

別添 4

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
AI 支援型 MPS を用いたヒト iPS 由来神経細胞による神経毒性試験法の開発

令和5年度 分担研究報告書

試験法の行政利用に向けた国際動向調査

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

### 研究要旨

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS: Induced pluripotent stem cell) 細胞由来神経細胞を用いて、人工知能 (AI: Artificial Intelligence) による細胞形態評価と多点電極アレイ (MEA: MicroElectrode Arrays) による神経機能評価を組み込んだ人体模倣システム (MPS: Microphysiological system) を開発し、予測性が高い新たな神経毒性評価法を確立することである。メカニズムベースの神経毒性評価が可能となり、化審法・毒劇法の化学的基盤の確立に資するとともに、将来的には神経毒性試験のガイドライン化を目指している。本研究班の中で、試験法の行政利用の視点で、開発の現状に関する発表および情報交換、情報収集を行うとともに、本研究班における情報発信を担当した。

今年度、新たな評価法の比較対照となる経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) に提案された TG443 拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS : Extended One- Generation Reproductive Toxicity Study) の改定に向けた総説をもとに *in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) のコフォート研究の現状をまとめた。

### A. 研究目的

本研究の目的は、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS: Induced pluripotent stem cell) 細胞由来神経細胞を用いて、人工知能 (AI: Artificial Intelligence) による細胞形態評価と多点電極アレイ (MEA: MicroElectrode Arrays) による神経機能評価を組み込んだ人体模倣システム (MPS: Microphysiological system) を開発し、予測性が高い新たな神経毒性評価法を確立することである。メカニズムベースの神経毒性評価が可能となり、化審

法・毒劇法の化学的基盤の確立に資するとともに、将来的には神経毒性試験のガイドライン化を目指している。本研究班の中で、試験法開発の現状に関する発表および情報交換、情報収集を行うとともに、本研究班における情報発信を担当した。

今年度、新たな評価法の比較対照となる経済協力開発機構 (OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development) に提案された TG443 拡張一世代生殖毒性試験 (EOGRTS : Extended One- Generation

Reproductive Toxicity Study) の改定に向けた総説をもとに *in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) のコホート研究の現状を調査した。

## B. 研究方法

OECD に提案された TG443 EOGRTS の改定案は、欧州化学品庁 (ECHA: European Chemicals Agency) により、2023 年 3 月に発表された EOGRTS 総説をもとにしている。この総説中の *in vivo* DNT のコホート研究の動向に着目して、情報をまとめた。

### 倫理面への配慮

実験を伴わないことから、倫理的問題は無いと考える。

## C. 研究結果

### C-1. ECHA 総説

ECHA により設立された EOGRTS 評価プロジェクトは 2021 年 3 月から 2 年間実施され、2023 年 3 月に総説が発表されている。本プロジェクトの目的は、REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) で施行されている TG433 の性能を評価し、有害性評価に関連する情報が適切に提供されているか、REACH 登録ドシエにおける EOGRTS の性能の特異的な側面を評価しているかであった。

総説の中には、7 つの主要な問題点が示され、その一つとして、DNT 調査の特異的な問題点が挙げられている。具体的には、55 の研究報告書から、24 の DNT コホート研究が評価され、性能の改善が求められており、方法、解析、報告書に欠点を抱えているとされている。

総説中に以下の記載がなされている。

DNT コホート研究の中で、多くの試験施設が報告書の中で EOGRTS の詳細を記

載していない。その結果、解釈を妨げる欠陥がかなりの頻度で見つかった。

すべての研究において、必須である陽性対照および過去の対照データが不足していた。陽性対照のデータがないため、試験施設の化学物質の曝露による発達期に続く異常な事象を検出することが難しかった。また、生物学的に関連する変化の程度をより適切に解釈できるテストシステムのダイナミックレンジに関する情報も提供されていなかった。

さらに、過去の対照データがないため、報告書内の対照データが以前の測定と一致しているか不明であった。なぜなら、DNT 調査の統計的検出力はグループあたりの動物の数が少ないと特に低くなるからである。他の試験や公表されたデータと比較した過度のばらつきは、試験施設における試験条件において適切な対照がなかったことを示している。同時に、陽性対照や過去の対照データの不足は、偽陰性を生み出す可能性がある。

また、統計解析が不十分だったことも不備の一つであった。最も一般的なこととして、性別はモデルに含まれていなかった。その結果、性特異的な影響、またはその欠如の結論を導くことはできなかった。

正しい統計解析がないため、雄と雌の異なる小さな影響を、関連する限界と見なすべきではない。これに対処するには、組み合わせと性別固有の両方を評価することが推奨されている。組み合わせの場合、統計的検出力が高くなるので、性別特異的な事象を見落とさないことになる。統計解析の不備は、NOAEL 値の不確実性につながり、適切な結論を妨げる可能性がある。不十分な統計解析が行われた場合、適切な結論を導き出すために統計学的再解析が必要になる場合がある。

プロジェクト中で評価された事例では、脳の重量と脳の形態測定が最も敏感なパラメータとして観察され、一般に、脳の有害性は脳の重量、寸法、形態測定および組織病理学の変化により検出される。

全体として、提供されたデータの独立的な評価により、次のようないくつかの課題が提起されている。これらの研究は、多数の試験における固有の方法の不備、または異なる試験に共通する不備により結論が確認できていなかった。

さらに、全研究の中で一部の研究報告には、必要な情報が限定されていた。偏りが無い動物実験同様、使用する機器に関する情報、無関係な実験要因の対照、試験実施時刻など、報告書では詳細な項目が重要である。

最後に、プロジェクトの調査結果は、発達神経毒性に関連する EU 規則に参照される最新の OECD 試験法ガイドラインおよび OECD/EU ガイダンス文書で報告されている方法と結果に関与しておらず、重要な改良が必要としている。正規とランダム観測値を含むすべての観測値が報告され、観察は十分な感度で行われることが必須である。

## C-2.OECD 対応

ECHA は EOGRTS 総説をもとに、OECD に TG433 および GD151 (TG433 補助文書) を改定するプロジェクトの提案を行った (添付資料 1)。OECD に提案された目的は、EOGRTS の計画、施行、解析および報告書の改良である。

OECD 試験法ガイドラインプログラム各国調整官作業班 (WNT) は、このプロジェクトを認める条件として、専門家グループで TG433 や GD151 の改定を議論するだけでなく、2024 年の後半に OECD WNT 主催のワークショップを開き、EOGRTS の

予期せぬ/課題について議論することを推奨した。

## D. 考察

今後の専門家間の議論や OECD ワークショップを経て、国際的な合意がなされた上で、TG433 や GD151 の改定がなされることを期待している。DNT は EOGRTS コホート研究の重要な指標であると考えられ、今後の動向には注意が必要と考えている。この改定は対照となる *in vivo* データの信頼性に関わるものであるとともに、新たな *in vitro* DNT 法の開発にも関係してくると思われる。本改定に関する継続的な動向把握は必須であると考えている。

## E. 健康危険情報

特になし

## F. 結論

ECHA による EOGRTS 総説をもとに、OECD に TG433 および GD151 を改定するプロジェクトが提案されている。

DNT に関する新規評価法を開発する上でも、この TG の改定動向には今後も注目していくべきと考える。

## G. 参考文献

- 1) OECD (2018) No. 443, Guideline for the testing of Chemicals, Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, OECD, Paris
- 2) OECD (2011), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris
- 3) ECHA, Final report of the EOGRTS review project, Evaluating results from 55

extended one-generation reproductive  
toxicity studies under REACH, 2023

## **H. 研究発表**

### **H-1. 論文発表**

特になし

### **H-2. 学会発表**

特になし

## **I. 知的財産権の出願・登録状況**

(予定を含む。)

### **I-1. 特許取得**

該当なし

### **I-2. 実用新案登録**

該当なし

### **I-3. その他**

該当なし

## 添付資料

- 1) SPSF for revision of OECD TG  
443(EOGRTS) and GD151

添付資料

**OECD TEST GUIDELINES PROGRAMME**

**Standard Project Submission Form**

If you require further information please contact the OECD Secretariat  
Return completed forms to:  
Anne Gourmelon (anne.gourmelon@oecd.org)  
and Araceli Giralá-Rodríguez (araceli.giralarodriguez@oecd.org)

---

**PROJECT TITLE**

Revision of OECD TG 443 (EOGRTS) and GD 151

**SUBMITTED BY (Country / European Commission / Secretariat)**

European Commission

**DATE OF SUBMISSION TO THE SECRETARIAT**

15 November 2023

---

### DETAILS OF LEAD COUNTRY/CONSORTIUM

<b>Country /Organisation:</b>	European Commission, Denmark, Netherlands
<b>Agency/ministry/Other:</b>	ECHA (on behalf of EC) National Food Institute, Technical University of Denmark, Research Group for Molecular and Reproductive Toxicology, Denmark (Supported by DK EPA) National Institute for Public Health and the Environment, Netherlands
<b>Mail Address:</b>	European Chemicals Agency P.O. Box 400, FI-00120 Helsinki, Finland
<b>Phone/fax:</b>	358-9-68618681
<b>Email:</b>	<a href="mailto:ingo.bichlmaier@echa.europa.eu">ingo.bichlmaier@echa.europa.eu</a> <a href="mailto:laura.rossi@echa.europa.eu">laura.rossi@echa.europa.eu</a> <a href="mailto:valerie.zuang@ec.europa.eu">valerie.zuang@ec.europa.eu</a> <a href="mailto:sochr@food.dtu.dk">sochr@food.dtu.dk</a> <a href="mailto:Betty.Hakkert@rivm.nl">Betty.Hakkert@rivm.nl</a>

---

## **PROJECT OUTCOMES**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> New Test Guideline                     | <input checked="" type="checkbox"/> Revised Guidance document |
| <input checked="" type="checkbox"/> Revised Test Guideline      | <input type="checkbox"/> Detailed Review Paper                |
| <input type="checkbox"/> Deletion of an existing Test Guideline | <input type="checkbox"/> Other, please specify below          |

ECHA performed an EOGRTS review project as per request from European Commission and OECD. The main objectives of the project were to:

- Evaluate the performance of the OECD TG 443 study as implemented in REACH, and its adequacy for providing information relevant for hazard assessment; and
- Evaluate specific aspects of the performance of available EOGRTS in REACH registration dossiers with respect to study design, conduct, and toxicological findings.

The review project was performed between March 2021 to March 2023 and the final project report was published on March 2023 (available at:

[https://echa.europa.eu/documents/10162/17228/final\\_report\\_eogrts\\_review\\_project\\_en.pdf/9d0b31f1-eff0-e9db-be8c-ac72d5e4b2e5?t=1679916891564](https://echa.europa.eu/documents/10162/17228/final_report_eogrts_review_project_en.pdf/9d0b31f1-eff0-e9db-be8c-ac72d5e4b2e5?t=1679916891564)) (Attachment 1). ECHA presented its observations to the WNT members during WNT-35 meeting in 2023 and the suggested way forward (Attachment 2).

Based on the findings it became clear that targeted revision of the OECD TG 443 is needed. Those revisions are clarifications and specifications on methodology of endpoints to be assessed in TG 443 or how data should be to be reported. These revisions are intended to be quick fixes to the existing TG and GD. This revision would therefore be targeted to only those issues identified, and it is not proposed to open any other parts of the OECD TG 443. The proposed revisions/clarifications are specified in the Attachment 3 and the exact wording will be discussed in the Expert group before implementing.

In addition, it was observed that additional guidance would be needed to be included into the GD 151, concerning Cohort 3, criterium description used to identify follicle counts, and improved guidance on how to measure nipple retention and anogenital distance in rodent studies. Additional details are included in Attachment 4.

## **PROPOSED WORK PLAN and RESOURCE NEEDS:**

1. Draft workplan for development of the proposal, including any need to establish Ad Hoc Expert Group and mode of meetings (face-to-face, teleconference; electronic discussion group).

Indicate key milestones, including first and subsequent drafts of documents and timing of meetings.

As the proposed revision of the TG 443 and GD 151 are interlinked, it is suggested either to use the existing Expert Group on Reproductive and Developmental Toxicity or to establish an ad hoc Expert Group for the project. Due to these interlinks these two separate revisions are submitted in a single SPSF project proposal.

Due to the targeted nature of the revision of the OECD TG 443, the TG 443 may be ready for WNT adoption before the GD 151, and if so, the adoption of the TG 443 should not be delayed because of GD 151. Therefore, depending of the progress, the two documents may be submitted for adoption at different stages.

Expected timelines:

- SPSF submission for review (15 November 2023)
- Leads to address comments from WNT and review SPSF as appropriate (February 2024)
- WNT to decide if the project is to be included into the workplan (April 2023)
- Nomination of ad hoc expert group / call for additional members in the existing EG, if needed (May 2024)
- First virtual meeting to discuss the proposed revisions of GD 151 and TG 443 (June 2023).
- Draft revised OECD TG 443 submitted for revision to the EG (August 2024)
- Draft revised GD151 submitted for revision to the EG (Autumn 2024)
- Circulation of the draft revised TG 443 version for 1<sup>st</sup> WNT commenting round (November 2024), second commenting February 2024
- Circulation of revised draft GD 151 for 1<sup>st</sup> WNT commenting round Q1/Q2 2025 and 2<sup>nd</sup> WNT commenting round Q3/Q4 2025.
- If feasible, revised TG 443 submitted for adoption for WNT-36 (April 2025)
- If feasible, revised GD 151 submitted for adoption for WNT-37 (April 2026).

Draft documents circulated to the EG for commenting before WNT consultation at suitable timepoints.

2. Will additional information, including generation or collection of data, be required? If yes, please describe the anticipated process and timelines.

No new data needs to be generated. The EOGRTS review project results are to be used as background data.

3. Indicate the estimated overall resource need (time/money) for member country / consortium and Secretariat

Participation in tele/video conferences, and review of documents. Estimated total time of 1-7 days per person depending on tasks required. Secretariate to chair the EG meetings together with lead.

4. Is this proposal intended to replace an existing Test Guideline or lead to the deletion of an existing Test Guideline?

The project intends to revise the TG 443 and GD 151.



---

## ESSENTIAL INFORMATION

**In this section, please provide the information required by the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme to assess the suitability of the project for the workplan of the Test Guidelines Programme**

1. What is the existing or expected regulatory need/data requirement that will be met by the proposed outcome of the project? Please provide details below or as an attachment.

The EOGRTS (OECD TG 443) is an information requirement in EU for various regulations. The data from OECD TG 443 is used across all OECD countries.

or as attachment No. \_\_

2. How will the work contribute to further international harmonisation of hazard and risk assessment? Please provide details below or as an attachment.

The revisions of the two documents are intended to improve proficiency in the data generated via the EOGRTS and to reduce variability in the results generated.

or as attachment No. \_\_

3. How will the proposed project address issues and /or endpoints which are of major human health or environmental concerns? If there are existing Test Guidelines or projects in the work plan of the Test Guidelines Programme covering the same endpoint, please refer to these and describe the added value and usability of the proposed new test method. Please provide details below or as an attachment.

The EOGRTS is the current reference method/standard for assessing reproductive toxicity.

or as attachment No. \_\_

4. Will the project have general support from OECD member countries or is the outcome relevant for just one or a few member countries / stakeholders? Provide details of the countries and the rationale for this view below.

Many countries       A few countries       Only for the submitting country

- 
5. If the Test Guideline is not intended for general use, indicate if the Test Guideline would be intended for:

Specific (limited) applications such as pesticide usage, or

for specific classes of chemicals (e.g. surfactants) rather than for chemicals in general.

6. If the expected outcome of this proposal is a Test Guideline or a Guidance Document, provide information on the intended use, applicability and limitations of the test method.

Generally applicable to chemicals, biocides, and pesticides etc.

7. Provide supporting information on the validation status (i.e. relevance and reliability) of the method. Principles for validation of test methods for OECD Test Guidelines are described in Guidance Document 34.

Provide justification and rationale for the test, including data.

If there are no or limited data available to support the reliability and relevance of the proposed test, indicate if validation work is included in the project.

If there is no need for validation, provide a detailed justification.

There is no need for validation. The project focuses on updating the existing OECD TG 443 and the GD 151 based on the data already generated with the TG 443.

8. Describe if the test method includes components, equipment or other scientific procedures that are covered (or pending) by Intellectual Property Rights (IPR) (e.g., patents, patent applications, industrial designs and trademarks). Information should be provided on the overall availability of the IPR-protected components including whether they are commercially available or require a Material Transfer Agreement (MTA) or other licensing agreements. In addition, a description of the IPR-covered component/test system should be disclosed.

8.1 Nature of protected elements (e.g. reagent identity, cell line identity, specific process, etc.):

n/a

8.2 Form of protection (e.g. trademark, patent, etc.):

n/a

8.3 For users to access protected elements, please tick the relevant box(es):

MTA required       License requirement       No agreement required

8.4 Are you providing the agreement document(s) referred to in 8.3 with the SPSF:

Yes  No      If no, what's the reason?

n/a

8.5 How and where can users get access to protected elements?

n/a

8.6 Has any search for existing patent(s) possibly associated with this test method been performed (e.g. through patent search or Freedom-To-Operate search). If yes, what was the outcome?

n/a

**IMPORTANT NOTE: Should the OECD and Expert Group working on the Test Guideline development discover that the information provided under Item 3 on IP elements be erroneous or be evolving in the course of the project, the project itself might be re-considered, suspended or cancelled.**

9 Have Performance Standards been developed?  Yes  No  
 N/A

---

### **ADDITIONAL INFORMATION**

**In this section please provide further information to allow the Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines Programme to assess the suitability of the project for the workplan of the Test Guidelines Programme**

1. If the expected outcome of the project proposal is a Test Guideline and is based on existing, regional or international documents such as guidelines, protocols or guidance material, please provide that information here or as an attachment.

The proposal is the revision of TG 443 and GD 151.

or as attachment No. \_\_

2. If Animal Welfare considerations are addressed in the project proposal, provide details below or as an attachment. Explain if the project is aimed at refining, reducing and/or replacing the use of animals.

If the project is not specifically developed for animal welfare purposes, indicate if the animal welfare considerations have been a component of the project proposal.

Indicate if animal welfare considerations are irrelevant to the project, for example for physico-chemical properties.

n/a

or as attachment No. \_\_

3. Provide information on expected or possible resource savings in member countries as a result of this project.

The proposed revision of OECD TG 443 and GD 151 will help to improve the existing TG and GD 151 as it currently contains unclear elements.

4. If the expected outcome of the proposed project is a Guidance Document or Detailed Review Paper, will it be directly linked to the development of a particular Test Guideline or a series of Test Guidelines?

- Yes, it is the initial step in the development of a new or revision of existing Guidelines.
- Yes, additional guidance is needed for the most appropriate selection of the Guidelines on the subject.
- No, the guidance is on issues related to testing or the development of Test Guidelines in general.

---

**There are   4   attachments added to this form.**

---