

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嵩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

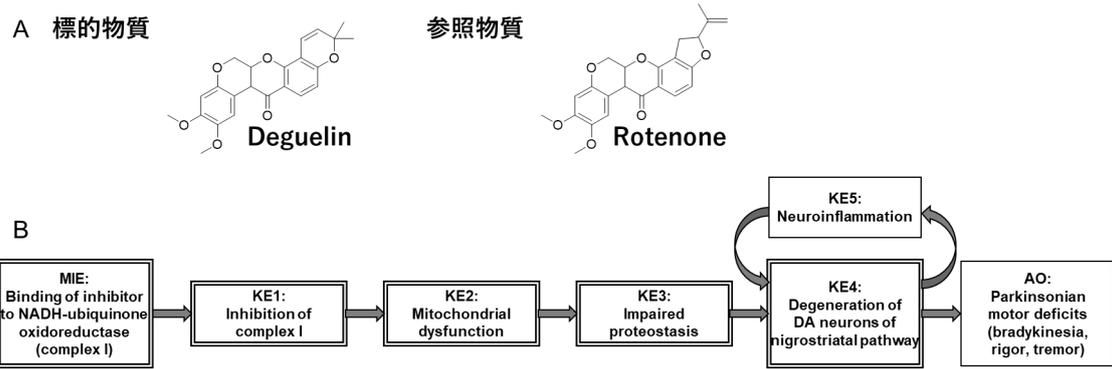


図1 パーキンソン病に繋がるミトコンドリア複合体I阻害に関するAOP
 A. 標的物質と参照物質。 B. AOP。 二重線：ケーススタディ内で評価を行ったイベント、
 一重線：評価を行わなかったイベント。

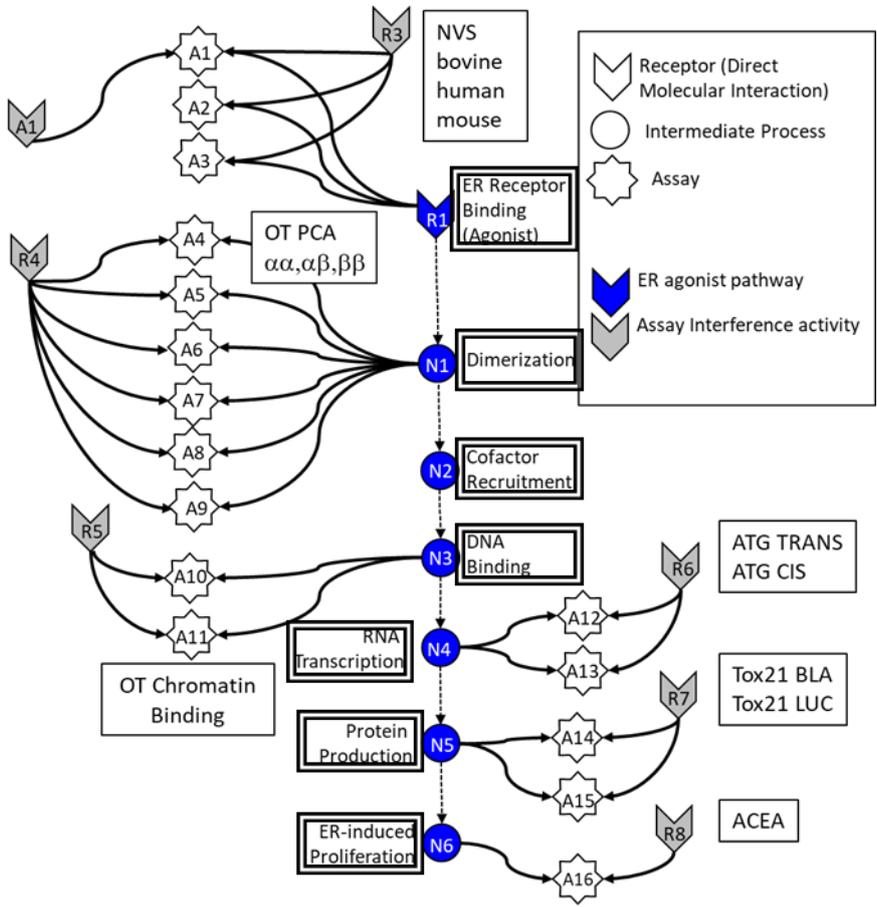


図2 AOPに基づくエストロゲン受容体活性物質のスクリーニングワークフロー
 A1-A16：各イベントを評価するアッセイ、 二重線：ケーススタディで評価されたイ
 ベント。