

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取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, 榎形麻樹子, 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 ニュン, 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