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）

国内外で開発されOECDで公定化されるNAMを活用した試験法の行政的な
受け入れに対応するための研究

令和6年度分担研究報告書

バリデーション基準の改定対応および皮膚感作性試験のTG開発

研究分担者 足利太可雄

国立医薬品食品衛生研究所 ゲノム安全科学部 室長

研究要旨

OECDで行われているバリデーション基準の改定に対応するため、2024年4月22-23日と12月9-10日に行われたGD34改定プロジェクト会議に参加し、readiness criteriaと呼ばれる事前評価書のあり方を中心に議論を行った。新規皮膚感作性試験代替法のOECDテストガイドライン化については、研究分担者小島および研究協力者の赤堀（CERI）らとともに、OECD TG442DにCERIが開発した皮膚感作性試験代替法 α -Sensの掲載を目指してOECD対応などを行い、研究分担者小島および研究協力者の立花（食薬センター）らとともに、EpiSensAの新規表皮モデルのTGの採択を目指した国際”me-too”バリデーションに参加した。さらに、研究協力者の笠原（富士フィルム）らとともに、OECD GL497に日本で開発された試験法の追加掲載を目指して必要な情報の提供およびコメント対応を行った。

A. 研究目的

全身毒性など複雑な毒性を動物実験代替法（以下、代替法）により評価するためには、in vitro/in silico試験法を、試験と評価のための統合的アプローチ(integrated approaches to testing and assessment: IATA)により組み合わせる必要があり、それを可能にするために、経済協力開発機構(OECD)の試験法ガイドライン(TG)プログラム各国調整官作業グループ(WNT)において、代替法に用いる新興技術の公定化のためのバリデーションを加速するための基準や仕組み(GD34)の改定を検討している。現状でもバリデーションには膨大な費用と時間がかかり、今後想定される全身毒性のTG開発には適用困難とされているためである。

また皮膚感作性については、国内で新たな試験法が開発されており、そうした試験法をOECD TG化するとともに、従来TG化された試験法も含め、さらなる社会実装のためにデファインドアプローチ(DA: Defined Approach, 定義済み総合判定方式)であるOECDガイドライン497の改定・拡充を推進する必要がある。

そこで本研究では、OECDにおけるGD34改定プロジェクトに参画し、我が国の意向を反映させ、今後とも厳格性と効率性を両立したバリデーションのありかたを確立させることと、また我が国で開発された皮膚感作性試験をタイムリーにOECDガイドライン化することを目的とした。

B. 研究方法

バリデーション基準の改定対応について

では、2024年4月22-23日と12月9-10日に行われたGD34改定プロジェクト会議に参加し、readiness criteria と呼ばれる事前評価書のあり方を中心に議論を行った。またメールでのコメント募集にも対応した。

皮膚感作性試験のテストガイドライン開発については、 α -Sens および GL497 に日本で開発された試験法の追加収載では主に OECD 皮膚感作性専門家会議に参加し、必要な情報やコメントを提出した。EpiSensA の新規表皮モデルのバリデーション(Epi2SensA me-too バリデーション)については、バリデーション実行委員会のメンバーとして運営に参加した。

(倫理面への配慮)
特になし。

C. 研究結果

バリデーション基準の改定対応については、2回のプロジェクト会議において以下のような議論が行われた。すなわち、これまでよりも柔軟で効率化されたプロセスが必要、pre-validation から事前評価(readiness criteria)へ移行すべき(このことにより事前評価の成績によってバリデーションを簡素化または省略可能となる)、開発企業自身によるバリデーションの可能性、DA 先行タイプの GL 開発の可能性(個別の代替法をバリデーションした後に DA により統合するのではなく、まず DA を開発してから個別の試験法を当てはめる)。特に readiness criteria については、in vitro 試験法だけでなく DA に関する定型フォーマット案も作成され、検討が続いている。こうした検討は、readiness criteria を設定することで、バリデーションを実施する前に、開発者に技術移転性などガイドライン化に必要な情報を取得させ、その結果バ

リデーションの効率化とガイドラインの厳格性を両立させることが可能との考えに基づいているが、有効性については賛否が分かれている状況である。また、従来のバリデーションでは、in vitro 試験結果をもとに、あらかじめ設定したカットオフ値により、陰性/陽性を判別し、施設間および施設内再現性を評価してきたが、今後の全身毒性試験では、各施設で得られた in vitro 試験の用量反応性結果から再現性を評価する統計学的アプローチが必要とされることから、新たな解析手法に関する議論が行われている。

皮膚感作性試験のテストガイドライン開発については、以下のように進めた。JaCVAM で行なわれている α -Sens のバリデーションについては OECD にその進捗状況を伝え、OECD のプロジェクトとして問題なく進んでいることの理解を得た。Epi2SensA については、Non-coded の被験物質 5 品で Phase I としてトレーニングを実施し、偽陽性(Salicylic acid)、偽陰性物質(Eugenol)はあったが、全参加施設で同じ評価であったことから技術移転性は問題なしと判断された。続いて施設間再現性を確認するために coded 被験物質により繰り返し試験を実施した。Code 開示は今後行われる予定である。ただし、費用と期限の観点から、参加施設の一般財団法人食品薬品安全センターと協議し日本は Phase II までの参加となった。日本で開発された試験法の OECD GL497 への追加収載については、まず、2024年6月に TG 化された EpiSensA も含め検討いただくことを OECD 皮膚感作性専門家グループに提案し、最終的には WNT の確認も経て承認された。そこで7月以降に ADRA, EpiSensA, および IL-8 Luc assay それぞれのボーダーラインレンジを算出し、それらの値に基

づいて既存の試験法と置換した場合の *in vivo* との対応性も算出し、既存の試験法と同等の予測性を有していることを示した。

D. 考察

バリデーション基準の改定対応については、現時点の方向性としては、*readiness criteria* と呼ばれる、事前評価書のテンプレートに、開発者自身が技術移転性を示すデータなどを取得の上記載することでバリデーションの効率化を実現しようとしている。これにより JaCVAM などバリデーション実施機関の負担は軽減化されるものの、開発者の負担はかえって増えるという指摘もあり、方向性が定まるにはなお紆余曲折があると予想される。また機械学習など *in silico* による予測モデルのバリデーションをどのように行うべきかについては未だ議論も行われていない。以上より、GL34 のドラフトが作成されるまで今後多くの時間を要すると考えられる。日本からはこれまでのバリデーションで得た知見を基に、現実的な効率化について提言を行っていく。

バリデーションの効率化にも関連するが、Epi2SensA の *me-too* バリデーションについては、海外からヒト培養表皮モデルを輸入することが費用や納期の面で大きな課題であった。今回の *me-too* のバリデーション実施の前に、参加施設数や被験物質数など研究デザインを十分に検討すべきであったことが反省点として挙げられる。

OECD GL497 への日本で開発された試験法の追加収載については、研究協力者の尽力もあり、迅速に必要な解析を実施できた結果、昨年度承認されたばかりの EpiSensA も含め、OECD GL497 への日本で開発された試験法の追加収載については、新たに 3 種の試験法を GL497 に収載

できる可能性が高まった。これにより、h-CLAT も含め GL497 で使用可能となった試験法は 4 種類となり、今後日本発の皮膚感作性試験代替法の汎用性が大きく向上することが期待される。

E. 結論

OECD で実施されているバリデーション基準の改定に対応するため GD34 改定プロジェクト会議に参加し、*readiness criteria* と呼ばれる事前評価書のあり方を中心に議論を行った。新規皮膚感作性試験代替法の OECD テストガイドライン化については、EpiSensA の新規表皮モデルの TG の採択を目指した国際“*me-too*”バリデーションに Phase II まで参加した。さらに、OECD GL497 に日本で開発された試験法の追加収載を目指して必要な情報の提供およびコメント対応を行った。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Nishida A, Sawada Y, Arai R, Ishibashi N, Suzuo M, Ohno A, Ashikaga T, Iijima K: Evaluation of the immunotoxicity potential of nanomaterials using THP-1 cells. *Front. Toxicol.*,2024;6:1293147. <https://doi.org/10.3389/ftox.2024.1293147>.
2. Ashikaga T, Hatano K, Iwasa H Kinoshita K, Nakamura N, Ambe K, Tohkin M: Next Generation Risk Assessment Case Study: A Skin Sensitization Quantitative Risk Assessment for Bandrowski's Base Existing in Hair Color Formulations, *Journal of Japanese Cosmetic Science Society*. 2024;48(2):73-77.
3. Kasahara T, Yamamoto Y, Nakashima N, Imamura M, Mizumachi H, Suzuki S, Aiba

- S, Kimura Y, Ashikaga T, Kojima H, Ono A, Matsumoto K: Borderline Range Determined Using Data From Validation Study of Alternative Methods for Skin Sensitization: ADRA, IL-8 Luc Assay, and EpiSensA, Journal of Applied Toxicology. 2025;45(3):432-439.
<https://doi.org/10.1002/jat.4712>
4. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaïoun K, Ashikaga T, Bloch D, Cavoski A, Chiu WA, Davies HG, Giusti A, Hartung T, Hirabayashi Y, Hogberg HT, Joglekar R, Kojima H, Krishnan K, Kwon S, Osborne OJ, Roggen E, Rooney AA, Rousselle C, Sass JB, Sepai O, Simanainen U, Thayer KA, Tong W, Wikoff D, Wright F, Whaley P. Time for CHANGE: system-level interventions for bringing forward the date of effective use of NAMs in regulatory toxicology, Arch Toxicol, 2024;98:2299-2308. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
 5. 平林容子, 足利太可雄, 小島肇夫: 非臨床安全性評価に用いられる非ヒト霊長類の供給不足をめぐる動き, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス. 2024;55(3);195-197. https://doi.org/10.51018/pmdrs.55.3_195.
 6. 足利太可雄: 化粧品開発における動物を用いない皮膚感作性評価法開発の現状, SSCI-Net News Letter. 2024;6;3-6.
 7. 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇夫, 平林容子: 日本動物実験代替法評価センター (JaCVAM) 令和4~6年報告書, AATEX-JaCVAM. 2024;12(1):35-41.
 1. Ishida S, Matsushita T, Sato K, Ashikaga T, Hirabayashi Y, Yamazaki D: Japanese approach to the proposal of an OECD Test Guideline using Gut-Liver MPS for the first pass effect analysis as a Context of Use of toxicokinetic simulator in chemical risk assessment, MPS World Summit 2024 (2024.6.13)
 2. Ashikaga T, Tanabe I, Ishikawa S, Mizoguchi I, Yoshimoto T: Development of an in vitro respiratory sensitization test based on a concept of a co-culture system between human bronchial epithelial cells and antigen presenting cells, LIVE 2024 (2024.6.20)
 3. 徳永朱莉, 木下啓, 安部賀央里, 山田隆志, 足利太可雄, 頭金正博: 機械学習を活用した皮膚感作性強度予測モデルの開発と解釈性向上に向けた検討, 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7.3)
 4. 足利太可雄, 大屋賢司, 加藤節史, 北川剛史, 小島肇, 寒水孝司, 林克彦, 立花滋博, 益森勝志, 三嶋隆, 楠木俊江, 清水淳, 伏原和久, 宮崎和雄: 機ヒト末梢血から樹立した不死化単球細胞株を用いた発熱性物質検出系のバリデーション研究, 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 5. 飯島一智, 山城真輝, 坂本玲奈, 大野彰子, 足利太可雄: 種々の酸化亜鉛ナノ粒子を対象とした抗原提示細胞活性化能の評価と活性化機序の解析, 第51回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5)
 6. 足利太可雄: 動物実験代替法の国際動向と国内行政受け入れの取り組み, 皮膚基礎研究クラスターフォーラム第18回教育セミナー (2024.9.26)

F.2 学会発表

7. Reinke E, Ulrey A, Hoffmann S, Basketter D, Corsini E, Ashikaga T, Gerberick F: Peer Review for Validation Studies: Building Confidence and Transparency Into a New Validation Paradigm, ASCCT 13th Annual Meeting (2024.10.29)
 8. 前田洋祐, 佐藤亜紗子, 武吉正博, 立花滋博, 成田和人, 小林諒太, 島田真理子, Priyanka M, Rahul D, Abhay D, Namhee K, Miriam J, 福山朋季, 松本一彦, 赤堀有美, 足利太可雄, 大野彰子, 小島肇, 小野敦: 皮膚感作性試験代替法 α -Sens24C7 の Validation 研究 (Phase I), 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 9. 大野彰子, 沖山佳生, 山城真輝, 飯島一智, 足利太可雄: ナノマテリアルの免疫毒性評価系における *in vitro* h-CLAT 試験法の有用性, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 10. 徳永朱莉, 木下啓, 岩佐帆乃夏, 波多野浩太, 中村伸昭, 足利太可雄, 安部賀央里: アミノ酸誘導体結合性試験 ADRA 等を使用した強感作性物質の皮膚感作性強度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 37 回大会 (2024.11.30)
 11. 石橋直樹, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデルとの共培養系を用いた各種シリカナノ粒子の THP-1 細胞活性化能の評価と活性化メカニズムの解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 12. 荒井りおん, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: ナノマテリアル吸入毒性試験法の開発に向けた、各種シリカナノ粒子曝露による THP-1 細胞活性化のメカニズム解析と新規評価指標候補遺伝子の発現解析, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 13. 坂本玲奈, 山城真輝, 大野彰子, 足利太可雄, 飯島一智: 気管支モデル/THP-1 細胞共培養系を用いた酸化亜鉛ナノ粒子の免疫細胞活性化能の評価, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30)
 14. 足利太可雄: 皮膚感作性試験代替法の行政活用状況, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.12.1)
 15. Aoshima H, Ishikawa S, Tanabe I, Mizoguchi I, Yoshimoto T, Ashikaga T: Investigation of the Differential Biological Effects of Skin and Respiratory Sensitizing Chemicals Using a Co-Culture System of Bronchial Epithelium and Dendritic Cells (2025.3.19)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
(予定を含む。)
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし