

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- $\kappa$ 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。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 TiO<sub>2</sub> 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