

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 5 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班（WNT: Working Party 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、TG に関しては、既存の TG である皮膚感作性試験代替法 DPRA（Direct Peptide Reactivity Assay）重量法を含む TG442C 及び皮膚感作性試験代替法 IL-8 Luc assay を含む TG442E の改定をなすことができた。さらに、*in vitro* 免疫毒性試験 IL-2 Luc assay が TG444A として公表された。

AOP に関しては、免疫毒性「IL-1 receptor 結合阻害：AOP277」が、10 月末 OECD に承認され、AOP No.30 として i-library に収載された。発がん性の Pathogenesis of chemically induced nasal cavity tumors in rodents: contribution to adverse outcome pathway が *J Toxicol Pathol.* に掲載された。

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

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

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 室長

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班 (WNT: Working Party 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) 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

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 (足利も委員の一人)。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) や KER (Key Event Relationship) を定めて、OECD に指定された外部 (または scientific) reviewer 及びコーチの指摘事項に対応することで 4 本の AOP 開発を進めた。

B-1-2. 発がん性の AOP

研究分担者小川は、研究協力者西川の

協力を得て、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、動物種、投与経路、及び誘発された鼻腔腫瘍の組織型、関連する非腫瘍性病変並びに遺伝毒性のデータを網羅的に検討し、化学物質暴露による鼻腔発がん全般の AOP に関する論文として取りまとめた。投稿論文は、査読後、指摘事項への対応を行った。

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 DRP の開発

B-2-1. 皮膚感作性試験

- 1) 既存の TG442C に収載された DPR (Directive Peptide Reactivity Assay) に重量法を追加するため、研究分担者の小島、研究協力者の笠原及び小島幸一に加え、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。
- 2) 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 OECD に提出し、各国からの改定要望に対処した。
- 3) EpiSensA が TG442D に収載されることを目的に、小島は、研究協力者の宮澤らとともに、TG 案を OECD に提出し、各国からの改定要望に対処した。
- 4) 小島と足利は、皮膚感作性試験の確定

方式 (Defined Approach for Skin Sensitisation : DASS) のプロジェクトに参加し、ガイドラインの改定に協力した。

B-2-2. 免疫毒性試験

- 1) 小島は、研究協力者の相場及び国際的な専門家とともに、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、各国からの改定要望に対処した。
- 2) 足利は、新たな試験法として、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) の公定化を目指し、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。
- 3) 小島は、研究協力者の相場とともに、2) で review が終わった IL-2 Luc LTT のバリデーション報告書及び第三者評価報告書を OECD に提出し、各国からの改定要望に対処した。

B-2-3. Bhas42 細胞形質転換試験法の TG 開発

Bhas42 細胞形質転換試験法 (Bhas42CTA) は、化学物質の非遺伝毒性発がん性の検出が期待できる OECD 唯一の *in vitro* 試験法 (GD231) である。分担研究者の大森は本試験法の SPSF (Standard Project Submission Form) 案を作成した。

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 mode of action (MoA) 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に提案することになっている。

小川、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に参加した。

B-3-2. 光毒性 IATA

1st commenting round の際に集められたコメントに従って尾上及び小島は光毒性 IATA 案を修正した。

B-3-3. 発達神経毒性に起因する行動解析に関する情報収集

昨年度に引き続き、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-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。

B-4-1-1. 腸管由来組織における代替法の検討

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 (Dextran Sulfate, Sodium: MP Biomedicals, MW36,000~50,000 富士フィルム和光純薬 (株)) を 5.0% の濃度で 3、5 または 7 日間飲水投与して、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。この検討により早期段階から生じる腸管の病態を探索するとともに、AOP の候補となり得る炎症関連因子をはじめ、腸

管バリア機能、セロトニン関連因子（受容体）について探索した。

2) マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

上記 1-1)より採取した C57BL/6J マウスより対照群並びに DSS 処置を施した動物由来の空腸オルガノイドを作製し、定法に従ってマトリゲルにて 4 日間培養した後、各条件のオルガノイドを回収し、遺伝子発現解析を実施した。この検討により *in vivo* と同様に、マウス小腸由来のオルガノイドにおいても AOP の候補となり得る因子（腸管の炎症関連因子をはじめ、腸管バリア機能、セロトニン作用関連）について探索した。

3) 腸管軸に着目した腸管傷害に起因した肝臓病態の修飾効果の検討

6 週齢の雄性 C57BL/6j マウスを用い、1.25%DSS 水の 1 週間毎の間歇飲水投与を 3 週間実施した。食餌はコリン欠乏メチオニン低減アミノ酸 - 高脂肪食 (CDAA-HF 食) を与えた。解剖時には、大腸及び肝臓を採取し、遺伝子発現解析及び病理組織学的解析を実施した。この検討により腸管バリア機能の傷害による肝臓病態の増悪を探索し、肝線維化の AOP の候補となり得る炎症関連因子の変動を探索した。

B-4-1-2. 肝臓における代替法の検討

肝線維化の AOP 開発に資する実験データを得るため、昨年度までに、肝線維化には星細胞の活性化とともに細胆管反応が重要であり、SRY-box9 (SOX9) 及び Cluster of Differentiation 44 (CD44) が関与していることを報告した。今年度は、肝線維化モデル動物における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。

1) 肝線維化のモデル動物として、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高脂肪食 (CDAA-HF) を長期に投与した際の組織学的な観察ならびに RNA-Seq.によるシグナル変動を解析した。

2) 肝星細胞における線維化についての *in vitro* モデルとして、ヒト培養肝星細胞株 (LX-2) を用いた検討を行った。LX-2 に TGFβ1 10ng/mL 1 時間または 48 時間刺激後、形態学的観察、遺伝子あるいはタンパク発現について解析し、星細胞の活性化について検討した。また、TGFβ1 受容体阻害剤の前処置による同様の検討も行った。

3) 胆管上皮細胞における線維化についての *in vitro* モデルとして、マウス肝オルガノイド培養を用いた検討を行った。マウスから肝臓を単離し、コラゲナーゼ処理後にマトリゲル上にて三次元培養を行い、オルガノイドを得た。得られたオルガノイドに対して、胆管上皮マーカーとして Cytokeratin 19 (CK19)、SOX9、CD44 の免疫染色を行った。また、TGFβ1 30ng/mL 24 時間刺激を行い、形態学的観察と、CK19, SOX9, CD44 ならびに αSMA, Collagen Type 1, Collagen Type 4, Fibronectin 遺伝子発現の変動を検索した。

B-4-2. DNA損傷・幹細胞マーカー等を指標とした免疫組織化学的検索による発がん性早期検出

研究分担者の豊田は、令和 5 年度に検索する新規被験物質として、腎発がん物質 5 種 : Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP)、1,2,3-Trichloropropane (1,2,3-TCP)、Bromodichloromethane (BDCM)、8-

Methoxypsoralen (8-MOP) 及び Hydroquinone (HQ) を、6 週齢の雄 F344 ラットに 28 日間混餌投与した (各群 5 匹)。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物質毎に 90、50、100、75 及び 100 mg/kg 体重/日と設定した。

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 ($\times 400$) 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

研究分担者の堀端は、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 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) 及びリボソーム DNA (ribosomal DNA; rDNA) unit 領域を標的とした定量的 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。ChIP に用いる抗体については、これまでは在庫に限られるポリクローナル抗体を使用していたが、将来的な試験系の維持を見据え、モノクローナル抗体を用いた検討を行った。

即ち、各 DNA 修復及び DNA 損傷応答タンパク質を認識する市販の 21 種類のモノクローナル抗体を入手し、これらを用いて紫外線 DNA 損傷を誘導した Flp-In 293 細胞での ChIP を実施し、各抗体の DNA 沈降量を調査し、ChIP に適用可能なモノク

ローナル抗体として、抗 γ -H2AX 抗体、抗 ATM 抗体、抗 Mre11 抗体及び抗 BRCA1 抗体が選別された。これらの抗体を用いて、 γ -H2AX、ATM、Mre11 及び BRCA1 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 8 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これらのタンパク質の 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

研究分担者の松下は、6 週齢の雄性 SD ラットを 3 群 (n=5) に配し、既報に従い実験期間を通して低 Na 食 (0.05% Na) を給餌した。実験開始 1 週間後から媒体であるオリーブオイルもしくはシクロスポリン (CyA) を 15 及び 30 mg/kg の用量で 28 日間反復皮下投与した。最終投与日の翌日にイソフルラン深麻酔下において腹大動脈から採血後、放血により安楽死させて剖検を行った。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、血清生化学的検査により血液尿素窒素 (BUN) 及び血清クレアチニン (sCre) を測定し、さらに ELISA 法により血清 CD44 値を測定した。

剖検時に腎臓の重量を測定し、組織の一部を 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。全群についてホルマリン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、aquaporin1 (AQP1)、vimentin、collagen type IV 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、チラミドシグナル増幅法により染色を実施した。さらに fibronectin1 (Fn1) 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 (LMD) 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。

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

B-5-1. Standard Project Submission Form (SPSF)

平林及び小島は、厚労省の協力を受け、

国内から提案のあった2件の SPSF の内容を確認検討し、必要に応じて開発者に助言・修正を求めた後、OECD に提出した。

B-5-2. Stakeholders Workshop on Operational and Financial Aspects of Test Methods Validation

平林、小島及び足利は、OECD WNT 主催の Workshop (Stakeholders Workshop on Operational and Financial Aspects of Test Methods Validation) に関与し、今後の試験法のバリデーションの在り方について議論した。

B-6 毒性等情報収集調査

B-6-1. OECD IATA Case Studies Project 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」、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 -セ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: 「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」、計5件の調査を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験を用いない調査研究が多い。動物実験を用いる研究においても、動物の数は最小限にとどめ、実験は国立医薬品食品衛生研究所の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。

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」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、OECD により選定されたコーチの指摘事項について、コーチと相談しつつ対応（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 の修正など）し、wiki の修正を試みた。しかしサポートする情報の少なさから、外部レビューを経た後、OECD AOP wiki への掲載を断念することとした。当該検討結果は、Toxicology letter 又 Archives of Toxicology 誌への掲載を目指すこととして、投稿論文形式に修正した原稿を作成した。
- 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」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、コーチから指摘された、KER をサポートする実験情報の少なさや、AO の特殊性から、外部レビューを経た後、OECD AOP wiki への掲載を断念することとした。当該検討結果は、Toxicology letter 誌の掲載を目指すこととして、投稿論文形式に修正した原稿を作成した。

- 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 (T cell dependent antibody reaction) 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 (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 のような免疫反応の抑制を *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の記載が OECD の *in vitro* 免疫毒性試験に関する DRP (Detailed Review Paper) にあることから、IL-4 の抑制である本 AOP の KE3 が将来 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主張

し、論文投稿を進める予定である。

4) 「IL-1 receptor 結合阻害：AOP277」については、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 TDAR の阻害になるという AOP である。本 AOP はすでに OECD による外部 review に入っており、主な指摘事項は、IL-1R シグナルを阻害するストレスナ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-kB 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、AO を measurable な指標である TDAR (AOP154 の AO と共有) に変更する、KE に AP-1 に関する記載を追加するなどの対応案を示したところ、外部 reviewer に承認されたことから、AOP wiki の修正を行った。さらに、AOP wiki における AO の修正に伴い、AO986 の AO984 への置き換えと KER2928 の修正も行った。その結果、10 月末 OECD より、本 AOP は承認され、AOP No.30 として i-library に収載された。

C-1-2. 発がん性の AOP

網羅的に情報収集したラット、マウス、ハムスターを用いた鼻腔発がん試験のうち、40 種の吸入暴露試験及び 38 種の非吸入暴露試験について、誘発された鼻腔腫瘍を INHAND に基づいて組織分類し、随伴病変のデータと共に解析した結果、投与経路及び遺伝毒性の有無に依らず、最も高頻度の鼻腔腫瘍は呼吸上皮由来の扁平上皮癌であり、その前駆病変は扁平上皮化生と考えられた。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。一方、腺腫の前駆病変は呼吸上皮病

変と考えられた。マウス及びハムスターのデータは限定的であったものの、これらの経路には、明らかな種差は見られなかった。当該内容について、論文を投稿し、査読指摘事項への対応を経て受理された。

C-1-3. 光毒性の AOP

既に光刺激性に絞った AOP を作成し、UV/VIS 吸収を pre-MIE, MIE を励起化合物からの ROS 産生, cell injury を KE, 最終的な Tissue response を inflammation とした。通常の AOP フォーマットにあわせて新たに “Organ level” を設け、“Phototoxic contact dermatitis” を追記した。

C-2. TG 及び DRP の開発

C-2-1. 皮膚感作性試験

- 1) OECD TG442C に追加する DPRA 重量法に関する共同研究を主導し、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、昨年 4 月に結果を OECD に提出した。この結果が、昨年 4 月の WNT 会議で承認され、改定 TG442C が昨年 7 月に公表された。
- 2) IL-8 Luc assay TG442E の改定案の採択に向けて尽力した結果、昨年 4 月の WNT 会議で承認され、昨年 7 月に公表された。
- 3) EpiSensA の TG 案を昨年 6 月に OECD に提出し、WNT 意見募集を受けて改訂した。
- 4) Defined Approach for Skin Sensitisation : DASS の改定を目指した OECD プロジェクトに参加し、日本発の皮膚感作性試験である ADRA 及び IL-8 Luc assay のガイドライン 497 収載を目指し、それぞれ既存の試験法である DPRA 及び

h-CLAT と置換した場合の予測性評価や適用限界の解析を行った。

C-2-2. 免疫毒性試験

- 1) *In vitro* 免疫毒性試験の IL-2 Luc assay の採択に向けて尽力した結果、昨年 7 月に TG444A が公表された。
- 2) 昨年度と今年度で計 6 回の会議を開催し、メールベースのやりとりも含め、IL-2 Luc LTT の validation report の最終化と peer review report の作成を行った。両 report を 7 月に OECD に提出し、各国からのコメントに対応した。

C-2-3. Bhas42 細胞形質転換試験法の TG 開発

Bhas 42 CTA は、令和 4 年度に公表した CTA の Block 3 でランク A の評価を得た 3 種 CTA (SHE CTA, Bhas 42 CTA, Balb 3T3 CTA) のレビュー論文において、NGTxC のメカニズム解明及び NGTxC・IATA 構築における CTA の貢献を担う Assay としても重要な位置づけであることが示されたことから、令和 5 年度は Bhas 42 CTA の OECD TG 申請の SPSF 原案を作成した。

Bhas 42 CTA の SPSF 原案では、Bhas 42 CTA のメカニズムとして、我々が令和 3 年度に論文公表した形質転換過程の経時的なトランスクリプトーム解析の論文及びその他エピジェネティクスなどの各種論文が公表されていることを提示し、各国においても Bhas 42 CTA のメカニズムが検討されていることを示した。また、形質転換過程の経時的な他点でのトランスクリプトーム解析の論文から、AOP の一例を導き出し SPSF 原案に示した。Bhas 42 CTA の発がん性予測率については、当初

の原案では既報 (Sakai et al., *Mutat Res.*, 702, 100-122, 2010) をもとに、Concordance 78%, Sensitivity 73%, Specificity 84%と示したが、各国からのコメントを参考に評価対象の化合物の見直しを行った結果、Concordance 83%及び Sensitivity 83%に向上した。さらに、厚生労働省の労働安全衛生法における「職場で使用される化学物質の発がん性評価の加速化」として用いられた系統樹により遺伝毒性試験である Ames 試験で陰性の場合に Bhas 42 CTA を実施するバッテリー系統樹で発がん性予測率を算出したところ、Concordance 88%及び Sensitivity 91%と高値になった。また、遺伝毒性試験として、Ames 試験だけでなく、マウスリンフォーマ試験、染色体異常試験、小核試験を含めての Bhas 42 CTA とのバッテリーでの予測率を算出したところ、Concordance 89%及び Sensitivity 93%とさらに高値となった。したがって、我が国の労働安全衛生法における発がん性のスクリーニングの仕組みとして実施された遺伝毒性試験と Bhas 42 CTA のバッテリー系統樹は、発がん性予測の系統樹として優れていることを SPSF 原案において各国に示すことができた。一方で、Bhas 42 CTA の SPSF 原案の提出においては、同意国（組織）は多数であったが、NGTxC・IATA における採用アッセイの TG 推薦及び NGTxC・IATA のガイダンスドキュメントとしての承認申請等、NGTxC・IATA における今後の計画との調整が Bhas 42 CTA の TG 化に向けて更なる検討事項であると考えられた。

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、大森は cell transformation 及び Gap Junction 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、web 会議を重ねて最終案を投稿し、査読指摘事項対応を経て、受理された。

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、共著にて総説を執筆し IJMS に掲載された。記載内容を、TG for Bhas 42 cell transformation assay の SPSF 作成に反映し、NGTxC・IATA における Bhas 42 CTA の重要性を示した。

C-3-2. 光毒性 IATA

1st commenting round で提示されたコメントの多くは用語の定義・統一に関するものであり、コメントに従って適切に修正を行った。また、Case study の項目を新たに設けることを提案された。しかしながら、本来の case study は光安全性評価系を実際に使用している企業や団体が中心となって記載すべきものと考えている旨を返答し、現時点では対応しないこととした。光感作性に関する問い合わせも複数あったものの、本 IATA ではあくまでも光刺激性のみを対象としており、光感作性や光遺伝毒性は out of scope であることを明示した。In silico アプローチに関するコメントも複数あり、ツールに関する例示をもとめられたため、OECD QSAR toolbox をはじめとする評価系

について追記した。光安全性評価を行ううえで代謝物に関する試験が必要ではないのかというコメントもあった。代謝物もターゲットにすることでより正確な光安全性評価に繋がる可能性もあるが、現時点で代謝物の試験が必須であることを示唆する根拠に乏しく、それ故にあくまでも ICH S10 に記載されているように親化合物を対象とした安全性評価に留めることとした。また、decision tree を考案し、IATA 中にあくまでも example として加えた。Expert からのコメントにおいて、薬物動態試験の必要性ならびにそのデータ解釈に関するものが複数あったため、一部の *in vivo* 評価系についてはあくまでも optional な位置づけとした。

C-3-3. 発達神経毒性に起因する行動解析に関する情報収集

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及び新たに追加した文献について、被験物質の種類や行動解析の項目ごとに論文の整理を行った。最終的に、本分担研究に適切な文献内容を精査し、115 報をリスト化した。その結果、被験物質については、農薬 (26 報)、医薬品 (24 報)、産業化学物質 (65 報)、その他 (9 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、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。また、ガイドライン上要求されないが、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、これらの文献は主に農薬の曝露影響を評価したものであった。

ガイドラインに準拠（または参照）している文献は21報と、調査文献の約2割が該当した。一方で、その内容としては、投与時期、あるいは解析項目など、限定的な引用が多くを占め、学術文献の動向調査として本研究で抽出したものについては、完全に準拠して行われている文献はほとんど存在しなかった。

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

C-4-1-1. 腸管由来組織における代替法の検討

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、5.0%は7日間の投与で全例に粘膜のびらん・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認められた。一方、同条件の小腸においては、明らかな組織学的変化は認められなかった。しかし、小腸の遺伝子発現においては、5.0%は投与3ないし5日目には炎症関連遺伝子に加え、粘膜バリア機構、酸化ストレス関連、セロトニン作用に関連する受容体発現への影響が見られた。これより、小腸においては、明らかな組織学的変化が生じるのに先立ち、より早期の段階から種々の遺伝子発現に影響が生じていることが明らかとなった。

2) マウス空腸由来のオルガノイドを用いた検討

正常マウス並びに DSS 処置マウス由来の空腸オルガノイドにおける遺伝子発現を検討した。特にセロトニン作用関連因子に注目して観察したところ、より短時間

の 5.0%DSS 3 日間投与から 5-HT3 受容体関連遺伝子が増加傾向を示した。他方、細胞接着並びに粘膜保護関連遺伝子については明らかな影響は認められなかった。

3) 腸管軸に着目した腸管傷害に起因した肝臓病態の修飾効果の検討

DSS 投与群の大腸において、炎症関連遺伝子発現の上昇及び病理組織学的な炎症が観察され、大腸炎の誘発が確認された。さらに、同群の肝臓においても炎症関連遺伝子発現が増加傾向を示し、大腸炎の波及が示唆された。CDAA-HF 給餌群の肝臓において、炎症・線維化関連遺伝子発現の上昇及び病理組織学的な肝細胞の脂肪化並びに炎症が観察され、NASH 病態の惹起が確認された。併用群では、肝臓において TLR4 を含む一部の炎症関連遺伝子発現が増強し、病理組織学的に CXCL16 陽性細胞が増加した。さらに、線維化関連遺伝子の発現が増強傾向を示した。腸管においては IL6 の遺伝子発現が増強し、病理組織学的に杯細胞と陰窩の拡張が観察された。

C-4-1-2. 肝臓における代替法の検討

1) CDAA-HF の長期投与において、マウス肝は全例で重篤な線維化を認め、組織学的にシリウスレッド陽性面積は 20%まで増加した。また、CDAA-HF 群において胆管線維症も認め、胆管への分化増強が示唆された。Control と比較して、CDAA-HF の線維化部位においては、Rho-family GTPase や Estrogen receptor signaling の活性化をはじめとした種々の変化を見出し、腫瘍の変化と併せて論文として報告した。

2) LX-2 を用いた検討では、TGFβ1 の刺激により、網目状の進展と紡錘形に形態学な変化を示し、αSMA 蛋白陽性、Smad2, 3

のリン酸化、Collagen Type 1 及び Type 4 の遺伝子発現増加を認めた。また、これらの変化は TGFβ1 受容体阻害剤で解除された。以上の結果より、星細胞における線維化の *in vitro* モデルとして有用であることが示された。

3) マウス肝オルガノイド培養を用いた検討では、得られたオルガノイドは CK19 が陽性であり、胆管の特徴を有していた。さらに、SOX9, CD44 が陽性であり、*in vivo* で観察された組織学的特徴を有した胆管上皮細胞である可能性が示唆された。TGFβ1 刺激においては、形態学的に、Control と比較して、小型で色調が暗色になるような変化がみられた。胆管関連として CK19, SOX9, CD44 遺伝子発現は TGFβ1 の刺激により Control と比較して有意に増加した。線維化関連遺伝子発現は、αSMA は Control では陰性であったのに対し陽性に転じた。Collagen Type 1, Fibronectin 発現は、Control と比較して有意に増加した。

C-4-2. DNA損傷・幹細胞マーカー等を指標とした免疫組織化学的検索による発がん性早期検出

投与期間終了時点で、1,2,3-TCP 及び BDCM 投与群において有意な体重増加抑制が認められた。摂餌量に各群間で明らかな差は認められなかった。

1,2,3-TCP・8-MOP 投与群では腎絶対/相対重量の増加、TCEP・BDCM 投与群では腎相対重量の増加が、統計学的有意差をもって認められた。肝臓については、TCEP・1,2,3-TCP・8-MOP 投与群で絶対/相対重量増加、BDCM・HQ 投与群で相対重量の増加が観察された。

8-MOP 投与群において、再生尿細管及

び尿細管上皮細胞の変性壊死の発生頻度が、対照群と比較して有意に増加した。TCEP・BDCM・HQ 投与群でもこれらの所見及び硝子円柱が散発的に観察されたが、統計学的有意差はみられなかった。1,2,3-TCP 投与群では、明らかな腎病変は観察されなかった。

各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、1,2,3-TCP・BDCM・8-MOP 投与群では皮質または髄質外層外帯における γ-H2AX 陽性率の有意な増加が認められた。一方、TCEP・HQ 投与群では 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

抗 γH2AX 抗体を用いた ChIP により共沈する rDNA 比率 (%Input) は紫外線照射により増大した。特に、H18 及び H27 の DNA 領域で高い %Input 値を示した。同様に、抗 ATM 抗体で共沈する rDNA の %Input 値は紫外線照射により増大し、特に、H18 及び H27 の DNA 領域が高い %Input 値を示した。一方で、抗 MRE11 抗体及び抗 BRCA1 抗体で共沈する rDNA の %Input 値については、紫外線の照射と未照射に関わらず rDNA 上の局在に大きな差は見られなかったが、紫外線照射により rDNA 上で全体的に %Input 値が顕著に減少した。

C-4-4. 腎障害・線維化の分子メカニズムに関する研究

CyA 15 及び 30 mg/kg 投与群において対照群と比して有意な BUN 及び sCre の増加ならびに腎臓の絶対あるいは相対重量の有意な増加が認められた。CyA 投与群ではシリウスレッド染色に陽性を示す線維

化領域が増加していた。線維化病変内の尿細管は萎縮、拡張あるいは肥大していた。これらの尿細管は CD44 に陽性を示し、CD44 陽性尿細管の数は線維化面積と正の相関を示した。

マイクロアレイにおける GO 解析では、萎縮/拡張/肥大尿細管において正常尿細管と比して細胞外基質に関連する遺伝子群の発現が増加しており、トランスポーター及び代謝といった尿細管の生理機能に関連する遺伝子群の発現が減少していた。またパスウェイ解析では CD44 は fibronectin 1 (*Fnl*) を含む線維化関連遺伝子の上流因子として抽出された。

免疫組織学的解析において、線維化病変内の萎縮/拡張/肥大尿細管では近位尿細管分化マーカーの AQP1 の発現が減少しており、AQP1 陽性尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と負の相関を示した。またこれらの尿細管では間葉系マーカーである vimentin が発現しており、vimentin 陽性尿細管の数は CD44 陽性尿細管の数と正の相関を示した。蛍光二重免疫染色において CD44 は AQP1 と相互に排他的な発現を示し、vimentin とは共発現していた。細胞外基質の主要な構成要素の一つであるフィブロネクチンの陽性面積は CyA 投与群において有意に増加しており、CD44 陽性尿細管と正の相関を示した。基底膜マーカーである collagen type IV の免疫染色では、線維化病変内の尿細管周囲に軽度に肥厚した基底膜が観察された。CD44 の下流因子候補でありフィブロネクチンをコードする *Fnl* の mRNA は正常尿細管と比して線維化病変内の尿細管の細胞質において増加していたが、フィブロネクチンタンパクはそれらの尿細管の周囲間質に沈着していた。

ELISA 法による血清 CD44 値の測定では、CyA 15 及び 30 mg/kg 投与群においてそれぞれ対照群と比して上昇傾向及び有意な上昇を示した。また血清 CD44 値は腎臓における CD44 陽性尿細管の数及び線維化面積と正の相関を示した。リアルタイム PCR により CyA 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. SPSF

昨年 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。なお、3)はフランス、4)は英国及び米国との共同提案である。

- 1) TG for Bhas 42 cell transformation assay
- 2) Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for immunotoxicity
- 3) Me-Too validation of the reconstructed human epidermis Epiderm model for the EpiSensA method
- 4) TG455 Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists 改定

C-5-2. Stakeholders Workshop on Operational and Financial Aspects of Test Methods Validation

昨年 12 月に OECD で開かれたワークショップは、平林が企画段階から関与した。また、参加者の理解を促すための事前の webinar で validation の成功事例が提示され、このうちのひとつを足利が担当した。さらに、当該ワークショップにおいて、日本からの意見を足利が発表できるように平林とともに議論を重ねた結果、足利より、日

本の主張を世界に発信できた。

C-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 へ活用した事例の提案が増えつつある。AOP は、リードアクリ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リロスを用いた 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 ネットワークを構築し、そこに内包される MIE と KE を試験し、リードアクリロスにより、陽性対照に比べ毒性が低いことを示し、PBPK model (physiologically-based pharmacokinetic model) 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 やリードアクリ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 (Threshold of Toxicological Concern)、リードアクリロス、QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship)、*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 (Point of Departure) を導出し、毒性の懸念が低いこと、及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 を検討した。WoE (Weight of Evidence) 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(Toxicokinetic)/TD (Toxicodynamic)、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。

D. 考察

D-1. AOP の開発

D-1-1. 免疫毒性の AOP

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たが、汎用性の低さから外部 review を断念し、総説としてジャーナルに投稿すべく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 が終了し、OECD より本 AOP は承認され、10 月末に AOP No.30 として i-library に収載された。

D-1-2. 発がん性の AOP

げっ歯類における化学物質誘発鼻腔発がんの網羅的解析は、化学物質によって誘発される鼻腔腫瘍発生の包括的な理解に貢献するものとなった。細胞毒性から鼻腔腫瘍発生に至る AOP の理解、及び遺伝毒性発がん物質の発癌機序との類似性を含め、OECD の非遺伝毒性発がん性の IATA 開発の活動にも資するものと考えられた。

D-2. TG 及び DRP の開発

D-2-1. 皮膚感作性試験

皮膚感作性試験については、研究協力者とともに、既存の TG である皮膚感作性試験代替法 DPRA 重量法を含む TG442C の再改定をなした。

また、研究協力者の相場とともに、既存の TG である皮膚感作性試験代替法 IL-8 Luc assay を含む TG442E の改定をなすことができた。

研究協力者の宮澤とともに進めてきた EpiSensA の TG は 2024 年 4 月 17 日に WNT によって承認された旨の連絡を受けた。

Defined Approach for Skin Sensitisation : DASS の改定を目指した OECD プロジェクトに参加し、日本発の皮膚感作性試験である ADRA 及び IL-8 Luc assay のガイドライン 497 収載を目指した。

D-2-2. 免疫毒性試験

研究協力者の相場とともに、*in vitro* 免疫毒性試験 IL-2 Luc assay が TG444A として採択された。

IL-2 Luc LTT の validation report 及び peer review report は、2024 年 4 月 17 日に WNT によって承認された旨の連絡を受けた。

D-2-3. Bhas42 細胞形質転換試験法の TG 開発

Bhas 42 CTA の OECD における TG 化作業開始の承認をうけるため、SPSF の原案を作成した。

D-3. IATA の開発

D-3-1. 非遺伝毒性発がん性の IATA 開発への協力

発がん過程における細胞増殖及びアポトーシスの意義に関する議論から、これらの評価、特に細胞増殖亢進の評価は OECD で検討中の非遺伝毒性発がん性 IATA 開発に重要な役割を果たすと再認識された。

D-3-2. 光毒性 IATA

2nd WNT commenting round でのコメントに対してそれぞれ適切に対応し、光安全性評価に関する IATA 案を最終化した。

2024 年 4 月 17 日に WNT によって承認された旨の連絡を受けた。

D-3-3. 発達神経毒性に起因する行動解析に関する情報収集

本研究で得られた発達神経毒性の文献情報や、関連する OECD からの提案資料に対するコメント募集への参画による、国際貢献を通して得られた情報は、今後、OECD プロジェクトに日本の意見や結果を反映させるために重要であり、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必要があると考えられる。

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

本研究では、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すため検討した。これにより、肝臓・腸管由来組織における動物実験代替法の確立に向けた検討を 2 次元培養ないし 3 次元培養条件下で実施し、それぞれ、代替法の開発に資する基礎的情報を得た。さらに、今後は、本成果を emergency technology にあたる人体模倣システム (MPS) の開発にも発展させたいと考えている。

D-4-2. DNA 損傷・幹細胞マーカー等を指標とした免疫組織化学的検索による発がん性早期検出

これまでの検討結果を総合すると、腎発がん物質 26 種のうち、22 物質 (感度: 84.6%) が γ -H2AX 陽性細胞の有意な増加を示した一方、非腎発がん物質は検索した 9 種のうち 8 物質 (特異度: 88.9%) が陰性であった。以上より、 γ -H2AX 免疫染色は腎発がん物質の早期検出に有用であることが示唆された。

D-4-3. 遺伝毒性の AOP 開発

これまでのポリクローナル抗体を用いた RPA194、 γ H2AX、Ku80 及び LIG4 を標的とした解析と、今回のモノクローナル抗体を用いた ATM 及び γ H2AX を標的とした解析結果から、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ることが示された。また、MRE11 と BRCA1 の DNA 損傷応答反応は

上記のタンパク質群とは異なる挙動を示すことを明らかにした。これらを踏まえると、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することができるため、汎用性が高く、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と考えられる。

D-4-4. 腎障害・線維化の分子メカニズムに関する研究

本研究により再生異常の生じた尿細管に発現する CD44 の腎線維化における病態生理学的役割の一端を明らかにすることができた。さらに CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性も示された。これらの結果は腎障害・腎線維化の AOP における CD44 の測定項目としての妥当性を支持する結果と考えられた。

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 Emerging technologies を如何にガイドラインに取り込むかという課題に対応して workshop が開催された。一昨年の Emerging technologies in the Test Guidelines Programme に引き続き、昨年開催された Stakeholders Workshop on Operational and Financial Aspects of Test Methods Validation への対応は、まさしく日本が直面している問題を解決するプロジェクトである。研究代表者の平林、足利及び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べきと考える。

D-6. 毒性等情報収集調査

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. 健康危険情報

特になし

F. 結論

研究協力者とともに、既存の TG である皮膚感作性試験代替法 DPRA 重量法を含む TG442C 及び皮膚感作性試験代替法 IL-8 Luc assay を含む TG442E の改定をなすことができた。さらに、*in vitro* 免疫毒性試験 IL-2 Luc assay が TG444A として承認された。AOP に関しては、「IL-1 receptor 結合阻害：AOP277」は、10 月末 OECD に承認され、AOP No.30 として i-library に収載された。発がん性の AOP に関しては、Pathogenesis of chemically induced nasal cavity tumors in rodents: contribution to adverse outcome pathway が J Toxicol Pathol. に掲載された。

支援研究に関しては、以下の成果が得られた。

- 1) 腸管並びに肝臓における *in vivo* と相関性のある新規の *in vitro* 毒性評価系指標を見出した。
- 2) ラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験において、 γ -H2AX 免疫染色により腎発がん物質を検出し得ることが示された。
- 3) 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ることが示された。また、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することができるため、汎用性が高く、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た。

- 4) 再生異常の生じた尿細管に発現する CD44 の腎線維化における病態生理学的役割の一端を明らかにすることができた。さらに CD44 は腎線維化のバイオマーカーとなる可能性も示された。

今後、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。

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. Strupp C, Corvaro M, Cohen SM, Corton JC, Ogawa K, Richert L, Jacobs MN. Increased cell proliferation as a key event in chemical carcinogenesis: Application in an integrated approach for the testing and assessment of non-genotoxic carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2023;24:13246.
2. Toyoda T, Kobayashi T, Miyoshi N, Matsushita K, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Mucosal damage and γ -H2AX formation in the rat urinary bladder induced by aromatic amines with structures similar to o-toluidine and o-anisidine. *Arch Toxicol.* 2023;97: 3197-3207.
3. 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.* 2023;48:323-332.
4. Akagi J, Cho YM, Toyoda T, Mizuta Y, Ogawa K. EpCAM and APN expression in combination with γ -H2AX as biomarkers for detecting hepatocarcinogens in rats. *Cancer Sci.* 2023;114:4763-4769.
5. Akagi J, Mizuta Y, Akane H, Toyoda T, Ogawa K. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. *Part Fibre Toxicol.* 2023;20:13.
6. Cattley RC, Kromhout H, Sun M, Tokar EJ, Abdallah MA, Bauer AK, Broadwater KR, Campo L, Corsini E, Houck KA, Ichihara G, Matsumoto M, Morais S, Mráz J, Nomiyama T, Ryan K, Shen H, Toyoda T, Vähäkangas K, Yakubovskaya MG, Yu IJ, DeBono NL, de Conti A, Ghissassi FE, Madia F, Mattock H, Pasqual E, Suonio E, Wedekind R, Benbrahim-Tallaa L, Schubauer-Berigan MK. Carcinogenicity of anthracene, 2-bromopropane, butyl methacrylate, and dimethyl hydrogen phosphite. *Lancet Oncol.* 2023;24:431-432.
7. Murata Y, Natsume M, Takako I, 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;45:12.
8. Murata Y, Suzuki K, Shigeta Y, Iso T, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M. In vivo mutagenicity assessment of orally treated tert-butyl hydroperoxide in the liver and glandular stomach of MutaMouse. *Genes and Environment.* 2023;45:29.
9. 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*. 2023;88:105535.
10. Strickland J, Haugabrooks E, Allen DG, Balottin LB, Hirabayashi Y, Kleinstreuer NC, Kojima H, Nishizawa C, Prieto P, Ratzlaff DE, Jeong J, Lee J, Yang Y, Lin P, Sullivan K, Casey W: International regulatory uses of acute systemic toxicity data and integration of new approach methodologies, *Crit Rev Toxicol*. 2023;53(7):385-411.
 11. Mizumachi H, Watanabe M, Ikezumi M, Kajiwara M, Yasuda M, Mizuno M, Imai N, Sakuma M, Shibata M, Watanabe S, Motoyama J, Basketter D, Eskes C, Hoffmann S, Lehmann D, Ashikaga T, Sozu T, Takeyoshi M, Suzuki S, Miyazawa M, Kojima H: The inter-laboratory validation study of EpiSensA for predicting skin sensitization potential, *J Appl Toxicol*. 2023;44(5):510-525.
 12. Ueno K, Matsushita T, Sugihara M, Yamada K, Sato H, Onoue S. Solid lipid nanoparticles of lutein with improved dissolution behavior and oral absorption. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2023;28:877–883.
 13. Antara G, Sujana B, Yamada K, Misaka S, Prud'homme RK, Sato H, Onoue S. Stabilized Astaxanthin Nanoparticles Developed Using Flash Nanoprecipitation to Improve Oral Bioavailability and Hepatoprotective Effects. *Pharmaceutics*. 2023;15:2562.
 14. Suzuki-Kemuriyama N, Abe A, Nakane S, Yuki M, Miyajima K, Nakae D. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocarcinogenesis in mice fed a modified choline-deficient, methionine-lowered, L amino acid-defined diet and the role of signal changes. *PLoS One*. 2023;18(8):e0287657
 15. Saito H, Yokota S, Kitajima S. Immunohistochemical analysis of the vimentin filaments in Sertoli cells is a powerful tool for the prediction of spermatogenic dysfunction. *Acta Histochem*. 2023;125(5), 152046.
 16. Saito H, Furukawa Y, Sasaki T, Kitajima S, Kanno J, Tanemura K. Behavioral effects of adult male mice induced by low-level acetamiprid, imidacloprid, and nicotine exposure in early-life. *Front Neurosci*. 2023;17:1239808.
 17. Myden A, Stalford S.A, 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;15:5:100124.
 18. 小島肇夫, 平林容子: 創薬開発に期待される New Approach Method の行政的な受け入れについて, *日薬理誌*, 2023:158,269-272. doi:10.1254/fpj.22154
 19. 小島肇夫: 動物実験代替法に関する国際機関の動向, *医学のあゆみ*, 2023:285(9),777-780.
 20. 足利太可雄: 化粧品・医薬部外品の安全性評価代替法の現状と将来, *フレグランスジャーナル*, 2023:7,10-15.
 21. 小島肇夫: 医薬部外品・化粧品の安全性評価に動物実験代替法の活用と推進を図るためのガイドンス, *日皮協ジャーナル*, 2023:46(1), 46-52.
 22. 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ークロス -行政リスク評価への適用を目指して-. *CICSJ Bulletin*, 2023:41(1);6-10.
 23. 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)
24. Ono R, Kuwagata M, Naruse M, Watanabe A, Takano M, Hasegawa T, Takashima H, Yoshioka Y, Ochiya T, Hirabayashi Y, Kitajima S: Extracellular vesicle small RNAs secreted from mouse amniotic fluid induced by repeated oral administration of VPA to pregnant mice. *Fundamental Toxicological Sciences*, 2024;11(1):37-56.
 25. Nishikawa A, Nagano K, Kojima H, Fukushima S, Ogawa K. A critical review of the pathogenesis of nasal cavity tumors induced in rodents. *J Toxicol Pathol.* 2024;37(1):11-27.
 26. Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. CD44 expression in renal tubular epithelial cells in the kidneys of rats with cyclosporine-induced chronic kidney disease. *J Toxicol Pathol.* 2024;37(2):55-67.
 27. Matsushita K, Toyoda T, Akane H, Morikawa T, Ogawa K. Role of CD44 expressed in renal tubules during maladaptive repair in renal fibrogenesis in an allopurinol-induced rat model of chronic kidney disease. *J Appl Toxicol.* 2024; 44(3):455-469.
 28. Iso T, Suzuki K, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M. Lack of in vivo mutagenicity of carbendazim in the liver and glandular stomach of MutaMice. *Genes and Environment.* 2024;46:7.
 29. Beal MA, Chen G, Dearfield KL, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Long AS, Lovell D, Parsons BL, Pfuhler SP, Wills J, Zeller A, Johnson G, White PA. Interpretation of In Vitro Concentration-Response Data for Risk Assessment and Regulatory Decision-making: Report from 2022 IWGT Quantitative Analysis Expert Working Group Meeting. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Version of Record online: 01 February 2024
 30. Sun Y, Saito K, Ushiki A, Abe M, Saito Y, Kashiwada T, Horimasu Y, Gemma A, Tatsumi K, Hattori N, Tsushima K, Takemoto K, Ishikawa R, Momiyama T, Matsuyama S, Arakawa N, Akane H, Toyoda T, Ogawa K, Sato M, Takamatsu K, Mori K, Nishiya T, Izumi T, Ohno Y, Saito Y, Hanaoka M. Identification of kynurenine and quinolinic acid as promising serum biomarkers for drug-induced interstitial lung diseases. *Respir Res* 25, 31, 2024
 31. 齊藤 洋克: 農薬等の化学物質曝露によって生じる情動認知行動毒性, *Jpn J Clin Toxicol*, 2024;37:70-75.
 32. 齊藤 洋克、北嶋 聡: 化学物質を発生-発達期に曝露した際の情動認知行動影響検出, *化学物質と環境: 化学物質と環境との調和をめざす情報誌*, 2024;184:3-6.
 33. Parsons BL, Beal MA, Dearfield KL, Douglas GR, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, Horibata K, Kenyon M, Long AS, Lovell D, Lynch AM, Myers MB, Pfuhler S, Vespa A, Zeller A, Johnson G, White PA. Severity of Effect Considerations Regarding the Use of Mutation as a Toxicological Endpoint for Risk Assessment: A Report from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT). *Environmental and Molecular Mutagenesis*. (in press)
 34. Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Comparison of the sensitivity of histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated

with thyroid peroxidase inhibitors. *J Appl Toxicol* (in press)

G-2. 学会発表

1. Beal BA, Chen G, Dearfield KL, Gi M, Gollapudi B, Heflich RH, K. Horibata K, Long AS, Lovell D, Parsons BL, Pfuhrer S, Wills J, Zeller A, Johnson G, White PA. The interpretation of in vitro dose-response data for risk assessment and regulatory decision-making. 51st European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) & 27th Spanish Environmental Mutagenesis and Genomics Society (SEMA) meeting (2023.5.15, Málaga, Spain)
2. 小島肇. 発達神経毒性に関わる OECD 試験法ガイドライン改定の道筋と課題, 第 2 回環境化学物質 3 学会合同大会 (2023.5.30, 徳島)
3. 堀端克良. Quantitative analysis of genotoxicity data. 哺乳動物試験研究会 第 82 回定例会 (2023.6.9, 東京)
4. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. シクロスポリン誘発慢性腎障害モデルラットにおける CD44 の役割, 第 66 回日本腎臓学会学術総会 (2023.06.11, 横浜)
5. 磯貴子, 村田康允, 広瀬望, 馬野高昭, 重田善之, 長谷川彩由香, 堀端克良, 六鹿元雄, 杉山圭一, 広瀬明彦, 増村健一, 松本真理子. Evaluation of the in vivo mutagenicity of azodicarbonamide. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19, 横浜)
6. 村田康允, 重田義之, 磯貴子, 馬野高昭, 広瀬望, 長谷川彩由香, 堀端克良, 杉山圭一, 広瀬明彦, 増村健一, 松本真理子. In vivo mutagenicity assessment of orally treated tert-butyl hydroperoxide in Muta Mouse liver and glandular stomach. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19, 横浜)
7. 畑中悠里, 宇野絹子, 白井陽月, 柴田朱衣, 煙山紀子, 美谷島克宏. DSS 大腸炎モデルマウスの短期試験至適条件の探索及びそれに伴う炎症パラメータの変動, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19, 横浜)
8. 宇野絹子, 名倉かれん, 畑中悠里, 煙山紀子, 中江大, 太田毅, 美谷島克宏. デキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎が NASH 病態進行に及ぼす影響, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19, 横浜)
9. 齊藤洋克. 発生-発達期の化学物質ばく露による情動認知行動毒性の検出と課題, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19, 横浜)
10. 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 (2023.6.19, 横浜)
11. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 畝山瑞穂, 豊田武士, 小川久美子. 結晶子径 6nm の酸化チタンナノ粒子のラットにおける 90 日間反復経口投与毒性試験. 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.20 横浜)
12. 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. 脱ヨウ素酵素阻害剤によるラット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 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.20 横浜)
13. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. シクロスポリン誘発慢性腎障害における CD44 の役割及びバイオマーカーとしての可能性, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.06.20, 横浜)
14. 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. 脱ヨウ素酵素阻害剤によるラット抗甲

- 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 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.06.20, 横浜)
15. 小川久美子, 西村次平, 西川秋佳. ICH S1B (R1) のアウトライン, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21, 横浜)
 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 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.06.21, 横浜)
 17. 齊藤洋克. ネオニコチノイド系農薬ばく露による雄マウスの情動認知行動解析, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21, 横浜)
 18. 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 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.21 横浜)
 19. 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 (2023.6.21 横浜))
 20. 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)
 21. 齊藤洋克. 農薬等の化学物質ばく露によって生じる情動認知行動毒性, 第 45 回日本中毒学会総会・学術集会 (2023.7.15, さいたま)
 22. Hirabayashi Y. Initiatives for New Approach Methods at Japanese Center for the Validation Methods (JaCVAM). MPS World summit 2023 (2023.7.27, Berlin)
 23. 小島肇. 動物実験の 3Rs を取り巻く国際動向, 国立感染症研究所 検定・検査教育講習会 (2023.7.26, 東京)
 24. 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) (2023.8.30, Niagara Falls, Canada)
 25. Hirabayashi Y, Kojima H, Ashikaga T: Update on recent activities at JaCVAM, 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC12) (2023.8.31, Niagara Falls, Canada)
 26. Murata Y, Matsumoto M, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Hirose N, Horibata K, Sugiyama KI, Inoue K, Hirose A, Masumura K. In vivo mutagenicity assessment and derivation of reference dose of styrene. EUROTOX 2023 (2023.9.10, Ljubljana, Slovenia)
 27. 尾上誠良. 薬剤科学のチカラ: 基礎・臨床融合によるモノづくり, 第 17 回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム (2023.9.16, 松本)
 28. 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 (2023.9.21 横浜)
 29. Horibata K, Sugiyama KI. Detection of genotoxic reactions through direct analysis of DNA damage responses on chromatin fraction. 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023.9.21, 横浜)
 30. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子. 腎発がん物質の 28 日間反復経口投与は

- ラット腎臓に γ -H2AX 形成を誘導する. 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023.9.22 横浜)
31. 赤根弘敏, 豊田武士, 石井雄二, 高須伸二, 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解析による抗甲状腺物質の効率的な検出. 第 82 回日本癌学会学術総会 (2023.9.22 横浜)
32. 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 (GSRS23) (2023.9.27, Parma).
33. Hirabayashi Y, Activities of the Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), NIHS: Development of new toxicity tests using NAM and their use in regulations. 13th Global Summit on Regulatory Science (GSRS23) (2023.9.27, Parma).
34. Onoue S : Development of ROS Assay for Photosafety Evaluation, Webinar Series on In Vitro Phototoxicity Testing (PETA Science Consortium International e.V.) “In Vitro Phototoxicity Testing Part 1: Methodological Overview” (2023.10.4, Online)
35. Kinoshita K, Ambe K, Yamada T, Ashikaga T, Tohkin M: Establishment of in silico prediction model for skin sensitization aiming for practical application, CBI 学会 2023 年大会 (2023.10.24, 東京)
36. 堀端克良, 佐々木沙耶, 杉山圭一. クロマチン分画での DNA 損傷応答解析による遺伝毒性反応の検出. 日本放射線影響学会第 66 回大会 (2023.11.7, 東京)
37. 堀端克良. 遺伝毒性のプラクティカルな評価方法と適用性. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.11, 福岡)
38. 佐々木沙耶, 杉山圭一, 堀端克良. クロマチン分画上の DNA 損傷応答解析によるアルキル化剤誘発遺伝毒性反応の検出. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12, 福岡)
39. グルーズピーター, 山田雅巳, 本間正充, 堀端克良, 杉山圭一. Construction of new Ames tester strain deficient in the AlkB demethylase. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12, 福岡)
40. 三浦康義, 松村一史, 福島俊朗, 杉山圭一, 堀端克良, 加藤雅之, 菅野拓也, 羽倉昌志. BMS 共同研究, 弱変異原性物質に対する感受性の比較; TA97, TA97a vs TA1537 及び WP2uvrA/pKM101 vs WP2uvrA. 日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 (2023.11.12, 福岡)
41. 小川久美子. 食薬成分の毒性学的検討課題等について. 日本食品化学学会第 39 回食品化学シンポジウム (2023.11.17, 川崎)
42. Ashikaga T: International standardization policy for MPS in Japan and development of in vitro respiratory toxicity test as an example of applied research, The 6th Symposium on Organoids and Organs-on-Chips (2023.11.24, Nanjing, China)
43. 小林睦, 加藤博美, 立花滋博, 小島肇. DPRA 試験法の重量濃度法に関する追加研究, 日本動物実験代替法学会 第 36 回大会 (2023.11.28, 千葉)
44. 山本修平, 大森清美, 内田和歌奈, 小沼泰子, 山岸夏望, 宮本健司, 内田絢斗, 白川真一, 福田淳二. Bhas42 細胞形質転換試験法におけるフォーカス定用 CNN モデルの汎用性向上, 日本動物実験代替法学会 第 36 回大会 (2023.11.28, 千葉)
45. 小島肇. WC 12 Canada 参加報告, 日本動物実験代替法学会 第 36 回大会 (2023.11.29, 千葉)
46. 足利太可雄. 動物実験代替法の開発と酸化ストレス, 第 36 回日本酸化ストレス学会関東支部会 (2023.12.3, 川崎)

47. 足利太可雄: 毒性機序研究と NAMs 開発の接点—免疫毒性を中心に—, 第 6 回医薬品毒性機序研究会 (2023.12.6, つくば)
48. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子. シクロスポリン誘発ラット腎線維化モデルにおける尿細管の形態と CD44 発現, 第 40 回日本毒性病理学会学術集会 (2024.01.24 東京)
49. 畝山瑞穂, 豊田武士, 赤木純一, 赤根弘敏, 水田保子, 森川朋美, 小川久美子. ラット肝発がん物質の早期検出における ALDH3A1 と γ -H2AX 免疫染色の有用性評価. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024.1.23 東京)
50. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小川久美子. γ -H2AX 免疫染色によるラット腎発がん物質の早期検出. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024.1.24 東京)
51. 水田保子, 赤木純一, 豊田武士, 木村美恵, 爲廣紀正, 安達玲子, 曹永晚, 小川久美子. 経皮/経口暴露によるアレルギーマウスモデルにおけるナノ銀のアジュバント作用の検討. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024.1.24 東京)
52. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 畝山瑞穂, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子. TSH 産生阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出における病理学的解析と血中ホルモン値の比較. 第 40 回日本毒性病理学会総会及び学術集会 (2024.1.24 東京)
53. Hirabayashi Y, Japan's view on MPS, 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2024.3.11 Salt Lake City)
54. Toyoda T, Matsushita K, Akane H, Uneyama M, Morikawa T, Ogawa K. Early detection of renal carcinogens in rats by immunohistochemistry for γ -H2AX. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2024.3.11 Salt Lake City)
55. Ogawa K, Akagi J, Mizuta Y, Uneyama M, Akane H, Toyoda T. Titanium dioxide with crystallite diameters of 6, 30, and 180 nm induced no toxicological effects after oral administration to rats for 90 days. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2024.3.14 Salt Lake City)
56. Akane H, Toyoda T, Matsushita K, Uneyama M, Morikawa T, Kosaka T, Tajima H, Aoyama H, Ogawa K. Effective method for early detection of antithyroid chemicals by histopathological and immunohistochemical analyses in rats. 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2024.3.14 Salt Lake City)
57. Hirabayashi Y, New Approach Methods (NAMs) in Japan, Satellite Meeting for the 63rd Annual Meeting of the Society of Toxicology organized by the Center for Alternative to Animal Testing and the Human Society International/Animal-free Safety Assessment Collaboration. (2024.3.15, Salt Lake City)
58. 岡本悠佑, 長谷川千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 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. 医療用マイクロニードルアレイにおける皮膚透過性評価及び滅菌要否検証. 日本薬学会第 144 回年会 (2024.3 横浜)
59. 足利太可雄: 免疫毒性に関する AOP および OECD テストガイドラインの開発状況, 日本薬学会第 144 回年会 (2024.3.30, 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

I. OECD 成果物

1. AOP No.30; Adverse Outcome Pathway on impaired interleukin-1 receptor type (IL-1R1) signaling leading to impaired T-cell dependent antibody response
2. OECD TG 442C; In vitro skin sensitisation, in chemico skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins
3. OECD TG 442E; In vitro skin sensitisation assays the Key Event on activation of dendric cells on the Adverse Outcome Pathway for skin sensitization
4. OECD TG 444A; In vitro immunotoxicity, IL-2 Luc assay