

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 4～6 年度総合研究報告書

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。

昨年度までに、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した *in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) のコホート研究の現状をまとめた。今年度、改定 TG433 及び GD151 (TG433 補助文書) に関する情報を収集した。結果として、2025 年 4 月に TG433 改定案は採択されたが、*in vivo* DNT (Developmental Neurotoxicity) に関する改定はなされなかった。

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。

令和 5 年度までに、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) に提案された試験法ガイドライン (TG) 443 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。令和 6 年度、改定 TG433 及び GD151 (TG433 補助文書) に関する情報を収集した。

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。

また、改定 TG433 案は、OECD の TG プログラム各国調整官作業班 (WNT) にて議論されてきた。2025 年 4 月に改定案が

WNT にて合意されるまでの過程をまとめた。

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 年間活動し、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、陽性対照や過去の陰性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る。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。

全体的に、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を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。偏りがない動物実験同様、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 TG 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 TG433 の改定案

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。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 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。

TG433 改定案は 2024 年 11 月に ECHA より提示され、WNT で意見募集が開始された。主な改定点は、発達免疫毒性に関するコホート研究の記載変更が焦点が当てられ、DNT に関する変更はなかった。この理由として、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 の詳細を記載しておらず、解釈を妨げる欠陥がかなりの頻度で見つかった。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 TG および OECD/EU ガイダ

ンス文書として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ものの、結果がない以上、TGの改定には至らなかったことによる。

2025年4月のWNT会議では、動物実験における被験物質のコード化についての議論がなされた。コード化により、評価者によるバイアスを減らし、再現性が増すとされている。コード化については、記載されているTGは少ないが、TG426およびTG443には以下の記載がある。

TG426のパラ 23 :

The animals should be observed outside the home cage by trained technicians who are **unaware of the animals'** treatment, using standardized procedures to minimise animal stress and observer bias, and maximise inter-observer reliability.

TG426のパラ 29 :

The offspring (at least one pup/sex/litter) should be observed by trained technicians who are **unaware of the animals'** treatment, using standardized procedures to minimise bias and maximise inter observer reliability.

TG433のパラ 50 :

All animals should be observed carefully by trained observers who are **unaware of the animals'** treatment status, using standardized procedures to minimize observer variability.

これらの議論や日本からも本研究班の安彦代表研究者などからも意見などを取り込み、WNTはTG433の改定を2025年4月に採択した。

C-3. GD151 の改定

2024年4月にECHA主導で、EOGRTSに関するCROとの検討会議が開かれ、4つの事例報告がなされた。

これを受け、OECDのWNTが11月に会議を開催し、4事例について議論した。

2事例は、被験物質の発生毒性を評価するために重要な、物質適用が適切な段階でなされたのかの議論であった。

次の事例は、一世代だけでなく、二世代まで拡張すべき事例であった。

最後に、DNTに形態観察を導入したという事例であった。MRI（磁気共鳴画像法）を用いることにより、工程による影響の削減、観察者のばらつきを減らせる利点が挙げられている。

これらの内容をもとに、GD151は来年の改定に向け、WNTで議論が続くことになった。

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、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られる。

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が2025年4月に改定された。ただし、*in vivo* DNTに関する改定はなかった。

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

1. Piersma AH, Baker NC, Daston GP, Flick B, Fujiwara M, Knudsen TB, Spielmann H, Suzuki N, Tsaïoun K, Kojima H: Pluripotent stem cell assays: Modalities and applications for predictive developmental toxicity, *Current Research in Toxicology*, 2022;3, 100074.
2. Anklaam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Kojima H, et al. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp Biol Med* (Maywood). 2022;247(1):1-75.
3. 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.
4. 小島肇夫: 動物実験代替法の歴史、*Cosmetic Science*, 2024, 10, 56-63.

5. 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 Jun 14. doi: 10.1007/s00204-024-03802-6.
6. 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 Jan 29;47(1):3. doi: 10.1186/s41021-024-00323-7.

H-2. 学会発表

1. 小島肇: MPS の標準化のための国際戦略, 第 29 回 HAB 研究機構学術年会 (2022.5.19)
2. Kojima H: Approach to New Approach Methods developed by Japan in OECD WNT, ICCA-LRI Workshop 2022 (2022.6.20-21)
3. 小島肇: 3Rs を取り巻く国際動向と課題, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2)
4. 小島肇: 医薬品等の薬効及び安全性評価を支える in vitro 試験の未来, 日本組織培養学会第 94 回大会 (2022.7.8)
5. 小島肇: 代替法に関する国内外の状況について代替法全般の最新動向, 日本動物実験代替法学会企画委員会主催講習会 (2022.8.25)

6. 小島肇: OECD テストガイダンス作成の経験から見たツールガイダンス整備の課題, 日本学術会議公開シンポジウム (2022.11.19)
7. 小島肇: Computational Toxicology の利用の実際と将来展望, 第 96 回日本薬理学会年会 (2022.11.30)
8. 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)
9. 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)
10. 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)
11. 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)

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