、昨年度から検討を続けてきた *In Chemico* Skin Sensitisation、ADRA の改定に尽力した結果、令和3(2021)年6月に TG の改定が承認された。引き続き、OECD の専門家から要請を受け、ADRA の国内施設の協力を得て実施した追加バリデーションの報告書及び TG442C の最終改定案を作成し、7月に OECD に提出した。11月の専門家会議を経て、改定 TG 案を OECD に提出した。

また、小島は、協力研究者の相場とともに、IL-8 Luc assay TG442E の改定案を作成し、7月に OECD に提出した。11月

の専門家会議後に反論がでてきたこともあり、来年、再協議を行うことになっている。

小島と足利は、昨年度から専門家委員会で検討を続けてきた *Defined Approach for Skin Sensitisation* の承認に寄与した結果、令和 3(2021)年 6 月にガイドライン 497 が承認された。

本ガイドラインは新しいタイプの OECD ガイドラインである。DA では化学物質の物性および *in vitro* 試験データで検証された OECD の組み合わせを使用している。その一つとして、DA では、化学物質規制に *in silico* データを受け入れることを可能にした最初の事例である。

このガイドラインには以下に示す画期的な点が複数含まれている。

- 1 初めて試験法の結果を組み合わせで評価する手法が公定化された。
- 2 初めて *in silico* の利用が組み合わせ評価に利用された。

ヒトの感作性が予測できる初のガイドラインである。

#### C.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、昨年度、*in vitro* 免疫毒性に関する DRP を作成した。OECD が集めた意見に対応する改定版を 9 月に提出したところ、2 次募集において追加意見が集まった。現在、この意見に対応する改定を検討している。

DRP の承認を待って提出する予定の IL-2 を指標とした免疫毒性試験の TG 案を作成し、3 月に OECD に提出した。

#### 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

発生毒性に関する DRP の作成をこの一年継続して実施している。本来は夏休み前に適切な論文に投稿する予定であったが、著者の中に EPA や企業の専門家が含まれていることから、公表にあたり EPA や企業の同意を得ることに手間取ったこともあり、令和 4(2022)年 2 月に *Current Research Toxicology* に投稿し、3 月に改訂の指示を受けた。

#### 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

EPA 及び OECD の DNT に関する TG を確認し、げっ歯類に対する行動解析に関する内容を中心に比較を行った結果、発達神経毒性に関連する OECD TG426 は、全般に EPA ガイドライン(OPPTS 876. 6300)に沿った内容であり、EPA のガイドラインに比べ詳細に記載されていた。試験項目の内容に関しては、大きく分けて「行動発達」、「自発運動量」、「運動及び感覚機能」、「学習及び記憶」における推奨検査項目や実験条件について述べられていた。しかしながら、実施する行動評価の選択については具体的な記載はなく、明記されているのは評価の対象となる機能及び試験を行う際の推奨日齢のみであった。また、脳高次機能に関する試験項目としては「学習及び記憶」が該当するが、試験方法の記述は曖昧な表現にとどまっていた。さらに、行動試験を行うにあたり、解析環境の記載については、具体的な説明が乏しいことや、特定の試験を組み合わせた評価系を構築するなど、標準化(統一化)されたプロトコルではないことも明らかとなった。

PubMed を用い、OECD TG426 が制定された平成 19(2007)年から令和 3(2021)年ま

での範囲で文献数調査を行ったところ、一例として、検索キーワード「developmental neurotoxicity」のみの検索条件では総文献数が995件にのぼり、その報告数は年々増加していることから、発達神経毒性研究に対する関心が伺えた。一方で、「"developmental neurotoxicity" AND "OECD test guideline 426"」の検索条件では、わずか2件の該当であった。文献検索については、検索条件を変更しながら、学術ベースとガイドラインベース(OECDあるいはEPAのガイドラインに準拠した試験)で、ガイドラインの使用実績を含めて引き続き調査を進め、得られた文献情報についてとりまとめる予定である。

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 the Developmental Neurotoxicity (DNT) *In-Vitro* Testing Assays for Use in Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA)) 及び Case Study に関して、OECD 事務局に提出するコメント募集に応じた。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・懸念点について以下のコメントを行った。

1. 提案されている *in vitro* 試験バッテリー (Developmental Neurotoxicity *In Vitro* Battery (DNT IVB)) により *in vivo* 発達神経毒性を予測するにあたって、化学物質影響の種間差、性差に関する言及がないこと。
2. 行動毒性においては、*in vitro* 試験の複数のアッセイを組み合わせたとしても、予測は困難であり、現在の内容に加えて、さらに考察を追加する必要があること。

3. *in vivo* 試験で観察される神経回路の機能変化や、顕在化する行動影響に関して、*in vitro* 試験において得られたデータはどこまで対応しうるのか、あるいは妥当性があるのか、具体的な言及を追加すること。
4. 被験物質の複合曝露による、相加・相乗的影響についての懸念。また、げっ歯類の代替としてのゼブラフィッシュによる解析を含めて、検出系の施設間差、試験プロトコルの統一性(個体数や分析法)についての議論をすること。
5. 今後、DNT IVB で種々の化学物質について検討する際に、*in vitro* 試験で確認されなかった影響が *in vivo* 試験のみで確認された場合の解釈について言及すること。
6. *in vivo* 脳高次機能(学習や記憶)の評価は現状難しいと考えられ、その際に、最終的に *in vivo* アッセイで補強すべき役割について言及すること。

### 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

##### 1) 発がん性 IATA

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 of apoptosis cell death のサブグループに参画し、Assay Block の評価を行った。cell proliferation においては、細胞増殖の評価に関する *in vitro/ex-vivo/short term in vivo* assay の非遺伝毒性発がん性の KE としての網羅的文献検索、オミックス解析の利用の可能性、規制への応用の可能性などを内容とする論文作成について議論された。

新規評価法としては、米国 EPA の Dr. Chris Corton による eSTAR (Emerging Systems Toxicology for the Assessment of Risk)に関する webinar があり、肝発がんにおいては、AhR、CAR、ER、PPARα の活性及び cytotoxicity が非遺伝毒性発がん性の MIE として利用可能との紹介があった (Corton JC, et al. Toxicol Sci 177; 11-26 2020)。また、オランダ ライデン大学の Dr. Bob van de Water による weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) に関する webinar があり、TXG-MAPr webtool ([https://txg-mapr.eu/WGCNA\\_PHH/TGGATEs\\_PHH/](https://txg-mapr.eu/WGCNA_PHH/TGGATEs_PHH/))を用いた初代ヒト肝細胞のストレス応答遺伝子共発現分析について紹介があった (Callegro G, et al. Archive Tox 95; 3745-75 2021)。非遺伝毒性発がん物質と遺伝毒性発がん物質で誘導される遺伝子発現パターンの相違について、これらのデータを比較することも有用と考えられた。

## 2) Bhas42 細胞形質転換試験の TG 開発

大森は、Bhas42 細胞形質転換試験 (Bhas 42 Cell Transformation Assay: Bhas 42 CTA) が含まれる“Cell Transformation” (Block 3) 及び、約 40 年前からわが国で非遺伝毒性発がん物質の検出法として有用性評価が行われてきた“Gap Junction” (Block 4) を担当した。

Block 3 の“Cell Transformation”では、SHE Cell Transformation Assay (SHE CTA)、Bhas 42 CTA、Balb 3T3 CTA、Balb c/3T3 transformants assay、Clonogenic soft agar Assay の計 5 種の assay が評価候補となった。IATA の全 assay 候補の中で OECD の GD として掲載されている試験法は、SHE CTA 及び Bhas 42 CTA のみである。この 2 つの試験法については、各種性能及び再

現性等の検証データに基づき利用に関する考え方を作成し、各評価項目において A 評価を得た結果、Block 3 メンバーの全会一致でランク A の合意を得た。一方、Clonogenic soft agar Assay はランク B であった。Balb 3T3 CTA については、2-step assay と 1-step assay が開発されていることから、いずれのプロトコルを利用に関する考え方に記載し評価を行うかについて議論されたが、かつて ECVAM から OECD に提案され評価が中断された 1-step assay を Block 3 での評価プロトコルとすることになった。同プロトコルに基づく Balb c/3T3 transformants assay も Balb 3T3 CTA とは別に利用に関する考え方が作成されたが、最終的には Balb 3T3 CTA の optional assay として Balb 3T3 CTA の利用に関する考え方に組み込まれ、Balb 3T3 CTA として評価が行われた。Balb 3T3 CTA では、対象化合物での明確な陽性結果が報告されていないことに加え、性能評価及び再現性検証の化合物数も限定的であることなどから、各評価項目は A 評価と B 評価とが混在した。ランキングについて Block メンバー内で議論され、Balb 3T3 CTA (Balb c/3T3 transformants assay 含む) はランク A で合意された。それら 3 種の Cell transformation assay 評価結果は、10 月の全体会議での報告に至った。

Block 4 の“Gap Junction”では、大森から提案した、Dye Transfer Assay と Inhibition of Metabolic Co-operation Assay について、該当する 3 種 assay (Metabolic Cooperation Assay with (HGPRT+&-) V79 Cells (using 6-TG)、Gap junction dye transfer assay-combined、Gap Junction Multiparametric Scrape Loading-Dye Transfer assay (mSLDT)) を選出した。Metabolic Cooperation Assay

with (HGPRT+&-) V79 Cells (using 6-TG)については、467 化合物で結果と 166 化合物での性能評価について総説 (ATLA) が我が国から報告されており、それをもとに大森が利用に関する考え方の作成を行った。他の 2 種の assay は、他の 2 名のメンバーが利用に関する考え方を作成した。Metabolic Cooperation Assay with (HGPRT+&-) V79 Cells (using 6-TG) は、感度 (49%) 及び特異性 (63%) が十分でなく施設間再現性評価が未報告のためランク B となった。Gap junction dye transfer assay-combined は、ECVAM のプロトコルではあるが、17 化合物のデータのみで検証データが無いためランク C であった。Gap Junction Multiparametric Scrape Loading-Dye Transfer assay (mSLDT) は、328 化合物での結果と IARC グループ 1 及び 2 の 72 化合物での性能評価が報告されており、感度は 75% 以上であるが、特異性が 45% と低値であり、施設間再現性評価が未実施であることからランク B となった。これら Block 4 の 3 種 Gap junction assay の評価結果についても、10 月の全体会議での報告に至った。

### C.3.2. 光毒性 IATA

令和元(2019)年 6 月に OECD TG495 としてガイドライン化された ROS assay を主軸として、新たに光安全性評価のための IATA 構築を進めている。既に OECD の専門家会議にて共有し、専門家より修正に資する重要なコメントを頂いている。ICH S10 において推奨されているストレテジーをベースとし、(i) 被験物質の光化学的特性評価、(ii) 光生物化学的特性評価、そして (iii) 皮膚や眼への移行性・滞留性等体内動態評価の 3 段階のスクリーニングによる

tiered approach を案として提示すべく準備を進めている。

## C.4. AOP 及び TG の実験データ支援

### C.4.1. 光安全性評価ツールの予測精度

被験物質である ACD、FSM、HCP、MOP、NFX および PMZ の光毒性リスクを予測し、本評価系の適用可能性を精査した。Strat-M<sup>®</sup> を二層膜モデル、30 min の間 methanol 処置した Strat-M<sup>®</sup> を単層膜モデルとして用い、レセプター液中に到達した被験物質量を経時的に測定することにより各被験物質のそれぞれの膜に対する透過性を評価した。本試験では、Strat-M<sup>®</sup> の薄さを鑑みて試験開始から 8 h で膜透過速度定常状態に達すると考えた。全被験物質の透過量について、単層膜モデルの方が二層膜モデルと比較して高かった。二層膜および単層膜モデルのどちらにおいてもレセプター液中 PMZ 量は全被験物質中最も高く、試験開始 8 h 後における値はそれぞれ 0.4 および 1.3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  であった。被験物質の累積量プロファイルに基づき、 $P_{\text{TLM}}$  は  $5.0 \times 10^{-5}$  (ACD)、 $5.0 \times 10^{-5}$  (FSM)、 $6.0 \times 10^{-5}$  (HCP)、 $4.0 \times 10^{-5}$  (MOP)、 $2.0 \times 10^{-5}$  (NFX) および  $1.0 \times 10^{-4}$  (PMZ)  $\text{cm}/\text{s}$  であり、 $P_{\text{OLM}}$  は  $4.0 \times 10^{-4}$  (ACD)、 $1.7 \times 10^{-4}$  (FSM)、 $1.8 \times 10^{-4}$  (HCP)、 $1.1 \times 10^{-4}$  (MOP)、 $1.2 \times 10^{-4}$  (NFX) および  $3.9 \times 10^{-4}$  (PMZ)  $\text{cm}/\text{s}$  であった。全被験物質の  $P_{\text{OLM}}$  は  $P_{\text{TLM}}$  と比較して高く、その差は 2.9 から 7.4 倍であった。二層膜モデルに対する透過性は Clog  $P$  値が -0.78 と被験物質中で唯一負の値を持つ NFX が最も低かった。HCP および PMZ の Clog  $P$  値はそれぞれ 7.0 および 4.6 であり、Clog  $P$  を基準とした脂溶性は HCP が最も高い一方で、PMZ の  $P_{\text{TLM}}$  は HCP より高く全被験物質中最も高値であった。これら Strat-M<sup>®</sup> に対する各被

験物質の透過性を基に  $C_{ss}$  を算出したところ、ACD、FSM、HCP、MOP、NFX および PMZ の  $C_{ss}$  はそれぞれ 23.4、19.6、20.5、9.4、5.9 および 38.1  $\mu\text{g/mL}$  であった。すなわち、PMZ が最も高く、次いで ACD、HCP および FSM の順であった。MOP および NFX の  $C_{ss}$  は他の被験物質と比較し低かった。

UV/VIS 吸収スペクトル測定および ROS assay を 6 種被験物質に対して実施することで、それらの光化学的特性を評価した。全被験物質は UV 領域に強い吸収を持ち、その範囲で吸収が極大となる波長での MEC 値は 19,500 (ACD)、14,900 (FSM)、11,200 (HCP)、24,900 (MOP)、24,900 (NFX) と 6,600 (PMZ)  $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  であった。つまり、6 種類の被験物質は高い光励起性を持つと判断できる。ROS assay において、HCP を除く全被験物質が擬似太陽光照射により産生した singlet oxygen および superoxide anion はガイドラインによって定められた criteria を超えていた。HCP は singlet oxygen の産生量のみ criteria を超え、その産生量は全被験物質中最も多かった。したがって、6 種の被験物質全てが criteria を超えており、光反応性を持つことが明らかになった。特に、ACD は singlet oxygen および superoxide anion のどちらの産生量も非常に多く、被験物質中で最も高い光反応性を有していた。

提案した光安全性評価系の適用可能性の検証には、本評価系により予測した結果と実際に生体内で起こる光毒性反応との関連性を評価する必要がある。したがって、各被験物質の *in vivo* 光毒性を評価すべく、ラットを用いた *in vivo* 光毒性試験を行った。一般に、露光部に分布した光毒性陽性化合物から産生された ROS および光励起された化合物自身的一方もしくは両方が細胞膜障

害を引き起こし、発赤や紅斑を主徴とする光刺激反応を呈する。本試験では、UVA 照射前後のラット腹部の皮膚表面における色調変化を客観的に評価することで光毒性、特に光刺激性の強さを評価した。全被験物質は UVA 照射により有意に皮膚表面の色調が変化した。つまり、6 種の被験物質が光毒性反応を誘発した。UVA 照射群では、全 6 種被験物質で  $\Delta a$  値が正の変化を示した。この結果は塗布部の赤みが UVA 照射により増したことを示しており、単回投与により紅斑反応を誘発することを認めた。つまり、全被験物質は光刺激性を有することが明らかとなった。特に、ACD および HCP 投与群の色調変化が他の 4 種被験物質と比較して大きかった。

以上、被験物質の *in vitro* 皮膚滞留性および光反応性の統合的な解析により予測した光毒性リスクおよび *in vivo* 光毒性の強さを以下に示す。

#### **Predicted phototoxic risk:**

ACD > HCP > PMZ > FSM > MOP > NFX

#### **Observed phototoxicity:**

ACD  $\approx$  HCP > PMZ > MOP > FSM > NFX

予測した光毒性リスクと *in vivo* 光毒性の順は良い対応を示した。人工膜を用いた統合的光安全性評価法は精度良く被験物質の光毒性リスク予測ができ、実験動物を用いずとも光安全性評価が可能であることを示唆した。

#### **C.4.2. *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**

##### **C.4.2.1. 表皮組織における代替法の検討**

ヒト 3D 皮膚再構成系を用いた folpet に

対する経皮毒性評価において、OECD TG439 に従った皮膚刺激性試験では 2000  $\mu\text{g/mL}$  の最高濃度まで陰性であったのに対し、24 時間曝露では同条件の対照群と比較して 2000  $\mu\text{g/mL}$  より細胞毒性がみられた。24 時間曝露における qPCR では、炎症性サイトカインの mRNA 発現が 1000  $\mu\text{g/mL}$  で有意に増加した。また、濃度依存による検討では、3 時間あるいは 8 時間の曝露より炎症性サイトカインの上昇がみられた。HaCaT 細胞を用いた 24 時間曝露では、60  $\mu\text{g/mL}$  以上で細胞毒性を示した。

#### C.4.2.2. 肝臓における代替法の検討

Clone 9、HepG2、Hepal-6 において、パルミチン酸やリノール酸に比してオレイン酸やオレイン酸のトランス異性体であるエライジン酸の細胞毒性は弱かった。多価不飽和脂肪酸は、Clone 9 と比較して HepG2 と Hepal-6 において、低濃度曝露で細胞毒性を示した。

#### C.4.2.3. 腸管由来組織における代替法の検討

##### 1) DSS 曝露によるマウス腸管への影響

DSS 群の小腸では、病理組織学的に明らかな変化がなかったが、細胞接着関連因子(TJP-1)及び炎症関連因子(IL-1 $\beta$ )の遺伝子発現の減少傾向が見られた。DSS 群の大腸では、軽度の炎症性病変が誘発された。

##### 2) 腸管上皮由来 Caco-2 細胞を用いた平面培養による検討

###### 2-1) Caco-2 の遺伝子発現解析

DSS 添加により control と比較し 1%濃度以上で、TJP-1 並びに IL-1 $\beta$  の遺伝子発現が減少傾向を示した。DSS 5%濃度においては、e-cadherin と IL-1 $\beta$  の発現に加え、

ZO-1、IL-6、TNF- $\alpha$ についても control と比較し、発現がやや低下する傾向が認められた。DSS 10、15%濃度においては、内部標準遺伝子の発現自体が少なく、PCR の結果が得られなかった。このことから DSS 10%濃度以上では、細胞の死滅が生じているものと考えられた。

###### 2-2) Caco-2 の蛍光免疫組織学的染色及び遺伝子発現解析

2 週間培養し 24 時間 DSS を曝露したところ、10%では明らかな細胞の脱落・離開が見られた。5%では細胞培養の状態に control と差が見られなかったが、e-cadherin の免疫組織化学では細胞間の陽性部位の減弱が認められた。DSS 1 及び 3%濃度では、明らかな差が見られなかった。

###### 2-3) Caco-2 の生細胞数測定 (WST-8)

WST-8 試薬添加後のインキュベート 1 時間後の評価において、control に比較し、DSS 5%濃度以上で、細胞が死滅し毒性が生じているものと考えられた。

##### 3) マウス空腸由来オルガノイド

###### 3-1) マウス空腸由来オルガノイドの培地中曝露

添加後 1 時間で、DSS 0.5、1%濃度培地で死滅しているオルガノイドが見られたことから、1 時間足らずでオルガノイドへの影響が確認できなくなり、マトリゲルが破壊され緩くなることから、さらに低濃度による検討を要することが明らかとなった。

###### 3-2) マウス空腸由来オルガノイドのインジェクションによる曝露

インジェクション後に DSS 1%濃度でもオルガノイドは死滅せず、大型化・変形した。



TJP-1 の遺伝子発現は 0.5%濃度以上で一過性の顕著な増加を示したが、24 時間後には、control と差はなく 1%濃度では一転し発現が低下した。さらに IL-1 $\beta$ の遺伝子発現は減少傾向を示した。

#### C.4.3. 発がん性試験における AOP 及び TG の実験データ支援

投与期間終了時点で、HCB $\cdot$ DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM 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 HCB $\cdot$ DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM 投与群、飲水量は EHEN $\cdot$ AOM 投与群で低値の傾向を示した。

HCB $\cdot$ ADBAQ 投与群では腎絶対 $\cdot$ 相対重量の有意な増加が、DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM 投与群では腎絶対重量の減少及び相対重量の増加が認められた。また、ADBAQ 投与群で肝絶対 $\cdot$ 相対重量の増加、HCB $\cdot$ DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM 投与群では肝絶対重量の減少がみられた。

腎臓の病理組織学的検索の結果、HCB $\cdot$ ADBAQ 投与群では再生尿細管の出現及び尿細管上皮への好酸性顆粒沈着増加等が、DMN $\cdot$ EHEN $\cdot$ AOM 投与群では間質における炎症性細胞浸潤、尿細管上皮細胞の変性及び核の大型化等が種々の程度で認められた。

腎尿細管上皮細胞における  $\gamma$ -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、被験物質を投与した各群ではいずれも  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の増加が認められた。

#### C.4.4. 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 $\sim$ H42.9 の内、H1 $\sim$ H13 は

転写領域、H18 $\sim$ 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、RNAPI 共沈 DNA 中には H1 $\sim$ H13 の転写領域の DNA のみが均一に存在する一方で、紫外線 DNA 損傷誘発時の RNAPI 共沈 DNA 中には、転写領域の中でも H1 と H4 の DNA 領域が特に多く存在することが示された。一方で、DNA 損傷を誘発しない条件において、 $\gamma$ H2AX 及び Ku80 共沈 DNA 中には rDNA unit 全領域の H1 $\sim$ H42.9 がわずかに、かつ、均一に存在しているが、紫外線 DNA 損傷誘発時の  $\gamma$ H2AX 及び Ku80 共沈 DNA 中には H1 $\sim$ H42 がさらに多く存在し、その中でも特に H18 及び H27 の DNA 領域が多く存在することが示された。

#### C.4.5. 腎障害 $\cdot$ 線維化の分子メカニズムに関する研究

実験 1：APL 投与群では実験期間を通して体重増加抑制が認められ、APL 100 mg/kg 群では実験開始 1 から 2 週後に、APL 150 mg/kg 群では実験開始 1 から 4 週後にかけて対照群と比較して有意な低値を示した。血清生化学的検査では、BUN 及び sCre ともに APL 100 mg/kg 群から増加傾向を示し、APL 150 mg/kg 群では有意に増加していた。腎重量の測定では、APL 100 及び 150 mg/kg 群ともに絶対及び相対重量が用量依存性を伴って有意に増加した。病理組織標本を用いたシリウスレッド染色による線維化の評価では、APL 100 及び 150 mg/kg 群ともに間質の膠原線維の明らかな増加を認めた。膠原線維の増加した領域では尿細管は拡張あるいは萎縮しており、これらの尿細管は免疫染色にて CD44 陽性を示した。

実験 2：体重測定において VAN 投与の影響

響は認められなかった。血清生化学的検査では、BUN の有意な高値が VAN 200 及び 400 mg/kg 群に、sCre の有意な高値が VAN 400 mg/kg 群に認められた。腎重量測定では、VAN 400 mg/kg 群において絶対及び相対重量の有意な増加が認められた。シリウスレッド染色では VAN 200 及び 400 mg/kg 群ともに軽度な膠原線維の増加が認められ、膠原線維の増加した領域における尿細管は拡張あるいは萎縮しており、免疫染色にて CD44 陽性を示した。

実験 3：体重測定において PAN 投与の影響は認められなかった。血清生化学的検査は現在実施中である。腎重量測定では、VAN 12 mg/kg 群において相対重量の有意な増加が認められた。VAN 8 及び 12 mg/kg 群の腎臓では糸球体及び尿細管障害を示唆する変化がみられたものの、間質の膠原線維の明らかな増加は認められず、拡張／萎縮尿細管も観察されなかった。CD44 の免疫染色においても陽性を示す尿細管は認められなかった。

#### 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

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) 皮膚感作性試験 Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA): An In Vitro Method for Identifying the Skin Sensitisation Potential of Chemicals
- 2) 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

上記した活動に加え、本年度、以下の意見募集が OECD よりあり、コメントを提出した。

- ✓ Draft TG on physical-chemical properties Particle Size and Size Distribution of Manufactured Nanomaterials (PSD)
- ✓ Draft TG on Volume Specific Surface Area of Manufactured Nanomaterials (VSSA)
- ✓ Draft updated Test Guideline No. 488 on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays
- ✓ Draft Test Guideline on the Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation Assay
- ✓ Draft Test Guideline No. 442C: Draft updated Appendix II on In Chemico Skin Sensitisation: Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA)
- ✓ Draft updated Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified in vitro skin sensitisation DPRA and ADRA test methods
- ✓ Draft Test Guideline No. 442E updated with a new Annex: Annex IV on Genomic allergen rapid detection for assessment of skin sensitizers (GARD™skin)
- ✓ Draft Test Guideline for Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation
- ✓ Draft Supporting Document for Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye irritation
- ✓ Draft Test Guideline No. 492B on Reconstructed Human Cornea-like Epithelium (RHCE) test method for eye hazard identification

- ✓ Draft Performance Standards for Test Guideline No. 498 on RhE Phototoxicity
- ✓ Draft Detailed Review Paper on the miniaturised versions of the bacterial reverse gene mutation test
- ✓ Guidance Notes on the Adaptation of the *In Vitro* micronucleus assay

## C.6. 毒性等情報収集調査

### C.6.1. 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、令和 2(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の中枢神経系に及ぼす遅発性毒性の評価系作出に資する研究” では、家庭用品に含まれる化学物質について、妊婦(胎児)や小児を対象に、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(2020)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、高度化および標準化に向け、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-

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 のタイトルに含められる。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.6.2. AOP ネットワークを用いた IATA の事例と課題

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、令和元(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. 考察

### D.1. AOP の開発

#### D.1.1. 免疫毒性の AOP

開発中の AOP については、コーチ及び scientific reviewer のコメントに基づいて修正を行っている。IL-23 の機能の説明のよ

うに既存の情報を収集することで対応できるものもあるが、医薬品だけでなく化学物質のストレスを示すこと、など情報がないものについては調査したことを示して納得いただく必要がある。また、AO が疾患の憎悪である AOP については、行政活用の観点からその実用性に疑問が投げかけられており、すでに承認された AOP154 のように TDAR に変更するか、開発そのものを見直すことを検討中である。ただし、OECD に承認された AOP154 の KE の一つは IL-2 産生であり、本年度日本から別途 OECD に提案した免疫毒性スクリーニング試験 IL-2 Luc assay の TG 化の理論的基盤になるため、その意義は大きいと考える。

#### D.1.2. 発がん性の AOP

げっ歯類における化学物質誘発鼻腔がんの網羅的解析結果は、各種鼻腔腫瘍の前駆病変は、遺伝毒性に関係なく、腫瘍タイプの化学物質誘発性の細胞毒性と一般的に関連している可能性があり、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。

#### D.1.3. 光毒性の AOP

IATA の開発を基に、それに準じた AOP 案を wiki に入力し、外部評価に入れるよう尽力する。

## D.2. TG 及び DRP の開発

もとより TG 及び DRP の開発は、提案してから承認まで数年かけて国際合意を取っていく作業である。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の GD 作成を進めてきている。さらに、OECD では公定化にあたり、通常、2 回の意見募集を実施するが、これらに対しては、OECD 事務局も通例になく慎重を期している。この分野の先頭に行く日本としては、国際的な専門家の協力を得ながら、焦らず、ことを進めて行く所存である。

また、OECD からの意見募集 (*in vitro* DNT の GD 案) に関しては、ガイダンス文書自体が、*in vitro* 試験の有用性を示す内容でまとめられていることに変わりはないが、本来げっ歯類を主とした動物試験を代替する評価手法として、現行の *in vivo* 試験との対応や、解決すべき課題についての言及が少ないように感じており、*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の点で、さらに議論を深める必要があると考える。

### D.3. IATA の開発

#### D.3.1. 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。

Block 3 (Cell transformation assay) 及び Block 4 (Gap junction assay) での assay の選出、利用の考え方の作成ならびに評価が完了し、Block 3 は Bhas42 CTA を含む全てのランクで A と Expert working group の全体会議で報告された。Block 4 では、2 種の

アッセイがランク B、1 種がランク C であり、これらも全体会議で報告された。今後、13 の Block 間での評価の一貫性を確認し、整合性を図る工程が重要になると考えられた。

#### D.3.2. 光毒性 IATA

構築した IATA 案については今後当該領域のエキスパートから頂いたコメントを基に修正していく予定である。特に decision tree の構築を強く求められているので、draft を作成して関係者間で慎重な協議を進めている。専門家の意見を反映しつつ完成に向けて改訂作業を進めていく。

### D.4. AOP 及び TG の実験データ支援

#### D.4.1. 光安全性評価ツールの予測精度

人工膜を用いた *in vitro* 皮膚透過性試験および ROS assay により構成された光安全性評価系は化合物の光毒性リスクを適切に予測可能であった。さらには予測結果のヒトへの外挿可能性においても良い知見が得られた。以上より、*in vivo* 試験に依存しない本光安全性評価系は将来的に光安全性の高い新規化合物創製に貢献すると期待する。

#### D.4.2. *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

D.4.2.1. 皮膚組織における代替法の検討  
ヒト 3D 皮膚再構成系を用いた評価において、folpet は、OECD TG439 による皮膚刺激性試験で陰性であったが、24 時間暴露条件下で濃度が高くなると細胞生存率が下降傾向を示し、炎症性サイトカインの mRNA 発現が 1000 µg/mL で有意に増加した。したがって、後者のプロトコルは、

OECD TG439による皮膚刺激性試験で陰性の化学物質の細胞傷害性や、in vivoの反復投与経皮毒性に相当する変化を検出できる可能性が示唆された。今後、表皮の毒性に鋭敏な因子の探索や、より簡便なスクリーニングを目指すための HaCaT 細胞を用いた検討を行う予定である。

#### D.4.2.2.肝臓における代替法の検討

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、本実験で使用した細胞株では、特に多価不飽和脂肪酸曝露に対する細胞毒性が異なることが明らかとなった。今後、正常または腫瘍肝細胞の種類を増やし、脂肪酸曝露による細胞毒性の差異を精査する予定である。

#### D.4.2.3. 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 の投与、腸管由来の株化細胞 Caco-2 を用いた 2 次元培養による影響を検討し、マウス空腸由来のオルガノイドを用いた 3 次元培養による評価について検討した。いずれの実験系も陽性対照物質として DSS を用いた。

DSS を投与したマウスにおいて、回腸に明らかな影響は認められなかった。遺伝子発現解析では、TJP-1 の発現が DSS 群において減少傾向にあった。その他 IL-1 $\beta$ などの炎症促進に関与するサイトカインの遺伝子発現量も低下した。

2 次元培養において、遺伝子発現解析の結果では、DSS 10%濃度以上で細胞が離開し、毒性が生じているものと考えられた。また、WST-8 アッセイの結果、DSS 5%濃度以上で死滅が生じているものと考えら

れた。今後は、死細胞数測定(lactic acid dehydrogenase (LDH) assay)も行い、実際に細胞死について検討することで、2次元培養条件下における毒性兆候をより明らかにする予定である。

マウス空腸由来のオルガノイドを用いた DSS の評価では、培地中への曝露により DSS 0.5、1%といった低濃度からオルガノイド組織の死滅を示唆する変化が認められた。一方、オルガノイド管腔内にインジェクション曝露した場合には、オルガノイド自体に大型化など形態的变化を認めたものの、組織が死滅に至るような傷害性変化を観察しなかった。このことから、DSS を同濃度に設定して曝露したにもかかわらず、上記のように結果に差が生じたことから、腸管管腔側(インジェクション曝露)よりも基底膜側(培地内曝露)からの DSS 処理による影響が大きいことが明らかとなった。

0.5%濃度以上の DSS のインジェクションにより TJP-1 遺伝子発現の変化や IL-1 $\beta$ 遺伝子発現の低下が見られた。

以上、腸管に関連したいずれの実験系においても DSS の曝露により TJP-1 遺伝子発現への影響や IL-1 $\beta$ 遺伝子発現低下が認められた。これは新たな腸管毒性評価における AOP となり得る可能性を示唆するものと考えた。

#### D.4.3. 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(2021)年度は、新規被験物質として腎発がん物質 5 種について、短期試験での最大耐量を用いたラット 28 日間反復経口投与試験を実施し、腎臓における病理組織学的検索及び  $\gamma$ -H2AX 形成の免疫組織化学的解析を行った。

その結果、被験物質投与群ではいずれも、腎臓における病理組織学的所見及び尿細管上皮細胞での  $\gamma$ -H2AX 形成が誘発されることが明らかとなった。これまでの結果を総合的にすると、腎臓がん物質 14 物質中 13 物質が  $\gamma$ -H2AX 陽性率の増加を引き起こした一方、非腎臓がん物質 7 物質ではいずれも対照群と同じレベルに留まった。以上の結果から、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色によって化学物質の腎臓がん性を短期間かつ高い感度および特異度で検出可能であることが示唆された。

#### D.4.4. 遺伝毒性の AOP 開発

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、RNAPI、 $\gamma$ H2AX または Ku80 を標的とした ChIP 及び rDNA unit 領域の定量的 PCR の結果から、通常時の RNAPI は rDNA unit 中の転写領域のみに満遍なく存在している一方で、紫外線 DNA 損傷誘導時には転写領域の上流に局在することが明らかになった。これらのことから、通常時の RNAPI は滞りなく rDNA を転写しているが、紫外線 DNA 損傷誘導時には DNA 損傷上で転写が阻害され、RNAPI が転写開始領域近辺に蓄積していることが示唆される。他方、 $\gamma$ H2AX 及び Ku80 については、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が明らかになった。特に、これらの局在は rDNA の非転写領域の上流 H18 及び H27 に偏っており、この DNA 領域において  $\gamma$ H2AX 及び 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。

本手法は ChIP に用いる抗体を改変する

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。今後は化学物質による DNA 損傷誘導時、そして、RPA194、 $\gamma$ H2AX、または Ku80 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.4.5. 腎障害・線維化の分子メカニズムに関する研究

APL 投与ラットにおいては広範な線維化病変が認められ、病変内の尿細管が拡張あるいは委縮していた。この線維化病変内の尿細管の形態学的な特徴は虚血再灌流障害による腎線維化ラットでみられたものと一致していた。この拡張/委縮尿細管は免疫染色において CD44 に明らかに陽性を示した。PNA 投与ラット腎臓においても軽度な線維化が認められた。APL 投与ラット腎臓と同様に、PAN 投与ラット腎臓においても線維化病変内の尿細管は拡張あるいは委縮しており、CD44 の発現が認められた。PAN 投与ラットの腎臓では、典型病変である糸球体障害およびそれに続発するとされる尿細管障害が認められたものの、間質の膠原線維の明らかな増加はみられず、拡張/委縮尿細管も認められなかった。これらの結果は、PAN 投与ラット腎臓では尿細管障害が生じているものの、その再生機構は破綻していないことを示唆していると考えられた、また、PAN 投与ラット腎臓では CD44 陽性の尿細管は認められなかった。

以上の結果は、CD44 は線維化病変内の再生機構の破綻した尿細管に発現することを示唆するものであり、CD44 の汎用性を支持するものと考えられた。



#### 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

過去に日本の対応の不備により混乱を引き起こしたり、日本の SPSF の採択率が低いといった問題点に対処するため、事前確認を実施している。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、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

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、AOPの構築に向けた課題を明らかにした。

OECD IATA Case Studies Project から AOP を用いた事例を取り上げ、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に検討に資するものであると期待している。

#### E. 結論

AOP に関しては、「カルシニューリン阻害による T 細胞依存的抗体産生抑制：AOP154」が OECD にて正式に承認され、OECD iLibrary において公開された。日本で開発された初めての AOP である。

TG に関しては、皮膚感作性試験代替法 *In Chemico* Skin Sensitisation、ADRA TG442C の改定案が令和 3（2021）年 6 月に承認された。また、同時に承認された Defined Approach for Skin Sensitisation の開発に寄与した。

本年 4 月の WNT にて、TG に関しては、*In Chemico* Skin Sensitisation、ADRA

TG442C の最終改定が承認される予定となった。DRP に関しては、*in vitro* 免疫毒性試験が合意される予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### G.1. 論文発表

1. Hirabayashi Y, Maki K, Kinoshita K, Nakazawa T, Obika S, Naota M, Watanabe K, Suzuki M, Arato T, Fujisaka A, Fueki O, Ito K, Onodera H. Considerations of the Japanese Research Working Group for the ICH S6 & Related Issues Regarding Nonclinical Safety Assessments of Oligonucleotide Therapeutics: Comparison with Those of Biopharmaceuticals. *Nucleic Acid Ther* 31, 114-125, 2021
2. Yamamoto E, Taquahashi Y, Kuwagata M, Saito H, Matsushita K, Toyoda T, Sato F, Kitajima S, Ogawa K, Izutsu K, Saito Y, Hirabayashi Y, Iimura Y, Homma M, Okuda H, Goda Y. Visualizing the spatial localization of ciclesonide and its metabolites in rat lungs after inhalation of 1- $\mu$ m ciclesonide aerosol by desorption electrospray ionization-time of flight mass spectrometry imaging. *Int J Pharm.* 2021;595, 120241.
3. Harada T, Tsuboi I, Hino, H, Yuda M, Hirabayashi Y, Hirai S, Aizawa S. Age-related exacerbation of hematopoietic organ damage induced by systemic hyperinflammation in senescence-accelerated mice, *Scientific Reports.2021*:volume 11, Article number: 23250.

4. Imamura M, Wanibuchi S, Yamamoto Y, Kojima H, Ono A, Kasahara T, Fujita M. Improving predictive capacity of the Amino acid Derivative Reactivity Assay test method for skin sensitization potential with an optimal molar concentration of test chemical solution, *J Appl Toxicol*. 2021;41(2): 303-329.
5. Kojima H. Alternatives to animal testing, *Impact*, 2021; 44-45.
6. Nishikawa A, Nagano K, Kojima H, Ogawa K. A comprehensive review of mechanistic insights into formaldehyde-induced nasal cavity carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021; 123: 104937.
7. Nishikawa A. Perspectives on the elimination of animal assays in the assessment of carcinogenicity. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021; 126:105031.
8. Kobayashi T, Toyoda T, Tajima Y, Kishimoto S, Tsunematsu Y, Sato M, Matsushita K, Yamada T, Shimamura Y, Masuda S, Ochiai M, Ogawa K, Watanabe K, Takamura-Enya T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Miyoshi N. *o*-Anisidine dimer, 2-methoxy-*N*<sup>4</sup>-(2-methoxyphenyl) benzene-1,4-diamine, in rat urine associated with urinary bladder carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2021; 34: 912-919.
9. Matsushita K, Takasu T, Ishii Y, Toyoda T, Yamada T, Morikawa T, Ogawa K. *In vivo* mutagenicity and tumor-promoting activity of 1,3-dichloro-2-propanol in the liver and kidneys of *gpt* delta rats. *Arch Toxicol*. 2021; 95: 3117-3131.
10. Chen R, You X, Cao Y, Masumura K, Ando T, Hamada S, Horibata K, Wan J, Xi J, Zhang X, Honma M, Luan Y. Benchmark dose analysis of multiple genotoxicity endpoints in *gpt* delta mice exposed to aristolochic acid I. *Mutagenesis*. 2021; 36(1):87-94.
11. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama KI, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure-activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ auto-Modeller™. *Genes Environ*. 2021; 43(1):16.
12. Honma M, Yamada M, Yasui M, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K. In vivo and in vitro mutagenicity of perillaldehyde and cinnamaldehyde. *Genes Environ*. 2021; 43(1):30.
13. Ambe K, Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M. Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2021;125, 105019.
14. Nishida H, Ohtake T, Ashikaga T, Hirota M, Onoue S, Seto Y, Tokura Y, Kouzuki H. In chemico sequential testing strategy for assessing the photoallergic potential, *Toxicology in Vitro*, 2021; 77, 105245.
15. Narita K, Okutomi H, Kawakami K, Sui H, Basketter D, Ashikaga T. Behavior of Chemical Respiratory Sensitizers in *in Vitro* Methods for Skin Sensitization, *AATEX*, 2021; 26(1), 9-18.
16. 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. *日本化粧品学会誌*. 2021;45(4):331-5.
17. Masumoto M, Fukuda I, Furihata S, Arai T, Kageyama T, Ohmori K, Shirakawa S, Fukuda J. Deep neural network for the determination of transformed foci in Bhas 42 cell transformation assay, *Sci. Rep.* 2021;2;11(1):23344.
  18. Nishida H, Ohtake T, Ashikaga T, Hirota M, Onoue S, Seto Y, Tokura Y, Kouzuki H. In chemico sequential testing strategy for assessing the photoallergic potential. *Toxicology in Vitro*, 2021;77: 105245.
  19. Seto Y, Tonami R, Iyama Y, Sato H, Onoue S. An approach to evaluate metabolite-related phototoxicity with combined use of photochemical properties and skin deposition. *Toxicology Letters*, 2021,350: 91–97.
  20. Onoue S. Establishment and international harmonization of photosafety testing strategy. *Yakugaku Zasshi*. 2021;141: 807–812.
  21. Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S. Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. *Fundam Toxicol Sci.* 2021;8: 169-175.
  22. Sasaki T, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Behavioural effects in mice orally exposed to domoic acid or ibotenic acid are influenced by developmental stages and sex differences. *Biochem Biophys Res Commun.* 2021;558:175-182.
  23. 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.* 2021;46, 531-538.
  24. 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.* 2021;8, 195-204.
  25. 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.* 2021;139, 71-78.
  26. 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.* 2021; 1-14.
  27. Tanabe S, Hirose A, Yamada T. Adverse Outcome Pathway on Histone deacetylase inhibition leading to testicular atrophy. 2021. OECD Series on Adverse Outcome Pathways No. 17.
  28. 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, *Applied Toxicology*, 2022;42(2):318-333.
29. Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A. Absence of in vivo mutagenicity of 4,4'-oxybis (benzenesulfonylhydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse. *Fundamental Toxicological Sciences*. 2022; 9(2):31-36.
  30. Grúz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K, Honma M, Sugiyama K. Potent mutagenicity of an azide, 3-azido-1,2-propanediol, in human TK6 cells. *Mutation Research*. 2022; 876–877: 503475.
  31. Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, 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.* 2022;47(2), 77-87.
  32. 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.
  33. 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;Jan 6.
  34. 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, in press
  35. 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, in press
- G.2. 学会発表
1. Kojima H. AI, iPSC and MPS Projects for Systemic Toxicity, Annual meeting on advancing 21st Century Toxicology, The Center for Alternatives to Animal Testing and the Animal-Free Safety Assessment Collaboration (2021.5.12, On line)
  2. 山本栄一、高橋祐次、栗形麻樹子、齋藤洋克、松下幸平、豊田武士、佐藤太、北嶋聡、小川久美子、伊豆津健一、斎藤嘉朗、平林容子、飯村康夫、本間正充、奥田晴宏、合田幸広. 脱離エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型質量分析イメージングによるシクレソニドの 1 μm エアロゾル吸入後のラット肺におけるシクレソニドとその代謝物の空間的局在の可視化. 日本薬学会第 36

- 年会 (2021.5.15, 徳島)
3. 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, On line).
  4. 森川朋美、豊田武士、松下幸平、赤根弘敏、小川久美子. ラットを用いたヘム鉄の 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 27 回総会・学術大会 (2021.6.10, On line)
  5. Ashikaga T. Current Views on the 3Rs Adaptation for the Skin Sensitization Testing, 11th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC11) (2021.6.16, On line)
  6. 小島 肇. 医薬部外品添加物承認申請における動物実験代替法の可能性と問題点, 第 46 回日本化粧品学会 (2021.6.26, On line)
  7. 堀端克良. Pig-a アッセイ. 哺乳動物試験研究会 第 78 回定例会 (2021.6, On line)
  8. 堀端克良. IWGT の Ames 論文の概説: 特に Ames 試験の評価について. 微生物変異原性試験研究会 第 64 回定例会 (2021.6, On line)
  9. 山本直樹, 平松範子, 佐々木洋, 近藤征史, 小島肇. 医薬品等の生殖毒性試験代替法に有用なヒト由来 iPS 細胞株の新規開発と応用, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7, 神戸)
  10. 穴戸健太, 煙山紀子, 美谷島克宏, 中江大, 他. 単層培養系および 3D 再構成系における二酸化チタンナノ粒子のヒト表皮細胞毒性評価、第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7, 神戸)
  11. 豊田武士、山田貴宣、松下幸平、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色を用いた芳香族アミンのラット膀胱に対する傷害性および発がん性短期評価手法. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7, 神戸)
  12. 赤木純一、曹永晩、豊田武士、水田保子、曾根瑞季、小川久美子. 肝発がん物質検出のためのバイオマーカーとしての EpCAM および CD13 の有用性検討. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7, 神戸)
  13. 松下幸平、豊田武士、赤根弘敏、森川朋美、小川久美子. シスプラチン誘発急性腎障害から慢性腎臓病への進展における CD44 の発現. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7, 神戸)
  14. 赤根弘敏、豊田武士、水田保子、小坂忠司、田島均、青山博昭、小川久美子. 内分泌攪乱物質による血中ホルモン値変動と病理組織学的・免疫組織化学的評価. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7, 神戸)
  15. 小島 肇. 医薬品の安全性評価に用いる動物実験代替法の現状と課題, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.8, 神戸)
  16. 田中利男, 小島 肇, 藤原道夫, 森華奈子, 山本恭子, 山田佳代子, 水谷有香, 森葵泉, 加藤由起子. ゼブラフィッシュ発生毒性試験における品質管理プロトコルの確立, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9, 神戸)
  17. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 銀ナノ粒子の抗原提示細胞活性化能の解析, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.9, 神戸)
  18. 田邊郁也, 石川晋吉, 石森かな江, 橋爪恒夫, 善本隆之, 足利太可雄: 呼吸器特異的

- な免疫応答を再現した in vitro 呼吸器感受性試験の開発, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-9, 神戸)
19. 磯貴子, 村田康允, 重田善之, 広瀬望, 堀端克良, 増村健一, 杉山圭一, 松本真理子, 広瀬明彦. Genotoxicity assessment of 4,4'-oxybis(benzenesulfonylhydrazide): a substance designated in the positive list for food utensils, container and packaging. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7, 神戸)
20. 齊藤 洋克, 北嶋 聡, 菅野 純, 種村 健太郎, 低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価-発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に-第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7, 神戸)
21. 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 (2021.7.7-9, 神戸)
22. 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-統合毒性データベースを利用した事例-, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-9, 神戸)
23. 山田隆志, 栗本雅之, 広瀬明彦. 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, Chihae Yang, James F Rathman, 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-9, 神戸)
24. 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 (2021.7.7-9, 神戸)
25. Kojima H. Asian activities for alternatives to animal experiments, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.23, On line)
26. Ashikaga T. Skin Sensitization Testing Strategy for Japan, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.24, On line)
27. Ashikaga T., Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M: Establishment of a risk assessment method and threshold of toxicological concern (TTC) concept for skin sensitization by non-animal approaches, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.27&31, On line)
28. Kojima H., Akbarsha MA, Gunatilake M, Kim BH. Marching Towards Asian Federation for Alternatives to Animal Testing (AFAAT) through Harmonization of Asian 3R Centres and Associations for Alternatives, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.27&31, On line)
29. Yamaguchi H, Oshikata A, Watatani H, Kojima H., Takezawa T. Proposal of a new applicability domain of Vitrigel-EIT (eye irritancy test) method utilizing the pH level and light absorbance of test chemical preparations, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.8.27&31, On line)
30. 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, On line)
31. Kojima H. 21st-Century Toxicology and Regulatory Testing: An Update from Japan, 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC11) (2021.9.1, On line)
32. 山口宏之, 押方歩, 小島肇, 竹澤俊明. 固体被検物質を適用するために改訂した Vitrigel-EIT 法, 日本組織培養学会第93回大会 (2021.9.3, 広島)
33. 相場節也, 木村裕, 足利太可雄, 小島肇. Multi-Immuno Toxicity Assay とガイダンス化状況, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会 (2021.9.7, On line)
34. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. シスプラチン誘発 AKI to CKD モデルラットにおける CD44 の病態生理学的役割. 第 164 回日本獣医学会学術集会 (2021.9.7, On line)
35. 足利太可雄: 皮膚感作性-IATA に基づく OECD ガイドライン-, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会 (2021.9.7, On line)
36. 足利太可雄, 西田明日香, 大野彰子, 飯島一智: 二酸化ケイ素ナノマテリアル曝露による THP-1 細胞の活性化に関する研究, 第 28 回日本免疫毒性学会学術年会 (2021.9.6-7, On line)
37. 孫雨晨, 齊藤公亮, 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. メタボローム解析を用いた薬剤性間質性肺炎のバイオマーカー探索. 第 65 回日本薬学会関東支部大会 (2021.9, On line)
38. 小林琢磨, 田島悠也, 豊田武士, 岸本真治, 松下幸平, 山田貴宣, 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. 単環芳香族アミン化合物の試験管内反応による二量体形成. がん予防学術大会 2021 (2021.9.10, On line)
39. Horibata K., Hojo M, Ando T, Yokota S, Taquahashi Y, Kobayashi N, Takasawa H, Hamada S, Sugiyama K, Honma M. In Vivo Genotoxicity Assessment of Multi-Walled Carbon Nanotubes Using the Optimized Lung Micronucleus Assay. Environmental Mutagenesis and Genomics Society 52nd Virtual Annual Meeting (2021.9, On line)
40. Gruz P, Yasui M, Ukai A, Horibata K., Honma M, Sugiyama K. Strong Mutagenicity of 3-azido-1,2-propanediol in Human Cells. Environmental Mutagenesis and Genomics Society 52nd Virtual Annual Meeting (2021.9, On line)
41. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子.  $\gamma$ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質早期検出法の開発. 第 80 回日本癌学会学術総会 (2021.10.1, 横浜)
42. 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. ラット膀胱発がん物質早期検出における  $\gamma$ -H2AX 免疫染色の特異性. 第 80 回日本癌学会学術総会 (2021.10.1, 横浜)
43. Kojima H. Current projects developing new approach methods (NAMs) for systematic toxicology in Japan, 2021 International

- Symposium on Alternatives to Animal Testing in Taiwan (2021.10.5, On line)
44. 小島肇. ガイドライン化にむけた動き, 第三回 scChemRISC 研究会 (2021.10.12, On line)
  45. Yamada T. Development and Improvement of in silico approaches for accelerating regulatory chemical risk assessment, The 9th congress of AsiaToxIV (2021.10.21, China-Online Hybrid)
  46. Kojima H. Alternative methods for developmental and reproductive toxicity testing regarding ICH S5(R3), 9th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX-IX) (2021.10.22, On line)
  47. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 岸本真治, 松下幸平, 山田貴宣, 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遺伝毒性に関わる代謝活性化機構. 環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会 (2021.11.1,横須賀)
  48. 松下幸平, 高須伸二, 石井雄二, 豊田武士, 山田貴宣, 森川朋美, 小川久美子. *gpt delta* ラットを用いた中期遺伝毒性・発がん性試験法による 1,3-dichloro-2-propanol の発がん機序の解明. 環境変異原ゲノム学会第 50 回記念大会、神奈川県、(2021.11.1,横須賀)
  49. 堀端克良, 北條幹, 安東朋子, 横田理, 高橋祐次, 小林憲弘, 高沢博修, 濱田修一, 杉山圭一, 本間正充. 最適化肺小核試験法を用いた多層カーボンナノチューブの in vivo 遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第 50 回大会 (2021.11, 横須賀)
  50. Petr GRÚZ, 安井学, 鶴飼明子, 堀端克良, 本間正充, 杉山圭一. 培養ヒト細胞における 3-アジド-1,2-プロパンジオールの変異原性. 日本環境変異原学会第50回大会 (2021.11, 横須賀)
  51. 山本直樹, 平松範子, 加藤義直, 佐藤 淳, 佐々木 洋, 小島肇. 不死化ヒト角膜上皮細胞 (iHCE-NY1) を用いた三次元角膜再構築モデルによる眼刺激性試験代替法の開発, 第 41 回日本眼薬理学会 (2021.11.6-7, 金沢)
  52. Kojima H. Utilization of Endocrine Disrupter Screening for reproductive Toxicity, 6th Asia-Pacific Symposium on Food Safety 2021 (2021.11,11, On line)
  53. 小島肇. Computational toxicology の国際動向, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11, 沖縄)
  54. 小島肇. 生殖発生毒性評価におけるゼブラフィッシュ試験の課題と挑戦, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11, 沖縄)
  55. 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)
  56. 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)
  57. 山口宏之, 小島肇, 竹澤俊明. 改定 Vitrigel-EIT 法の予測性能, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11-13, 沖縄)
  58. 水町秀之, 渡辺美香, 生悦住茉友, 梶原三智香, 安田美智代, 水野 誠, 今井教安, 佐久間めぐみ, 芝田桃子, 渡辺真一, 上野順子, David Basketter, Chantra Eskes, Sebastian Hoffmann, David M.



- Lehmann, 足利太可雄, 寒水孝司, 武吉正博, 鈴木 将, 宮澤正明, 小島肇. 皮膚感作性試験代替法 Epidermal Sensitization Assay (EpiSensA)の Validation 研究, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11-13, 沖縄)
59. 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: THP-1 細胞を用いたナノマテリアルによる抗原提示細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11-13, 沖縄)
60. 鈴尾美穂, 三浦結美, 西田明日香, 足利太可雄, 大野彰子, 飯島一智: 未分化および分化 THP-1 細胞を用いたシリカナノ粒子による抗原提示細胞活性化および MMP-12 遺伝子発現の解析, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11-13, 沖縄)
61. 大野彰子, 西田明日香, 飯島一智, 高橋祐次, 広瀬明彦, 足利太可雄: in silico による TiO<sub>2</sub>NPs の物性と THP-1 細胞への活性化の関連性解析, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11-13, 沖縄)
62. 足利太可雄: 非動物実験アプローチによる皮膚感作のリスク評価と TTC, 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.13, 沖縄)
63. 足利太可雄: 動物実験代替法の国際動向と国内への影響 -OECD ガイドライン No.497 を中心に-, 日本安全性試験受託研究機関協議会 第 3 回定期総会及び講演会 (2021.11.19, 東京)
64. 田中 利男, 小島肇, 藤原道夫, 森華奈子, 森葵泉, 澤田莉乃, 山田佳代子, 山本恭子, 水谷 有香. 次世代ゼブラフィッシュ発生毒性スクリーニングシステムの展開, 第 7 回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会 (2021.12.3, 伊勢, 三重)
65. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. 急性腎障害後に発現する CD44 は部分的上皮間葉転換を生じた尿細管において細胞外基質産生を誘導し、慢性腎臓病への移行を促進する. 第 4 回医薬品毒性機序研究会、 (2021.12.16, On line)
66. 豊田武士, 小林琢磨, 三好規之, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. オルト-トルイジンおよびオルト-アニジン代謝物の 28 日間反復経口投与によるラット膀胱への影響. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022.1.27, 神戸)
67. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子. F344 ラットを用いたナノサイズ酸化チタン(IV)の 28 日間反復経口投与毒性試験. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022.1.27, 神戸)
68. 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. ラットにおける化学物質誘発抗甲状腺作用検出における病理組織学的及び免疫組織化学的手法と血中ホルモン値との比較. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022.1.27, 神戸)
69. 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を予測するバイオマーカーとしての CD44 の有用性の検証. 第 38 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2022.1.27, 神戸)
70. Iijima K, Nishida A, Suzuo M, Miura Y, Ohno A, Ashikaga T. Analysis of antigen-presenting cell activation by nanomaterials

- using monocytic cell line. APA Nanoforum 2020 (2022.2.24-26, On line)
71. 小島肇. 化粧品の安全性評価試験法について, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.25-28, On line)
  72. 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の免疫毒性評価の試み, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.25-28, On line)
  73. 伊藤潤, 安部賀央里, 足利太可雄, 頭金正博. ヒト皮膚感作性データを用いた機械学習による in silico 予測モデルの開発, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.27, On line)
  74. 西以和貴, 大森清美. Aryl hydrocarbon receptor(AhR) アゴニストの発がんプロモーション活性, 日本薬学会第 142 年会 (2022.3.25-28, On line)