

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5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。

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

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。

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。

- 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>

2019-5: 「分岐鎖が異なるカルボン酸によるリードアクリルを用いた 2-エチル酪酸の 90 日間反復投与毒性 (OECD408) 予測」、2016-5: 「曝露の考慮と非動物的手法に基づく化学物質安全性評価ワークフロー」、2020-1: 「1%フェノキシエタノール配合ボディローションの IATA を用いた全身毒性評価」、2021-8: 「皮膚感作性への IATA の適用 - グラニオールを用いた NGRA フレームワークの実証-」、の計 4 件の AOP を用いたケーススタディを対象に、また、比較として、非 AOP ケーススタディ 1 件、2017-4: 「リアルアルコールアルキルカルボン酸エステルの IATA を用いた亜慢性反復投与毒性のリードアクリル」、計 5 件の調査を実施した。

(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. OECD IATA Case Studies Project ケーススタディの調査

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MIEや各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AOPを用いたケーススタディと、比較対象として1件の非AOPケーススタディについて調査した。

ケーススタディ「分岐鎖が異なるカルボン酸によるリードアクロスを用いた2-エチル酪酸の90日間反復投与毒性(OECD408)予測」は、肝脂肪症に関連する複数のAOPを統合してAOPネットワーク(図1)を構築し、そこに内包されるMIEとKEを試験し、リードアクロスにより、陽性対照に比べ毒性が低いことを示し、PBKモデルを構築し、ラット、ヒトにおける経口透過用量を算出した。機序の信頼性、MIEプロファイルの体系的な評価が高く評価された。特に、AOPネットワークというコンセプトの提唱が興味深い。一方、参照物質の*in vivo*データの少なさやAOPネットワークが未承認であるとの指摘があった。

3件のケーススタディは、動物試験を実施しない次世代リスク評価(NGRA)のIATAワークフロー(図2)を提案し、試行、発展させたものである。既存情報の収集による曝露の推定、内部曝露の推定や毒性仮説の設定、非動物手法による精緻化や不確実性評価などの段階を経て、TTCやリードアクロスによりリスク評価を行うとしている。

「曝露の考慮と非動物的手法に基づく化学物質安全性評価ワークフロー」は、ワークフローを提案し、ピペロニルブトキシドの化粧品としての経皮曝露について、使用シナリオに基づく曝露量に対し、脂肪肝、肝線

維症のAOPを元に肝毒性リスクを評価した。評価の早い段階で曝露を考慮し、TTC、リードアクロス、QSAR、*in vitro*試験、オミクスなど多様な手法を統合している点が評価され、非動物手法に焦点を当てた新規性も注目された。一方で、非常に複雑なワークフローのため、専門家の判断と詳細な正当性の検討が必要となることが課題となった。

「1%フェノキシエタノール配合ボディローションのIATAを用いた全身毒性評価」はフェノキシエタノールの代謝物フェノキシ酢酸に着目し全身毒性を予測した。さまざまなAOPに関連するヒトタンパク質やヒト細胞を用いた試験群(スクリーニングキット)、トランスクリプトーム解析からPoDを導出し、毒性の懸念が低いこと、およびこの手法がウサギ90日試験に基づくPoDより安全性が高いことを示した。先進的な試みではあるものの、試験や細胞株の種類の妥当性や、不確実性への影響について理解不足であり、未だ概念実証段階にあると指摘された。

2021-8:「皮膚感作性へのIATAの適用-ゲラニオールを用いたNGRAフレームワークの実証-」はOECDにて承認されている皮膚感作AOPに基づき、確定方式(DA)により、皮膚感作性を予測した。DAは専門家による個別判断を介在せず、*in vitro*試験や*in silico*ツールの結果を、あらかじめ定められたデータ解釈手順に基づき解釈することで、誰がやっても同じ結論が得られる手法である。OECD GD256とOECD TG497に記載されている計5種類のDA(表1)を検討した。WoEとしての使用には好意的な反応が得られたが、DAのデータセットの少なさなどの不確実性の指摘があった。

すでに動物試験の実施が禁止されている化粧品業界のニーズに基づき、NGRAワー

クフローを提唱した先進性、近年開発が進められている多様かつ先進的な非動物試験や予測ツールを統合的に用いた点、ヒト由来の試験系により種間外挿が不要となる点が興味深い。

非 AOP 事例である「アリアルアルコールアルキルカルボン酸エステルの IATA を用いた亜慢性反復投与毒性のリードアクロス」は、構造、*in vivo/vitro* の TK/TD、化学的、生物学的相互作用の共通性に着目し、標的物質群の共通代謝物アリアルアルコールが毒性をもたらす主要因とした。リードアクロスにより毒性を評価した。広範なデータによる WoE が評価された一方、*in vivo* データの不足や質に関する疑問が挙げられた。AOP のような毒性機序を示さずとも、共通代謝物に着目し側鎖長の異なる多数の物質をカテゴリー化して一括評価できる点は興味深い。

以上の事例と、昨年度調査した事例から、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 が不完全あるいは不明であっても、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。

⑤ 代謝物に毒性があるかは重要であり、代謝物の生成速度も含め、十分な議論が求められる。

⑥ AOP に基づき *in vitro* 試験を行う場合、カバーすべき KE の数、それに十分な試験数や細胞の種類について議論が必要である。AOP ネットワークや KE に関する HTS による網羅的な試験は有効な手段となりうる。

以上から、AOP には、

- 各種臓器への影響（全身毒性）を漏れなく検討することは難しい（網羅性）。
 - 陽性の証明は可能だが、陰性の根拠としては（網羅性の面から）限界がある。
 - 確立されている AOP は未だ多くない。
- といった課題がある一方、
- 類似物質や仮説、*in vitro* 試験の説得力のある根拠となる。
 - ヒトへの外挿において有用な情報になる。

という明確な優位性が示された。

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。近年の AOP に関する精力的な知見の蓄積により、個々の AOP の報告数が増えるだけでなく、複数の AOP を用いた AOP ネットワーク、スクリーニングキット、多様な画定方式（DA）など、AOP に基づく概念やツールが広がってきている。これにより、網羅性の向上や不確実性の低減などの可能性も示されてきている。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。

本プロジェクト終了後も IATA Case Studies Project のさまざまな事例の調査を継続し、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必要がある。

D. 健康危険情報

特になし

E. 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。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

1. 山田隆志, 丸山 (薦田) 多恵子. 化学物質のヒト健康影響評価に資するリードアクロス -行政リスク評価への適用を目指して-. *CICSJ Bulletin* 2023, Vo.41, No.1, 6-10.
2. Myden A, Stalford SA, Fowkes A, White E, Hirose A, Yamada T. Enhancing developmental and reproductive toxicity knowledge: A new AOP stemming from glutathione depletion. *Curr Res Toxicol.* 2023 Sep 15;5:100124.
3. 山田隆志. Next Generation Risk Assessment への期待と課題 (動物実験代替法と New Approach Methods の開発・利用動向. 監修:小島肇夫. 発行日: 2023.9.29, シーエムシー出版)

F-2 学会発表

1. Yamada T, Tamehiro N, Teratani N: Case

studies on refining risk assessment of food-related substances with New Approach Methods. (13th Global Summit on Regulatory Science (GSR23), Parma, 2023.9.27).

2. Yamada T, Katsutani N, Hirose A, Hill E, Fowkes A, Stalford S, Myden A: An Adverse Outcome Pathway for histone deacetylase inhibition leading to axial skeletal defects: Development and potential to improve decision support in chemical safety assessment. (12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC12), Niagara Falls, August 30, 2023).
3. 山田隆志: 次世代リスク評価の信頼性構築へ向けた New Approach Methodology の活用の課題. (第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.19)
4. 勝谷成男, 山田隆志, 広瀬明彦, Emma Hill, Adrian Fowkes, Susanne A. Stalford, Alun Myden: ヒストン脱アセチル化酵素阻害から発生毒性につながる AOP の開発. (第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
5. 丸山 (薦田) 多恵子, 山添康, 齊藤亮子, 山田隆志: 試験データベース解析に基づく肝毒性関連情報の抽出—予測精度向上を目指して. (第 50 回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)

F-3. シンポジウム/講習会/Work Group での発表

1. Yamada T: Development and application of toxicity databases for improvement of *in silico* approaches for regulatory chemical safety assessment. (OECD 20th Meeting of

the QSAR Toolbox Management Group,
Boulogne, France, 2023.11.17).

2. 山田 隆志: NITE QSAR/リードアクロス講習会 ヒト健康影響に関連した(Q)SAR とリードアクロス・最新動向 (東京-Online Hybrid, 2023.10.11)
3. 山田 隆志: *In silico* 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づくヒト健康リスク評価の効率化・迅速化を目指して. シンポジウム [リスク評価手法の現状と今後], 2023 年日化協 LRI 研究報告会 (東京, 2023.8.25)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

G-1. 特許取得

なし

G-2. 実用新案登録

なし

G-3. その他

なし

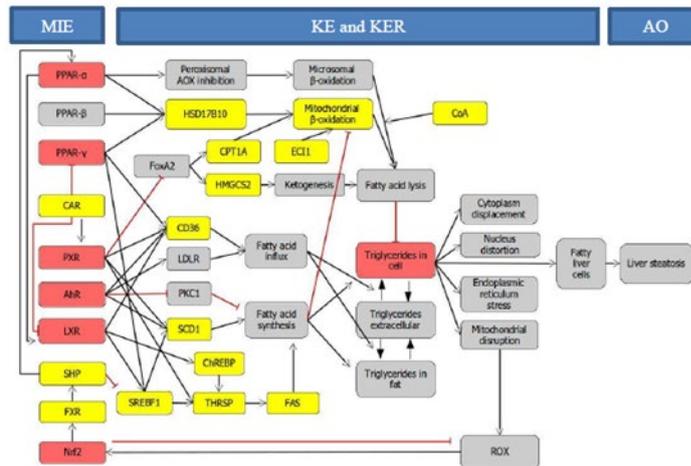
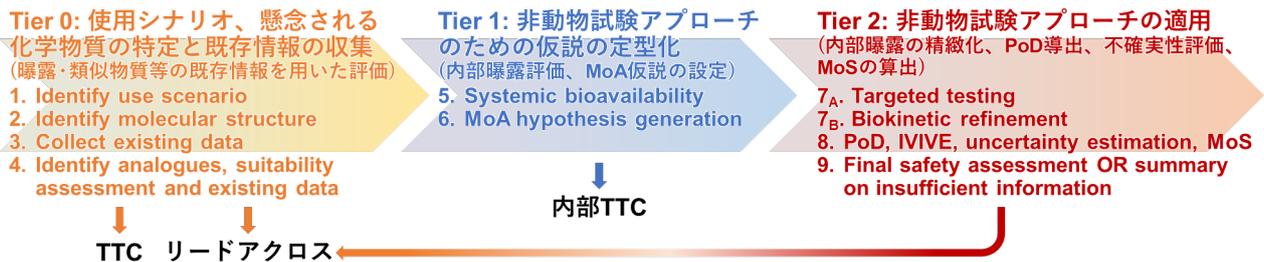


図1 肝脂肪症に関連する複数のAOPを組み合わせたAOP ネットワーク
 赤：陽性対照物質について既知のMIE/KEのうち、ケーススタディ2019-5で測定したもの。
 黄：陽性対照物質について文献に記載がある、またはデータマイニングから推測されたMIE/KE。 ケーススタディではこのほかに、KE「小胞体ストレス」も測定した。 黒矢印：活性化、赤矢印：抑制。



TTC: Threshold of toxicological concern、毒性学的懸念の閾値
 MoA: Mode of action、作用機序
 WoE: Weight of evidence、証拠の重みづけ
 PoD: Point of departure、毒性評価値を求める際の基点、NOAEL、EC₅₀、BMDLなど
 IVIVE: *In vitro-in vivo* extrapolation、*in vitro-in vivo*外挿
 MoS: Margin of safety、安全域

図2 曝露の考慮と非動物的手法に基づく安全性評価ワークフロー

表1 ケーススタディ2021-8で検討した5種類のDA

DA1	ITSv1 DA	感作能分類	OECD TG 497
DA2	人工神経ネットワークモデル	感作能予測	OECD GD 256
DA3	STS (2段階)	ハザード特定→感作能分類	OECD GD 256
DA4	ベイジアンネットワーク ITS	ハザード特定+感作能予測	OECD GD 256
DA5	SARA モデル	感作能予測	OECD GD 256

ITS: Integrated Testing Strategy, STS: Sequential Testing Strategy, SARA: Skin Allergy Risk Assessment