

令和7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7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。

本年度、日本で開発された皮膚感作性試験代替法 EpiSensA, ADRA 及び IL-8 Luc assay が GL497 (Defined Approach on Skin Sensitization) に追加収載されるとともに、免疫毒性試験 IL-2 Luc LTT が TG444A に追加収載された。さらに眼腐食性及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及び透過性試験 (TG437) に病理標本の利用に関する記載が追記され、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）

荒川大（金沢大学）

石田誠一（崇城大学）

今村弥佳（富士フイルム株式会社）

大野彰子（国立医薬品食品衛生研究所）

小野 敦（岡山大学薬学部）

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）

中村昌文（株式会社日吉）

堀 武志（国立医薬品食品衛生研究所）

安彦行人（国立医薬品食品衛生研究所）

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

B-1-1. 皮膚感作性試験代替法の開発

- 1) 研究代表者の平林容子および研究分担者の足利太可雄とともに、これまで日本で開発された皮膚感作性試験代替法 EpiSensA, ADRA 及び IL-8 Luc assay がガイドライン (GL) 497 (Defined Approach on Skin Sensitization) に追加収載されるよう尽力した。また、GL497 への *in silico* モデルの追加収載に関する WNT の議論に参加した。
- 2) 足利及び研究協力者の赤堀有実 (CERI)、小野敦 (岡山大学) 及び大野彰子 (国立衛研) らとともに、皮膚感作性試験代替法 α -SENS を TG442D に追加することを目指し、のバリデーション報告書、peer review 報告書及び TG 案を作成した。
- 3) 足利及び研究協力者の立花滋博 (食品薬品安全センター) らとともに、新規表皮モデルを用いた Epi2SensA を TG442D に追加することを目指し、フランスが主導するバリデーション研究に協力した。バリデーション報告書、peer review 報告書、バリデーション論文及び TG 案の作成に協力した。

バリデーションに参加した食品薬品安全センターは、日程の関係で施設間再現性試験に参加し、施設内再現性試験には参加できなかった。そこで、バリデーション終了後となってしまった

が、施設内及び施設間再現性が悪かった物質について追試験を実施した。

- 4) 研究協力者の今村弥佳（富士フィルム）らとともに、日本で開発された *in silico* 予測モデルの開発や組み込んだ場合の予測率の計算を行い、新規提案書（Standard Project Submission Form :SPSF）を作成した。

B-1-2. 免疫毒性試験代替法の開発

平林及び研究協力者の相場節也（元東北大学）とともに、免疫毒性試験 IL-2 Luc LTT の TG 採択を目指した。

また、免疫毒性試験 IL-2 Luc LTT に用いる 2H4 細胞の安定供給について、供給先の Tottori Bio と議論した。

さらに、免疫毒性試験の IATA 開発について検討した。

B-1-3. 腎毒性試験代替法（*in vitro* 腎毒性試験法）の開発

平林、研究分担者の松下幸平及び足利、協力研究者の荒川大（金沢大学）、堀武志及び安彦行人（国立衛研）とともに、日機総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 とするための手始めとして、Detailed Review Paper (DRP) 開発に関する SPSF を作成した。

B-1-4. 初回通過効果試験代替法（*in vitro* toxicokinetics）の開発

平林、研究分担者の山崎大樹、研究協力者の石田誠一（崇城大学）及び堀とともに作成した *in vitro* toxicokinetics に関する DRP 開発の SPSF が OECD にて承認されたため、DRP 開発に先んじて元となる Review paper の作成を進めた。また、一

般化合物及び及び農薬合わせて 100 物質程度について、ヒトでの小腸透過、代謝の情報がある化合物の選定を進めた。

B-1-5. 眼刺激性試験代替法の開発

日本主導で進めてきた眼腐食性及び強度刺激性物質を 同定するためのウシ角膜を用いる 混濁度及び透過性試験法（TG437）に病理標本の利用を追記した改定案を米国 Institute for *In Vitro* Sciences 社 (IIVS) とともに作成に務めた。

B-1-6. TG455: VM7Luc ER TA assay に用いる VM7 Luc4E2 細胞株の品質保証

株式会社日吉が保管している VM7 Luc4E2 細胞株が TG455 の適格性を満たすか米国及び英国のナショナルコーディネーターから打診を受けた。

TG455 の熟達度確認物質に準じた性能評価書の提出を株式会社日吉に打診したところ、結果がないことが明らかになった。そこで、品質保証試験の実施を依頼した。

B-2.WNT 対応

平林及び協力研究者の堀及び安彦とともに、OECD WNT の成果物を厚生労働行政に反映させるため、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。

平林は WNT 会議（2025 年 4 月 1－4 日）に現地で参加し、東野正明分析官、工藤俊明分析官（厚生労働省）および小島等は web で参加した。

C. 研究結果

C-1. TG、DRP 及び IATA 等の開発

C-1-1. 皮膚感作性試験代替法の開発

- 1) 2025年のWNT会議にて、EpiSensA, ADRA 及び IL-8 Luc assay が GL497 (DASS) に追加収載されることが決まり、6月にOECDにて公開された。なお、新たな*in silico*モデルのGL497への収載はWNTにて議論が継続中である。
- 2) 新規皮膚感作性試験代替法 α -SENS のバリデーション実験は昨年度終了した。今年度は、バリデーション報告書、peer review 報告書及びTG案を11月にOECDへ提出した。バリデーションの結果から、計画通りの再現性及び予測性が得られており、TG成立に支障となる問題点は見つからない。
- 3) 新規表皮モデルEpiDermを用いたEpi2SensAのバリデーション報告書、peer review報告書及びTG案をOECDへ11月に提出した。バリデーションの結果、EpiSensAの予測モデルでは再現性に欠けた。Epi2SensAの結果に合わせて陽性の判断基準を変更し、細胞生存率(60%：EpiSensAは80%)、4遺伝子の内、2遺伝子が基準を超えた場合を陽性（EpiSensAは1遺伝子）とした場合、バリデーションの受け入れ基準を満たした。これら結果を記載したバリデーション論文が3月末に受理された。

食品薬品センターにおける追加検討に関しては、施設内再現性及び施設間再現性が悪かった6物質を用いて評価した。その結果、Epi2SensAの陽性基準は、細胞生存率(60%)、4遺伝子の内、1遺伝子が基準を超えた場合が妥当と判断され、上記基準と若干

異なった。

- 4) 富士フイルムが提案した*in silico*モデルに関しては、11月にSPSFを提出した。採択の可否は2026年のWNTで決まる。

C-1-2. 免疫毒性試験代替法の開発

本年4月に開催されたOECD WNT会議において、免疫毒性試験IL-2 Luc LTTがTG444Aに追記され、6月に公開された。

Tottori-Bioと検討を重ねた結果、IL-2 Luc LTTに用いる細胞株2H4細胞はJCRB細胞バンクに寄贈し、国内外に配布して頂くことに合意を得た。

一方、WNT会議にて免疫毒性のIATA開発を提案したが、IATA事例報告を作成するよう指示された。ただし、IL-2 Luc LTTがTG444Aに追記されたことにより、IL-2 Luc assayと組み合わせる方法が白紙となった。IATA事例報告を作成するため、IL-1 Luc assayなどの他の作用機構を有し、再現性が確保されている試験法を探している。

C-1-3. 腎毒性試験代替法の開発

腎毒性試験代替法であるヒト腎細胞3D-RPTEC(R)のTGを目指し、DRPのSPSFを11月OECDに提出した。採択の可否は2026年のWNTで決まる。

C-1-4. 初回通過効果試験代替法の開発

2024年10月、SPSF「Detailed Review Paper for *in vitro* toxicokinetics」を作成し、厚生労働省を通じてOECDへ提出した。その結果、OECD WNTにて承認された(Project 4.188)。

DRPに先んじて、DRPの元となるReview paperを作成中である。

将来的にテストガイドライン作成する際には、対象物質の選定が必須となる。そこで、一般化学物質及び農薬合わせて100物質程度について、ヒトでの小腸透過及び代謝の情報を有する化合物について、選定を行っている。

C-1-5. 眼刺激性試験代替法の開発

日本主導で進めてきた眼腐食性及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及び透過性試験法（TG437）に病理標本の利用を追記した改定案が6月に公開された。

C-1-6. TG455: VM7Luc ER TA assay に用いる VM7 Luc4E2 細胞株の品質保証

熟達度確認物質アゴニスト 14 物質及びアンタゴニスト 10 物質を用いた品質保証試験の結果、すべての物質が適用範囲に入った。現在、報告書を作成中である。

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

SPSFを提出するため、2025年9月より東野分析官及び工藤分析官（厚生労働省）、平林、小島及び協力研究者の安彦、堀にて内容を確認し、修正を経たものが、2025年11月中旬にOECDに提出された。今年各国から提出された15件のSPSFの内、日本提案は3件であった。

8 Revision of TG 497: Proposal for Incorporating a Novel *in silico* Model to Predict Skin Sensitization Hazard and Potency

9 Proposal to Include the *in silico* RSRKE1 as an Alternative to the *in chemico* Method in OECD TG 497

12 DRP on *in vitro* renal cytotoxicity assays for future creation of new TG

このうち、#8, 9に関しては、昨年度、富士フイルムから提案した SPSF: Newly Developed QSAR, Consensus Model for Predicting Skin Sensitization が不採択になったことを受け、改定版を2つに分けて再提出したものである。

D. 考察

OECD TG に関する本年度の成果は、皮膚感作性試験代替法 EpiSensA, ADRA 及び IL-8 Luc assay が GL497 (Defined Approach on Skin Sensitization) に追加収載されるとともに、免疫毒性試験 IL-2 Luc LTT が TG444A に追加収載されたことである。さらに眼腐食性及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及び透過性試験 (TG437) に病理標本に利用に関する記載が追記された。今年度も3つの我が国発の試験法をTGに収載することができた。

来年度も、皮膚感作性試験代替法 α -SENS 及び Epi2SensA の TG 収載に向け、尽力している。また、*in vitro* toxicokinetics 及び *in vitro* 腎毒性試験法などの NAM 開発の OECD 提案もなされており、継続性を重んじた活動を続けている。

E. 健康危険情報
特になし

F. 結論

2025 年の WNT 会議後に、皮膚感作性試験代替法 EpiSensA, ADRA 及び IL-8 Luc assay が GL497 (Defined Approach on Skin Sensitization) に追加収載されるとと

もに、免疫毒性試験 IL-2 Luc LTT が TG444A に追加収載された。さらに眼腐食性及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及び透過性試験 (TG437) に病理標本に利用に関する記載が追記され、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

皮膚感作性試験代替法 α -SENS 及び Epi2SensA の TG 収載に向け、尽力する。また、*in vitro* toxicokinetics 及び *in vitro* 腎毒性試験法などの DRP を完成させる。

H. 研究発表

H-1. 論文発表

1. Murakami, R., Imanura, M., Takeshita, T., Kojima, H. and Hikida Y. Consensus model for skin sensitization assessment using a rule-based model and LLNA and GPMT statistics-based model, Computational Toxicology, 2025,34, 100348
2. 小島肇夫. NAMs の開発, Cosmetic Science, 2025;6:28-35.
3. 小島肇夫.動物実験代替法を用いた皮膚刺激性／皮膚感作性評価の現状、皮膚の測定評価と可視化、イメージング技術、(株)技術情報協会、東京、pp. 283-294, 2025
4. 小島肇夫.EpiSensA を用いた皮膚感作性試験代替法の使用判断、COSMETIC STAGE, 2025, 8,68-74.
5. 小島肇.コラム 代替法の規制利用の現状と限界、民事法研究会、動物共生権、東京、70-173、2025

G-2. 学会発表

1. 小島肇、*In vitro* 動物実験代替法の開発状況と今後の期待、安全性評価研究会 第 30 回実践学術セミナー (2025.4.19,東京)
2. 村上諒一、今村弥佳、館下正和、杉山聡、松本優香、小島肇、疋田泰士：ルールベースモデル、LLNA および GPMA 統計モデルを用いた複数の Key Event に基づく皮膚感作性 *in silico* コンセンサスモデル第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.3, 沖縄)
3. 小島肇.新薬開発における動物実験代替法の利用状況および今後の発展性について、第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025.7.3, 沖縄)
4. 小島肇.安全性評価における NAM の現状とレギュレーション利用への期待、第 28 回日本水環境学会シンポジウム (2025.9.17、富山)
5. Hajime Kojima, NAMs in Regulatory toxicology, Beihang University - Japan Universities Seminar on Biomedical Engineering, Biomaker and Environmental Health Collaboration(2025.10.17, Beijing, China)
6. 小島肇. New Approach Methods (NAM) を用いた食品のリスク評価の動向, ILSI Japan 食品リスク研究部会主催勉強会(2025.10.24, 東京)
7. Hajime Kojima and Yasuyuki Sakai:, External policy of JSAAE for broadening the 3Rs concept、日本動物実験代替法学会 第 38 回大会 (2025.11.3, 横浜)
8. C. Pellevoisin, H. Kojima, S. Hoffmann, T. Ashikaga, T. Landry, C. Romero, K. Guntur, M. Klausner, J. Stadnicki, H. Gehrke, R.

Mills-Goodlet, N. Panousi, V. J. Johnson, K. Narita, S. Tachibana, K. Kojima, and A. Armento: Me-Too Validation of the Epi2SensA Method Using EpiDerm Model for Skin Sensitization Testing Under OECD TG442D, 65th SOT(2026.3.25, Sandiego, USA)

- 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