

動物実験代替法の活用による多種多様な化学物質群の評価の合理化 -Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) の基本概念-

（独）製品評価技術基盤機構
化学物質管理センター
櫻谷 祐企

本発表の内容

当機構の業務経験を中心に、動物実験代替法の化学物質の安全性評価への活用動向について紹介

- OECD IATA-QSAR関連プロジェクト
(当機構からの赴任者が事務局を担当)
- 化審法審査における分解性・蓄積性の評価
- 有害性評価支援システム統合プラットフォーム
(HESS)

当該分野のOECD活動

化学物質の評価手法の信頼性の向上や国際調和性の推進を図る活動を実施(例:テストガイドラインやガイダンス文書の開発、GLP基準の策定等)。

従来のアプローチのみでは対処しきれない膨大な種類の化学物質の評価・管理は、近年の最重要課題の一つ。
→**動物実験代替法**の利用を推進する活動の拡大。

動物実験代替法の信頼性を確保し、その利用を推進するための基本コンセプトとして、**AOP**及び**IATA**に基づいた化学物質の安全性評価を提唱。

動物実験代替法

Alternative (test) method: 代替(試験)法。

Non-animal approaches: 新たな動物試験を実施しないアプローチ。

New approach methodologies (NAMs): 従来手法に対し、規制における利用経験が不十分な新しい手法。

In vitro, In chemico, HTS, HCS, Omics, In silico, (Q)SAR, Grouping, Category approach, Analogue approach, Trend-analysis, Read-across, Defined approach, ITS, STS, Battery approach, Weight of evidence etc.

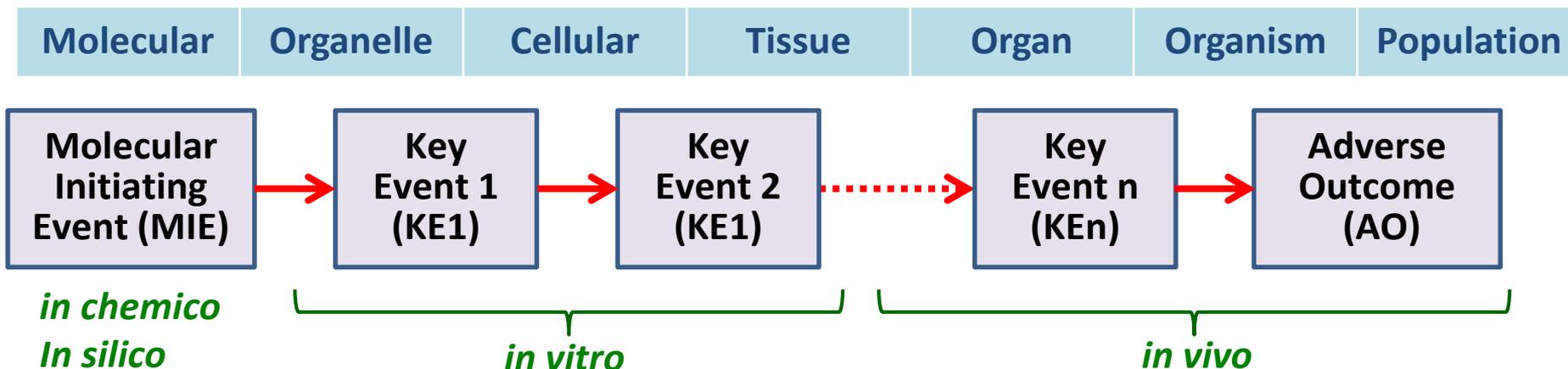
規制・活動等により用語の定義は異なる^{1,2}。例えば、REACH登録におけるNon-animal approachesとは、主に*In vitro*、QSAR、Read-acrossを指す¹。

¹ ECHA. Non-animal Approaches: Current Status of Regulatory Applicability Under the REACH, CLP and Biocidal Products Regulations. (2017).

² ICCVAM, A Strategic Roadmap for Establishing New Approaches to Evaluate the Safety of Chemicals and Medical Products in the United States. (2018).

Adverse Outcome Pathway (AOP)¹

化学物質が原因となる有害性発現のメカニズムに関する情報をハザード評価等に利用するためにステップ毎に整理・共有化する。



OECD AOPプログラム²で開発・完成されたAOPは6種類。開発中のAOPは60種類以上。AOP-KB (<https://aopkb.oecd.org/>)で公開・共有化。皮膚感作性のAOPは、REACHで採用されている³。

¹ OECD Series on Testing and Assessment No. 184: Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways. (2013).

² <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/projects-adverse-outcome-pathways.htm>

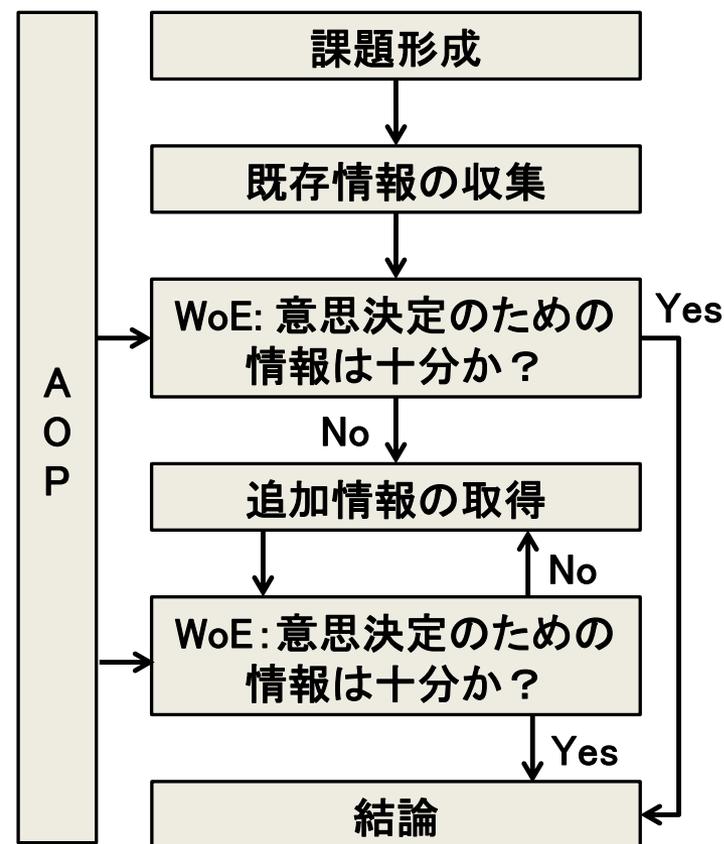
³ REACH Annex XII, "Standard Information Requirements for Substances Manufactured or Imported in Quantities of One Tonne or More"

Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)¹

既存の種々なタイプの情報(*in vivo*, *in vitro*, *in silico* 等)をWeight of Evidence (WoE)により統合的に解析し、目的に応じた結論を導出する。

AOPは、種々の情報の因果関係を明確化することで、結論の導出に必要な情報を把握する。

既存の情報が不十分な場合は、効率的な試験戦略を立てて、新規のデータを取得する(極力 *in vivo* 試験の実施を回避する等)。



AOPに基づくIATAのフレームワーク

¹ OECD Series on Testing and Assessment No. 260: Guidance Document on the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment. (2016).

OECD Cooperative Chemicals Assessment Programme (CoCAP)¹

経緯: 従来は、高生産量化学物質の個別物質評価を中心に活動を行ってきたが、評価対象が低生産量の化学物質に移行するに従い、共同で個別物質評価を実施する必要性が低下したため、2014年に活動内容を改正。

活動方針: IATAの開発・利用に関する活動の拡大。新規手法の安全性評価への利用方法に関する科学フォーラムの提供。新規手法を種々なタイプの化学物質の評価に利用するためのコモンプラクティスとベストプラクティスの確立。

プロジェクト:

- IATA Case Studies Project
- Combined Exposures Project

OECD IATA Case Studies Project¹

- 規制等における化学物質の評価に適した予測方法のケーススタディーを開発することより、IATAの利用経験を積む。
- ケーススタディーにより、各種ガイダンスに記述されている手法の具体例を示す。
- 作成されたケーススタディーのチェックポイント：
 - 科学的妥当性、長所
 - 不確実性が存在する部分
 - 他の規制での利用可能性
 - 今後ガイダンスの開発が必要な分野 …… 等
- 現在15の国/機関が参加：
米国、カナダ (HC, ECCC)、オーストラリア、日本、ドイツ、オランダ、デンマーク、スウェーデン、ノルウェー、EU (EC, ECHA, JRC)、BIAC、ICAPO

¹ <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>

これまでにIATA Case Studies Projectで レビューされたケーススタディー

No.	対象物質	エンドポイント	評価手法	リード国	各国・各地域の 関連法規・活動等
2015-1	ベンジジン系直接染料	変異原性	Read-across	カナダ 米国	カナダCMP US EPAアクションプラン
2015-2	ジフェニルアミン類 (含UVCB)	反復投与毒性	Read-across	カナダ	カナダCMP
2015-3	アリルエステル類	反復投与毒性	Read-across	日本	化審法、HESS PJ
2015-4	ビフェニル化合物	生物濃縮	Read-across	日本	化審法
2016-1	フェノリックベンゾトリアゾール類	反復投与毒性	Read-across	日本	化審法
2016-2	有機りん酸系農薬	神経毒性	累積リスク評価 (グルーピング)	米国	US EPA累積リスク評価
2016-3	n-アルカノール類	反復投与毒性	Read-across	ICAPO	SEURAT-1 PJ
2016-4	2-アルキル-1-アルカノール類	反復投与毒性	Read-across	ICAPO	SEURAT-1 PJ
2016-5	ピペロニルブトキシド	反復投与毒性	評価ワークフロー	EU (JRC) BIAC	SEURAT-1 PJ
2017-1	フェノール類	エストロゲン様活性	Read-across	カナダ 米国	カナダCMP Tox Cast PJ
2017-2	カナダ既存化学物質	生態毒性	スクリーニング	カナダ	カナダCMP
2017-3	ナノ酸化チタン	遺伝毒性	Read-across	EU (JRC) BIAC	ECHAグルーピングGD RAAF
2017-4	アリルアルコールアルキルカルボン酸エステル	反復投与毒性	Read-across	ICAPO	RAAF

当機構が作成

p.13,14

p.11,12

p.15

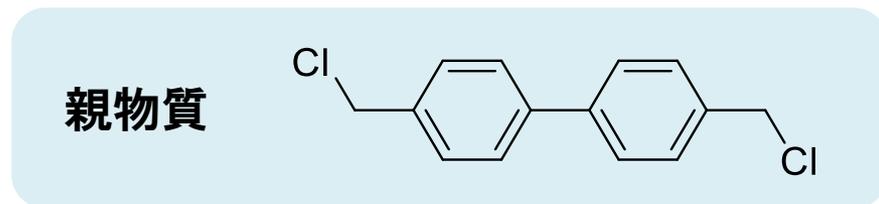
Read-across¹

- 化学構造が類似する物質のグループにおいて、同様の試験結果が得られることを推定し、未試験物質のデータギャップを補完する手法（カテゴリーアプローチ/アナログアプローチ）。
- 評価の信頼性を確保するため、Mode of Action (MoA)やAOP等、メカニズムに基づいてグループ化の仮説を立て、種々の観点からのエビデンスを用いて仮説を立証するアプローチが推奨されている。
- REACH登録における主要な代替法の一つ。欧米で研究開発が盛ん。化審法の新規化学物質の審査では、分解性・蓄積性の評価において限定的に活用（**類推**）。

¹ OECD Series on Testing and Assessment, No.194: Guidance on Grouping of Chemicals, Second edition. (2014).

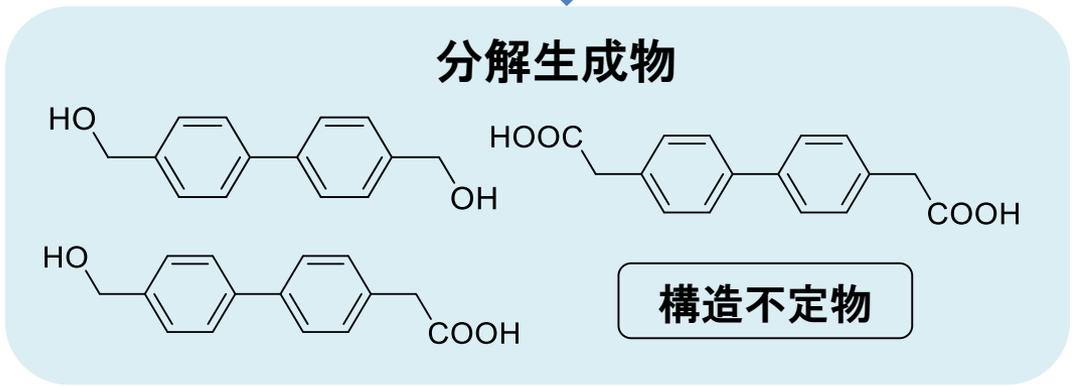
当機構作成のケーススタディ①¹

化審法審査の類推ルール²に基づき生物蓄積性が判定された
既存化学物質の評価の実例（2015-4）



低濃縮性

分解度試験



低濃縮性

類推

サポート
エビデンス

- 親物質より極性が小さい(HPLC)
- 他の類似物質の濃縮性
- QSAR予測

¹ OECD Series on Testing and Assessment No.254: Case Study on the Use of an Integrated Approach to Testing and Assessment of the Bioaccumulation Potential of Degradation Products of 4,4'-Bis(Chloromethyl)-1,1'-Biphenyl. (2016).

² 厚生労働省, 経済産業省, 環境省「新規化学物質の生物蓄積性の類推等に基づく判定について」(平成25年9月27日)
http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/todoke/shinki/130927_seibutsuchikuseki.pdf

当機構作成のケーススタディ①

レビューコメントの例¹:

分解度試験における分析データ(HPLC)を分解生成物の生物濃縮性の評価に効果的に活用している。

構造不定物の類推については不確実性が残る。→コメントを受けて、代謝シミュレータを用いて可能性のある分解生成物を全て予測することにより、不確実性を低減できることを例証。

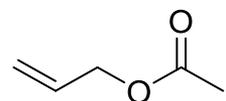
他国においても、様々な場面で活用することが可能と考えられる(例:カナダでは、取込と排出過程に基づく異なる評価手法が用いられているが、互いの評価手法による結果をサポートエビデンスとして用いることが可能と考えられる)。

¹ OECD Series on Testing and Assessment No.250: Report on Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA) First Review Cycle (2015), Case Studies on Grouping Methods as a Part of IATA (2016).

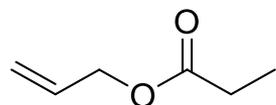
当機構作成のケーススタディ②¹

HESS PJの成果を基に、化審法の優先評価化学物質のリスク評価²での利用を想定した反復投与毒性のRead-across(2015-3)。

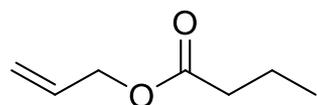
NOAEL (mmol/kg/d)



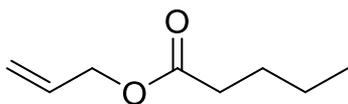
0.25 (実測)



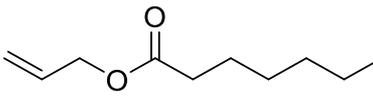
0.10 (Read-across)



0.10 (Read-across)



0.10 (Read-across)

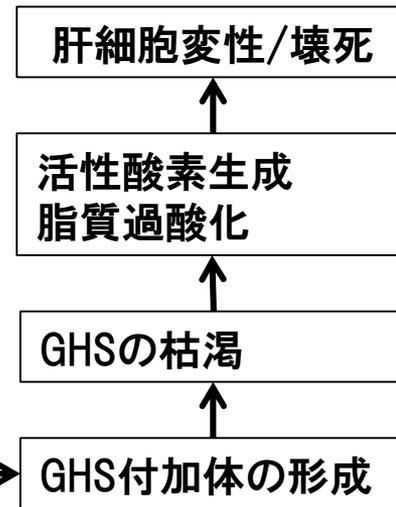
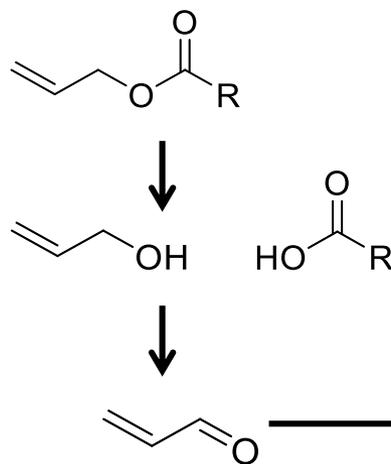


0.10 (実測)

⋮

⋮

仮説 (一部)



サポートエビデンス

反復投与毒性所見、実測代謝物、代謝速度 等

¹ OECD Series on Testing and Assessment No.253: Case Study on the Use of an Integrated Approach to Testing and Assessment for Hepatotoxicity of Allyl Esters. (2016).

² 厚生労働省, 経済産業省, 環境省「化審法に基づく優先評価化学物質のリスク評価の基本的な考え方」(平成24年1月)
http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/todoke/shinki/130927_seibutsuchikuseki.pdf

当機構作成のケーススタディ②

レビューコメントの例¹:

Read-acrossの仮説がMoA/AOPを基に適切に記述されている。カテゴリーを結論付けるため、様々なレベルにおいて説得性の高いサポートエビデンスが示されおり、Read-acrossの理論的根拠が正当化されている。

カテゴリーの構造領域の上限やアルキル鎖の分岐に関する定義が明確でない。トキシカント以外の代謝物の毒性影響について不確実性が残る。

他国の規制においても、スクリーニング評価や優先順位付け等様々な場面での活用が可能と思われる。但し、REACH登録におけるInformation Requirementsを満たすまでには至っていないと考えられる。

¹ OECD Series on Testing and Assessment No.250: Report on Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA) First Review Cycle (2015), Case Studies on Grouping Methods as a Part of IATA (2016).

他のケーススタディーの例 (EU&BIAC)¹

種々なタイプの情報・手法を用いて安全性を評価するための手順
[安全性評価ワークフロー] (2016-5)

課題 対象物質は、ボディローションの成分として安全に使用可能(2回/日)か？

既存情報による仮説の構築

PBKモデル → 分布臓器/部位。 *In silico*、HTS、HCT等 → MIE、毒性影響。

仮説に基づくAOPの想定とKEに対応する *in vitro* 試験の実施

AOP①: 肝・脂肪変性 (MIE: 核内受容体結合) → 実施試験: トリグリセリド蓄積

AOP②: 肝・線維化 (MIE: 蛋白質結合) → 実施試験: 星細胞活性

体内動態予測の精緻化

標的臓器における対象物質の濃度を暴露経路に基づき算出

実施した *in vitro* 試験の相当濃度の算出 (Virtual Cell Based Assay)

総合評価 上記情報を統合し、PoD、IVIVE、不確実性等に基づき結論を導出

¹ OECD Series on Testing and Assessment No.275: Chemical Safety Assessment Workflow Based on Exposure Considerations and Non-Animal Methods. (2017).

プロジェクト全体として レビュー経験から得られた主な考察

- メカニズムの類似性に基づくカテゴリー化のアプローチの定着を確認。一方、構造の相違性の観点からの考察は不十分な傾向にあり、著者・レビューアによって捉え方が異なることが多い。
- NAMsの具体的な活用方法が例証できた。例えば、低毒性(ナルコシス)であることのサポートエビデンスとしてToxCastデータを網羅的に活用 (ICAP0, 2016-3,4)。
- 評価の信頼性を示すだけでなく、不確実性の所在を明確にすることが重要。**不確実性の解析とコミュニケーション**に関するガイダンスの開発は最優先課題。
- IATA関連の各種ガイダンス・プロジェクトのマッピングとプロジェクト間の連携強化が必要。

不確実性の解析とコミュニケーション

- 最近公開された欧州食品安全機関（EFSA）のガイダンスに不確実性を解析する際の手順や各種解析手法が詳述されている^{1,2}。
 - (不確実性とは) *All types of limitations in available knowledge that affect the range and probability of possible answers to an assessment question.*
 - *Assessments must say what sources of uncertainty have been identified and characterise their overall impact on the assessment conclusion.*
- IATA Case Studies PJのケーススタディーは、科学的に理想的な例でなく、規制利用における実際的な例を示すことを意図したもので、データやリソースの制限等に起因する、種々の不確実性が内在している。
- 本PJでは、テンプレートを作成し、不確実性の解析結果の報告をケーススタディーの著者に依頼した。提出された不確実性の解析結果は、利用目的に対する不確実性の許容レベルを議論する際に有用であった。

¹ EFSA Scientific Committee. The principles and methods behind EFSA's Guidance on Uncertainty Analysis in Scientific Assessment, EFSA Journal 16 (2018) 5122.

² EFSA Scientific Committee. Guidance on Uncertainty Analysis in Scientific Assessments, EFSA Journal 16 (2018) 5123.

Considerations Document^{1,2}

- ケーススタディーと共にConsiderations Documentを毎年公開：
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>
- レビューアの意見：長所、不確実性の所在、自国の規制における利用可能性など。
- ケーススタディーから学んだ教訓を蓄積しつつ考察を深める（リビングガイダンス）。
- 2016年度版²では、5つの反復投与毒性のRead-acrossのケーススタディーを比較・検討。作成者による毒性の類似性の捉え方の違い等について考察。

¹ OECD Series on Testing and Assessment No.250: Report on Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment, First Review Cycle (2015), Case Studies on Grouping Methods as a Part of IATA. (2016).

² OECD Series on Testing and Assessment No.270: Report on Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment, Second Review Cycle (2016). (2017).

OECD QSAR Toolbox

- カテゴリーアプローチにより、未試験化学物質のデータギャップを補完することを支援する無料のツール。2008年に公開。最新版はVer. 4.2 (2018.2)。
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>
- 所有者:OECDとECHAの共有。開発者:ブルガス大。OECD 加盟国により管理されており、年1-2回の更新、数年毎のバージョンアップを継続して実施。
- 各国から提供された数多くのDBやグループ化のためのツールを搭載。当機構からは、化審法既存化学物質の分解性・蓄積性のDB、HESSの反復投与毒性のDB・ツールを提供。
- 現在実施中の開発で重視されているのは、混合物やUVCBIに対応するための機能開発や、外部システムのDB・ツールとの連携機能の開発(例:医薬品のDBやAOPのツール)による適用物質範囲の拡大。

当機構HPIにおいてQSAR Toolbox ver.4 のユーザマニュアルの和訳を2月下旬に公開予定 (<http://www.nite.go.jp/chem/qsar/qsartop.html>)

各国の規制に使用された データの活用事例

- **AMBIT**: CEFIC -LRI開発のケモインフォマティクスシステム。REACH登録データ(14, 570物質)を収載。混合物の成分、不純物、添加物等の詳細情報が利用可能。<http://cefic-lri.org/toolbox/ambit/>
- ジョーンズ・ホプキンス大によるREACH登録データ(9,801物質)のクラスター解析(反復投与毒性、眼刺激性、皮膚感作性)。化学物質の開発段階におけるスクリーニング目的の利用を想定。

T. Luechtefeld, A. Maertens, D. P. Russo, C. Rovida, H. Zhu and T. Hartung, Global Analysis of Publicly Available Safety Data for 9,801 Substances Registered under REACH from 2008-2014, *ALTEX* **33** (2016) 135-148.

T. Rabesandratana, A Crystal Ball for Chemical Safety, *Science* **351** (2016) 651.

- **CATALOGIC**: ブルガス大開発の生分解性予測QSARシステム。日化協の協力の下、届出事業者の承諾を得て、化審法新規化学物質の非公開データ(約1,000物質)を導入し改良。

<http://oasis-lmc.org/products/models/environmental-fate-and-ecotoxicity/catalogic-301c.aspx>

有害性評価支援システム 統合プラットフォーム(HESS)

- 化学物質の反復投与毒性をカテゴリーアプローチにより評価するための支援システム。OECD QSAR Toolboxとの互換性有。
- NEDO/経済産業省プロジェクトの開発品¹
プロジェクトリーダー: 安評センター 林 真 名誉理事長
実施機関: 富士通、NITE、国立衛研、東北大、ブルガス大、
関西学院大
- AOPに基づく反復投与毒性のカテゴリーアプローチを世界に先駆けて例証²。
- 当機構のHPから無料でダウンロード可(2012-)。2月下旬に更新予定。<http://www.nite.go.jp/chem/qsar/hess.html>

¹ 経済産業省. 構造活性相関手法による有害性評価手法開発

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/other/kenkyu_kaihatsu/kouzou.html

² Hayashi, M. and Sakuratani, Hemolytic Anemia Induced by Anilines and Nephrotoxicity Induced by 4-Aminophenols. In: OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 138 , Report of the Workshop on Using Mechanistic Information in Forming Chemical Categories. (2011) Annex 8, 140-167.

HESSのDB・カテゴリーの拡張

HESS搭載の反復投与毒性試験データベース	物質数
HESS (化審法既存化学物質・NTP等、2012)	908
COSMOS (化粧品等、COSMOS PJ 提供、2014)	852
ToxRef (農薬等、ToxCast PJ 提供、2014)	493
医薬品 (安全性評価研究会 提供、2014)	50
Tox-Omics (Tox-Omics PJ 提供、2015)	31
TGP (Toxicogenomics PJ 提供、2015)	124

HESS PJ 開発の
公開当初からのDB
(当初は、500物質)

他のプロジェクトの
協力を得て公開後
に追加

化審法既存化学
物質:2万種以上

試験
デー
タ有

HESSのカテゴリーの 信頼性区分	カテゴリー/ アラート数	該当する未試験既 存化学物質の数*
ランクA カテゴリー	9	848
ランクB カテゴリー	14	510
ランクC カテゴリー	14	2088
ランクなし カテゴリー	13	663
アラート (カテゴリー未成立)	95	2589

公開当初からの
信頼性区分
(当初は、33カテゴリー)

花王(株)の協力を得
て公開後に追加
(2014-)

類似物質の
試験
デー
タ有

*HESS搭載のインベントリーに基づく(主に有機低分子化合物)

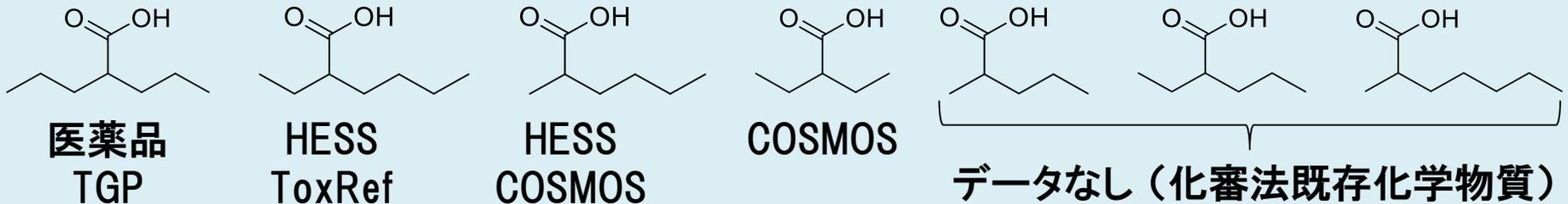
HESSのアラートの例

【2016年2月24日: AFP通信】フランスでてんかん治療に使用される普通薬に胎児のときにさらされたために、乳幼児約450人が先天性欠損症を生じていたことが、保健当局が23日に発表した報告書で明らかになった (<http://www.afpbb.com/articles/-/3078082>)。

EU ToxRisk PJ (<http://www.eu-toxrisk.eu/>) では、バルプロ酸の発生毒性に関するケーススタディーの開発を開始¹。

HESSのバルプロ酸アラート: 肝毒性、2014年追加。

バルプロ酸とその類似物質のHESSにおける試験データ



このレベルの情報の利用方法は？

¹ J. Palmer, A. Smith, R. Burrier, E. Donley, F. Kirchner, D. Kroese, R. Stöber, N. Kleinstreuer, EU-ToxRisk Case Study: Developmental Toxicity Potency of Valproate Analogues in a Human Pluripotent Stem Cell-Based Assay, 10th Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (20-24 August 2017, Seattle, Washington, USA).

まとめ

IATAに基づく動物実験代替法の活用

- 特定の情報のみを利用して評価
→ 種々なタイプの情報を用いた総合評価 (WoE)
- 種々なタイプの情報の因果関係の明確化と共有化 (AOP)
- ハザード評価の確定 + 効率的な試験戦略の確立
- 情報や評価結果の信頼性の確保
+ 不確実性を認識し、目的に応じて柔軟に活用
- 多種多様な情報の入手・活用を支援するためのツール開発



多種多様な化学物質群の評価の合理化

参考文献

IATAとAOPに関するOECD活動

N. Delrue, M. Sachana, Y. Sakuratani, A. Gourmelon, E. Leinala and R. Diderich. The Adverse Outcome Pathway Concept: A Basis for Developing Regulatory Decision Making Tools. *Altern. Lab. Anim.* **44** (2016) 417-429.

Y. Sakuratani, M. Horie and E. Leinala, Integrated Approaches to Testing and Assessment: OECD Activities on the Development and Use of Adverse Outcome Pathways and Case Studies, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* (in press) DOI: 10.1111/bcpt.12955

化審法新規化学物質試験データによる生分解性QSARモデルの改良

N. H. Dimitrova, I. A. Dermen., N. D. Todorova, K. G. Vasilev, S. D. Dimitrov, O. G. Mekenyan, Y. Ikenaga, T. Aoyagi, Y. Zaitso and C. Hamaguchi, CATALOGIC 301C Model – Validation and Improvement, *SAR QSAR Environ. Res.* **28** (2017) 511-524.

有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS)

Y. Sakuratani, H. Q. Zhang, S. Nishikawa, K. Yamazaki, T. Yamada, J. Yamada, K. Gerova, G. Chankov, O. Mekenyan and M. Hayashi, Hazard Evaluation Support System (HESS) for Predicting Repeated Dose Toxicity Using Toxicological Categories. *SAR QSAR Environ. Res.* **24** (2013) 617-629.

T. Yamada, Y. Tanaka, R. Hasegawa, Y. Sakuratani, J. Yamada, E. Kamata, A. Ono, A. Hirose, Y. Yamazoe, O. Mekenyan and M. Hayashi, A Category Approach to Predicting the Repeated-dose Hepatotoxicity of Allyl Esters. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **65** (2013) 189-195.

ご清聴ありがとうございました。