令和6年度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

免疫毒性の IATA および *in vitro* toxicokinetics の DRP 開発

研究分担者 小島 肇

山陽小野田市立山口東京理科大学 教授

研究要旨

昨今、動物実験を用いずに全身毒性を評価するため、動物実験代替法の枠に捉われない概念として、New Approach Methodology (NAM) の開発が盛んである。NAM とは「動物実験の利用を避けた化学物質の有害性およびリスク評価における情報を用いるための技術、方法、アプローチ、またはその組み合わせ」と米国環境保護局 (EPA) により定義されている。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部会 (WNT) や2023年に新設されたAdvisory Group on Emerging Science in Chemicals Assessment (ESCA) では、NAM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の改定を促している。

本研究班は、このような世界的な動向に呼応して NAM の開発を加速し、新興技術に基づく評価法を公定化させるとともに、他国が提案する OECD 大型プロジェクトに関与し、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。

2024年度、皮膚感作性試験代替法 EpiSensA が TG442D に追記され承認された。それに付随する EpiSensA の性能標準、免疫毒性試験 IL-2 Luc LTT 法のバリデーション報告書、IL-2 Luc LTT 法バリデーションの第三者評価報告書及び Guidance Document on IATA for phototoxicity testing の5件が OECD において採択され、9月までに OECD のホームページで公開された。

研究協力者

相場節也（元東北大学医学部皮膚科）

赤堀有美（一般財団法人 化学物質評価
研究機構）

石田誠一（崇城大学）

尾上誠実（静岡県立大学）

小野 敦（岡山大学薬学部）

笠原利彦（富士フィルム株式会社）

斎藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所）

立花滋博（一般財団法人食品薬品安全セ
ンター 秦野研究所）

A. 研究目的

昨今、動物実験を用いないで全身毒性を評価するため、動物実験代替法の枠に捉われない概念として、New Approach Methodology (NAM) の開発が盛んである。NAM とは「動物実験の利用を避けた化学物質の有害性およびリスク評価における情報を用いるための技術、方法、アプローチ、またはその組み合わせ」と米国環境保護局 (EPA) により定義されている。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部会 (WNT) や2023年に新設されたAdvisory Group on Emerging Science in Chemicals Assessment (ESCA) では、NAM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の改定を促している。

本研究班は、このような世界的な動向に呼応してNAMの開発を加速し、新興技術に基づく評価法を公定化させるとともに、他国が提案する OECD 大型プロジェクトに関与し、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. TG、DRP 及び IATA 等の開発

(1) 皮膚感作性試験代替法の開発

研究分担者足利及び小島は、皮膚感作性試験代替法 EpiSensA が TG442D に成立されるべく尽力した。また、EpiSensA の性能標準を開発し、採択に向け尽力した。

研究協力者の笠原（富士フィルム）らとともに、GL497 皮膚感作性デフィン ド アプローチに日本で開発された試験法の追加を目指した。

さらに、研究協力者の小野（岡山大学）、赤堀（CERI）らとともに、皮膚感作性試験代替法 α -SENS 及び研究協力者の立花（食品薬品安全センター）らとともに、EpiSensA の新規表皮モデルをいずれも TG442D へ追加することを目指し、バリデーション研究に参画した。

(2) 免疫毒性試験代替法の開発

小島は研究協力者の相場とともに、免疫毒性試験代替法 IL-2 Luc LTT 法のバリデーション報告書および第三者評価報告書の採択に尽力した。これを受け、免疫毒性試験 IL-2 Luc LTT 法の TG 採択を目指した。一方、免疫毒性 IATA の作成を目指す一環として、協力研究者として日本免疫毒性学会（理事長：斎藤 嘉朗）に初案作成を依頼するとともに、未完であった IL-1 Luc 法のバリデーション報告書の完成を目指した。

(3) 腎毒性試験代替法の開発

研究代表者の平林、研究分担者の松下及び小島は、日機装が市販しているヒト腎細胞 3D-RPTEC(R) を *in vitro* 腎毒性評価法の TG とするため、開発者の荒川大(金沢大学) と今後の計画を練った。

(4) 初回通過効果試験代替法の開発

研究分担者の山崎及び小島は、研究協力者の石田(崇城大学) とともに *in vitro* toxicokinetics に関する現状をまとめた Detailed Review Paper (DRP) 作成を提出した。

(5) 眼刺激性試験および光毒性試験代替法の開発

小島は、TG437:眼腐食性および強度刺激性物質を 同定するためのウシ角膜を用いる 混濁度および透過性試験法 (BCOP) の改定に協力した。また、TG467:眼刺激性デファインド アプローチの改定に必要となった TG491:眼刺激性試験代替法 短時間曝露法 (STE) の改定に取り組んだ。

また、小島は、協力研究者の尾上(静岡県立大学) の開発した Guidance Document on IATA for phototoxicity testing の採択に尽力した。

B-2. 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

研究代表者の平林及び小島とともに、OECD WNT の成果物を厚生労働行政に反映させるため、研究分担及び研究協力研究者とともに、日本から OECD に提出する資料を事前に確認するとともに、諸々の提案資料に対する OECD からの意見募集に適切な意見を返した。

C. 研究結果

C-1. TG、DRP及びIATA等の開発

(1) 皮膚感作性試験代替法の開発

2024年のWNT会議にて、EpiSensAを加えたTG442が成立し、それに付随するEpiSensAの性能標準が採択され、9月までにOECDのホームページで公開された。

また、GL497 (DASS) 改定案に向け、日本で開発された方法を追加すべく、協力研究者とともに、日本案をOECDに送った。

バリデーションとしては、 α -SENSのバリデーション研究として施設間再現性試験の品質評価に関与した。EpiSensAのme-too試験のバリデーション研究に参画し、参加施設の技術移転及び施設内再現性に寄与した。試験スケジュールの関係もあり、食品薬品安全センターは施設内再現性のみの参加となった。

(2) 免疫毒性試験代替法の開発

免疫毒性試験代替法IL-2 Luc LTT法のバリデーション報告書及び第三者評価報告書が2024年のWNT会議で採択され、2024年9月に公開された。引き続き、5月に免疫毒性試験IL-2 Luc LTT法のTG案をOECDに提出した。

また、一昨年、OECDに免疫毒性IATA作成の提案 (Standard Project Submission Form (SPSF) を提出) したが、2024年4月にWNTにて却下された。まずはIATA事例報告を作成するよう指示された。そこで、免疫毒性学会に協力を求め、IATA事例の素案を作成することができた。さらに、IL-2 Luc法と組み合わせる対象として、開発者及び国際的な専門家とともに、未完であったIL-1 Luc法のバリデーション

ン報告書の見直しに着手した。

(3) 腎毒性試験代替法の開発

ヒト腎細胞3D-RPTEC(R)をOECDに提案するにあたり、関係者で議論した結果、DRPの開発のSPSFを来年度にOECDに提出することで合意を得た。

(4) 初回通過効果試験代替法の開発

In vitro toxicokinetics に関する DRP 開発のための SPSF を OECD に提出し、各国の意見に対応した。DRP 開発に向け、国内外の専門家を招聘し、作成チームを構築した。

(5) 眼刺激性試験代替法及び光毒性試験代替法の開発

日本主導で実施しているTG437改定案について、OECD専門家会議で議論し、WNTに意見を求めた。

日本としては、BCOPへの病理学的な評価の導入し、弱い眼刺激性を評価できるTG437の改定を目指してきたが、日米の共同研究結果に対して、各国の同意は得られなかった。改定TGの中には、病理学的な評価も利用できるかもしれないとの記載に留まった。

TG467の改定に必要な界面活性剤の評価 (DASF) に利用するTG491の改定については、TG467 DASFにはSTE0.5 (変法) の利用が記載されているが、この方法はTG491に明記されていない。小島と開発者で協議の結果、TG491にSTE0.5を記載した初案作成をWNTに提案し、改定TG491にて界面活性剤の評価が可能とした上で、TG467 DASFを承認するようWNTに意見を求めた。

光毒性に関しては、Guidance Document on IATA for phototoxicity testingが2024年4

月のWNTで採択され、9月に公開された。

C-2. 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

日本から、2023年度OECDに提出したSPSFは3件であったが、そのうち、フランスとの共同提案である以下の1件のみが採択された。

Me-Too validation of the reconstructed human epidermis Epiderm model for the EpiSensA method

IATA for *in vitro* immunotoxicity 及びTG for the Bhas 42 cell transformation assayの提案は見送りとなった。ただし、完全な却下ではなく、IATA for *in vitro* immunotoxicity に関しては、前述したように、まずIATA事例報告を作成するよう指示された。TG for the Bhas 42 cell transformation assayに関しては、OECD非遺伝毒性専門家会議にて、必要性を議論してから判断するというものであった。

2024年度のSPSFを提出するため、事前に東野分析官など(厚生労働省)、平林および小島にて内容を確認し、修正を経たものが10月中旬にOECDに提出された。今年各国から提出された25件のSPSFの内、日本提案は6件であった。このうち、2023年度、却下されたTG for the Bhas 42 cell transformation assayも含まれる。これらのSPSFはWNTにて採択の有無が議論された。結果として、#10を除く5つのSPSFがOECD作業計画に載ることになった(2025年4月末現在)。

9 Revision of the TG 491 Applicability Domain for the Short Time Exposure Test Method (STE_{0.5}) with respect to the

implementation of a defined approach for the Ocular Toxicity Predictions of surfactants
10 Newly Developed QSAR, Consensus Model for Predicting Skin Sensitization
11 Inclusion of the reconstructed human epidermis-based testing strategy (RTS) into OECD Test Guideline 497 on Defined Approaches for Skin Sensitisation
12 Proposal for revision of TG 442B to include the GHS subcategorization criterion for the LLNA: BrdU-ELISA
14 Detailed Review Paper for toxicokinetics
19 TG for the Bhas 42 cell transformation assay

D. 考察

OECDにおける本年度の日本の成果物は、EpiSensAがTG442Dに追記され、それに付随する性能標準、IL-2 Luc LTT法のバリデーション報告書、IL-2 Luc LTT法バリデーションの第三者評価報告書及びGuidance Document on IATA for phototoxicity testingの5件である。実質的には、EpiSensAのTG及びGuidance Document on IATA for phototoxicity testingが成果物と言える。

一方、SPSFの採択率は、以前からの課題であり、本年度も1/3しか採択できなかった。却下となった主な理由は、OECD加盟国の専門家と協力体制が構築できていなかったことによる。今後は、開発者の意見に流されず、国際協力体制の状況など、しっかりと国内における事前審査体制を充実せねばならないと感じていたが、2025年4月のWNTにお

いて、5/6が採択された。事前審査体制の賜物を考えられる。問題点を明確にしつつ、継続することが重要と考える。

E. 健康危険情報

特になし

F. 結論

2024年のWNT会議にて、皮膚感作性試験代替法EpiSensAがTG442Dに追記され成立し、さらにGuidance Document on IATA for phototoxicity testingがOECDにおいて採択され、9月までにOECDのホームページで公開された。

G. 来年度の計画

免疫毒性試験代替法IL-2 Luc LTT法のTG採択、眼刺激性試験代替法TG437の改定、眼刺激性試験代替法TG491の改定及び皮膚感作性試験GL497への日本で開発された方法の追記を目指す。

H. 研究発表

H-1. 論文発表

1. 小島肇夫: 動物実験代替法の歴史、Cosmetic Science、2024、10、56-63.
2. Mathisen GH, Bearth A, Jones LB, Hoffmann S, Vist GE, Ames HM, Husøy T, Svendsen C, Tsaioun 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 Jun 14. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
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. J Appl Toxicol. 2024 Oct 30. doi: 10.1002/jat.4712.
 4. Kojima H. History of the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) test guidelines for non-animal test methods in Japan. Genes Environ. 2025; 29;47(1):3. doi: 10.1186/s41021-024-00323-7.
 5. 小島肇夫. 皮膚感作性評価法の変遷、日皮協ジャーナル, 2025;93, 59-64.
- H-2. 学会発表
1. 成田和人, 小林美和子, 佐藤明日香, 楠木俊江, 清水淳, 伏原和久, 宮崎和雄, 立花滋博, 小島肇 : In vitro 発熱性物質試験における NEP 検出の妥当性, 第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5, 福岡)
 2. 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, 福岡)
 3. 三ヶ島史人, 真木一茂, 小島肇, 栗形麻樹子, 大久保佑亮, 星野裕紀子, 片桐龍一, 石黒司, 渡部一人, 角崎英志, 下村和裕 : 医薬品の生殖発生毒性試験及び生殖発生毒性評価代替法に係る状況調査、第 51 回日本毒性学会学術年会 (2024.7.5, 福岡)
 4. 小島肇 : 動物実験代替法から New Approach Methodologies (NAM) への変遷, 第 14 回レギュラトリーサイエンス学会 (2024.9.13, 東京)
 5. Hajime Kojima: A systematic Review on the Safety Evaluation of Food Additives without Animal Testing, 18th China International Food Safety & Quality Conference, (2024. 10.31, Shanghai, China)
 6. Hajime Kojima, International progress on the development and regulatory application of NAMs/Alternatives Symposium on Innovative Collaboration in Toxicology Alternative Methods in Shanghai (2024.11.2, Shanghai, China)
 7. 小島肇 : JaCVAM の成果と今後の課題, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)
 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 -Sens® 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, 栃木)

9. 稲葉 剛士, 新家 功大, 加藤 由布, 平松 範子, 杉原 英志, 滝本 哲也, 佐谷 秀行, 小島 肇, 山本 直樹: 医薬品の生殖発生毒性試験代替法に有用なヒト由来細胞株を用いた評価試験法の開発, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)

10. 成田 和人, 小林 美和子, 佐藤 明日香, 楠木 俊江, 清水 淳, 伏原 和久, 宮崎 和雄, 立花 滋博, 小島 肇 : In vitro 発熱性物質試験における NEP 検出の妥当性 -第 2 報, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)

11. 村上 諒一, 今村 弥佳, 舘下 正和, 小島 肇, 正田 泰士: ルールベースモデル, LLNA および GPMT 統計ベースモデルを用いた皮膚感作性評価のための in silico コンセンサスモデル, 日本動物実験代替法学会 第 37 回大会 (2024.11.30, 栃木)

I. 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