

動物試験の代替法に関する調査

栗田招子*, 駒林卓磨**, 鶴居義之*

* 独)農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

** 内閣府食品安全委員会事務局

近年、動物愛護、試験コスト及びメカニズム解明並びに統合的評価の観点から、実験動物を用いた *in vivo* 毒性試験に代わる評価方法の需要が高まっている。OECD では、リードアクロス、AOP (Adverse Outcome Pathway), *in chemico*, *in vitro*, *in vivo* などのデータを組み合わせることにより、より効率的、効果的に評価を行う IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment) を推奨しており、IATA に関する様々なガイダンス文書やテストガイドラインが公表されている。本調査では OECD 主導の Case Studies Project において実施された IATA に関するケーススタディについて検討し、そのうちの神経毒性及び内分泌かく乱の 2 つについて内容把握を行った。選択したケーススタディについて、いずれもあらゆる神経毒性や内分泌かく乱を検出できるものではなく、特定の神経毒性及び内分泌かく乱に関わる重要事象 (KEs : Key Events) を代替試験法を用いて検出することにより、既存の試験を代替できる可能性を検証したものであった。しかしながら、このようなケーススタディの積み重ねは、1) 化学構造類似の新規化合物については、従来の *in vivo* 毒性試験の代わりに代替試験法の結果及び既存化学物質の毒性試験結果によるリードアクロスによる評価、あるいは 2) AOP が確立したエンドポイントについては、代替試験法のみによる評価を行うといったデータ要求見直しの際の重要な知見になると考えられる。

Keywords ; AOP, *in vitro*, *in chemico*, IATA, KEs, OECD

緒言

新規化合物を有効成分とする農薬登録においては、有効成分に係る急性毒性、短期毒性、慢性毒性、発がん性、遺伝毒性、生殖発生毒性、神経毒性等の評価項目に対し実験動物を用いた *in vivo* 毒性試験のフルパッケージによる評価が行われている。

しかし、このようなフルパッケージによる評価は膨大な数の既存化学物質や新規化学物質には、資源配分の限界から必ずしも全ての化学物質に適用できない。このため、近年、OECD では、評価対象物質による生体内での分子レベルの反応から最終的な有害性発現に至るまでの経路 (AOP) とそれに関わる重要事象 (KEs) を明らかにし、KEs に関わるリードアクロス、*in silico*, *in chemico*, *in vitro* 試験などの代替試験法を組み合わせることにより、より効率的、効果的に評価を行う「試験評価統合アプローチ (IATA)」を推進しており、IATA に関する様々なガイダンス文書やテストガイドラインが公表されている。

特に、皮膚刺激性、眼刺激性及び皮膚感作性については、それぞれ OECD ガイダンス文書 No. 203, No. 263 及び No. 256 において、*in vitro* 試験法を組み合わせることにより GHS のハザード区分判定を可能にする IATA ガイダンスが示され、利用可能な新規テストガイドラインが継続的に公表されており、欧州等の農薬の評価で採用されている。

一方、我が国では、2019 年農薬取締法改正において、

参議院の附帯決議で動物実験の 3R (代替法活用、使用数削減、苦痛軽減) が求められ、これを推進するため、我が国の農薬の評価に皮膚刺激性、眼刺激性及び皮膚感作性の *in vitro* 試験及びその評価法を導入したところである。

今回、上記以外の試験のうち神経毒性及び内分泌かく乱について、代替試験等の導入を検討するため、OECD 等海外における開発、検討状況を調査した。

1. はじめに

1.1. IATA の概要について

IATA とは、化学物質の毒性等について複数の情報源を基に総合的な評価を行うためのアプローチである。複数の情報源とは、物理化学的性状や構造活性相関 ((Q) SAR), リードアクロス, AOP, *in chemico*, *in vitro*, *in vivo* などのデータのことを指し、これらのデータを統合し証拠の重みを付けて評価することにより、化学物質における安全性を確保するための指針として用いることが可能である。

1.2. OECD IATA Case Studies Project について

OECD は IATA に関して、化学物質共同評価プログラム (CoCAP : Cooperative Chemicals Assessment Programme) の下で Case Studies Project を 2015 年に開始した。このプロジェクトは、規制での使用に適した

予測のケーススタディを実施し、IATA の使用実績を増やすことを目的としている。

これまでに実施されたケーススタディは、OECD が発行している報告書「Report on Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA)」の First Review Cycle (2016 年発行) から Sixth Review Cycle (2021 年発行) に掲載されている。公表されたケーススタディ数は 24 件あり (図 1)、エンドポイント別の内訳は、反復投与毒性 12 件、神経毒性 3 件、繁殖毒性 2 件、内分泌かく乱 2 件、発生毒性 1 件、遺伝毒性 1 件、変異原性 1 件、その他の試験 2 件 (生態毒性、生物濃縮) である。エンドポイント別の件数を以下の図に示す。このうち農薬を対象としたケーススタディは、反復投与毒性 2 件、神経毒性 3 件、内分泌かく乱 1 件の合計 6 件であった。

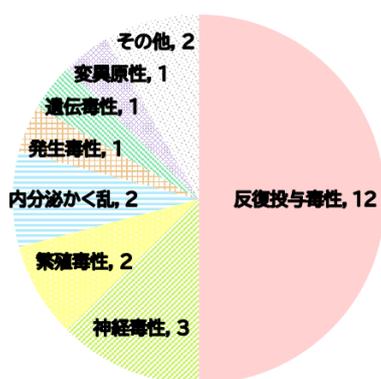


図 1. OECD の公表するケーススタディのエンドポイント別内訳 (エンドポイント名、件数の順)

これらのケーススタディの中から、2020 年に公表された神経毒性に関するケーススタディ「Case Study on the use of Integrated Approaches to Testing and Assessment for Mitochondrial Complex-III-mediated neurotoxicity of Read-Across to other strobilurins (他のストロビルリン系殺菌剤へのリードアクロスによるアゾキシストロビンのミトコンドリア複合体IIIを介した神経毒性について IATA を用いたケーススタディ)」²⁾及び 2019 年に公表された内分泌かく乱に関するケーススタディである「Case Study on the Use of an Integrated Approach to Testing and Assessment for Identifying Estrogen Receptor Active Chemicals (エストロゲン受容体 (ER) 活性物質の IATA の利用による評価に関するケーススタディ)」³⁾の計 2 件について調査した。以下に各ケーススタディの内容をまとめた。

2. ケーススタディ

2.1. 他のストロビルリン系殺菌剤へのリードアクロスによるアゾキシストロビンのミトコンドリア複合体IIIを介した神経毒性について IATA を用いたケーススタディ

2.1.1. 背景

ストロビルリン系殺菌剤は、ミトコンドリア複合体III (以下、複合体III) のシトクロム b のキノール酸化部位に結合して ATP の生成を阻害する作用を持っており、EU で登録されている剤は 10 種類程度である。標準的な *in vivo* 試験では、比較的安全であることが示されている。神経毒性については、反復投与毒性試験 (*in vivo* 試験) では強い兆候は見られないが、*in vitro* 試験では複数の試験で複合体IIIを介したメカニズムによる神経毒性を示すシグナルがあることから、神経毒性の潜在性が示唆されている

(Pearson et al. 2016, Regueiro et al. 2015, Simon et al. 2019)。

2.1.2. 目的

本ケーススタディの目的は、他のストロビルリン系殺菌剤へのリードアクロスによるアゾキシストロビンの複合体IIIを介した潜在的な神経毒性について、その正当性を新規アプローチ法 (NAM: New Approach Methodology) のデータで示し、げっ歯類の神経毒性試験 (OECD TG424) の代替とすることである。

2.1.3. 供試化合物

本ケーススタディのリードアクロスに用いた評価対象化合物はアゾキシストロビンであり、類似化合物はストロビルリン系殺菌剤のピラクロストロビン、ピコキシストロビン、トリフロキシストロビン、クレソキシムメチルの 4 剤である。類似化合物は EU の規制当局において評価・承認を受けたストロビルリン系殺菌剤について、ADME、神経毒性を中心に既存の *in vivo* データを収集し、さらに、アゾキシストロビンと類似した作用機序、トキシコフォア、神経毒性の潜在性、トキシコキネティクスを共有しているという仮説に基づいて選択した。また、作用機序の参照化合物として、神経毒性が既知の複合体III阻害物質であるアンチマイシン A を用いた。

本ケーススタディに用いた化合物名、使用用途、ADME 及び神経毒性に関する *in vivo* データの概要を表 1 に示す。

2.1.4. AOP

本ケーススタディでの推定 AOP (図 2) は、複合体IIIを阻害すると神経毒性が発現することである。分子開始イベント (MIE: Molecular Initiating Event) は阻害剤の複合体IIIへの結合、KE1 は複合体IIIの阻害、KE2

表1. 本ケーススタディの供試化合物と *in vivo* データ (ADME, 神経毒性) の概要

使用用途	評価対象	類似				参照
化合物名	アゾキシストロ ビン	ピラクロストロ ビン	ピコキシストロ ビン	トリフロキシス トロピン	クレソキシムメ チル	アンチマイシン A
毒性	High	Moderate	High	Low	Low	No data
吸収	Moderate	Moderate	未実施	Low	Low	No data
分布	Extensive	Extensive	Extensive	Extensive	Extensive	No data
代謝	High	Moderate	High	Extensive	High	No data
排泄	—	急性及び90日 間反復投与と神経 毒性でなし	反復経口投与毒 性で神経毒性検 出せず	急性及び90日間 反復投与と神経毒 性でなし	急性及び90日 間反復投与と神経 毒性でなし	—



図2. ミトコンドリア複合体IIIを介した神経毒性の推定 AOP

はミトコンドリアの機能不全, KE3 は神経細胞の変性, AO は神経細胞への毒性であり, OECD で承認を受けたミトコンドリア複合体阻害によるパーキンソン症候群の運動障害発現の AOP に基づいた。

2.1.5. AOP 各キーイベントのアッセイとその他のデータ (NAM データ, *in silico*)

本ケーススタディで用いた手法について表2に示す。MIE は, 2つのアッセイがあり, 一方は, 受容体のドッキングに関する研究についてモデリングを用いた。もう一方は, 物理化学的なパラメータに基づく類似性研究について, Tanimoto 係数, 3D 構造類似性, SMARTS を用いた。

KE1 は, 細胞及び電子伝達系阻害部位の酸素消費速度 (OCR) について, シーホース・バイオアナライザーを用い, 神経系の LUHMES 細胞を供試し測定した。

KE2 のミトコンドリアの機能不全は, OCR, 膜電位, 解糖系, ATP レベルでの影響を確認した。OCR への影響は, シーホース・バイオアナライザーを用い, LUHMES 細胞, 腎臓系の RPTEC 細胞, 肝臓系の HepG2 細胞を供試し測定した。膜電位への影響は, ミトコンドリア膜電位アッセイを用い, 神経系の SH-SY5Y 細胞, RPTEC 細胞, HepG2 細胞を供試し測定した。解糖系への影響は, ミトコンドリア呼吸が阻害される際に副産物として生成される乳酸について, LUHMES 細胞, SH-SY5Y 細胞, RPTEC 細胞, HepG2 細胞を供試

し測定した。ATP レベルへの影響は, ミトコンドリアが機能不全に陥った際に細胞内の ATP が減少することについて, SH-SY5Y 細胞を供試し測定した。

KE3 は, 神経細胞への変性について2つのアッセイがあり, 一方は, 細胞の成長の低下や分解を示す細胞生存率への影響を, レサズリン又はヨウ化プロビジウム (PI) 染色を用い, SH-SY5Y 細胞, RPTEC 細胞, HepG2 細胞を供試し測定した。もう一方のアッセイは, 神経突起の伸長に関する影響を, LUHMES 細胞と SH-SY5Y 細胞を供試し測定した。

AOP の各キーイベントに係るアッセイの他に, 細胞への反復投与, *in vitro in silico* モデルによる細胞内濃度予測, PBPK モデル解析を実施した。長期にわたる暴露の影響を評価するために実施した反復投与は, LUHMES 細胞では神経突起の伸長と生存率 (レサズリン), SH-SY5Y 細胞では ATP 量及び神経突起の変性及び生存率 (PI), RPTEC 細胞では乳酸濃度及び生存率 (レサズリン) について測定した。*In vitro in silico* モデル (バイオアベイラビリティ) は, *in vitro* での KE 活性化の測定データを *in vivo* に外挿することが必要なため, ストロビルリン系の細胞内濃度を適切に評価できるよう, コンピュータを用いて細胞内濃度のモデル化を実施した。また, PBPK モデルを用いて, 被験物質に暴露した際のヒトの組織内濃度と *in vivo* ラットの濃度を予測した。

表2. 本ケーススタディに用いた手法

キーイベント		アッセイ	目的	細胞株
MIE	阻害剤がミトコンドリア複合体IIIに結合	受容体のドッキングに関する調査	モデリングによる複合体IIIと化合物の相互作用の評価	—
		類似性調査	Tanimoto 係数による構造類似性の評価	—
			三次元構造による構造類似性の評価	—
			SMARTS による構造類似性の評価	—
KE1	ミトコンドリア複合体IIIを阻害	シーホースアッセイ	細胞及び阻害部位の酸素消費速度(OCR)の測定	LUHMES
KE2	ミトコンドリアの機能不全	ミトコンドリア膜電位アッセイ	シーホース・バイオアナライザーを用いた OCR の測定(OCR への影響測定)	LUHMES RPTEC HepG2
			電子伝達系阻害による膜電位低下の測定(膜電位への影響測定)	SH-SY5Y RPTEC HepG2
			呼吸阻害による乳酸の生成の測定(解糖系への影響測定)	SH-SY5Y RPTEC HepG2
			ミトコンドリア機能不全による細胞内の ATP 減少の測定(ATP レベルへの影響測定)	SH-SY5Y
KE3	神経細胞の変性	細胞生存アッセイ	細胞生存率(レサズリン)の測定	LUHMES SH-SY5Y RPTEC HepG2
			細胞生存率(ヨウ化プロピジウム)の測定	SH-SY5Y
		神経細胞の正常性	神経突起の伸長の測定	LUHMES SH-SY5Y
項目			目的	細胞株
反復投与			神経突起の伸長及び細胞生存率(レサズリン)の測定	LUHMES
			ATP 量の測定	SH-SY5Y
			神経突起の変性及び細胞生存率(ヨウ化プロピジウム)の測定	
			乳酸濃度及び細胞生存率(レサズリン)の測定	RPTEC
<i>in vitro in silico</i> モデル (バイオアベイラビリティ)			<i>in vitro</i> での KE 活性化の測定データを <i>in vivo</i> に外挿するため、 <i>in silico</i> で細胞内濃度のモデル化	—
PBPK モデル			被験物質に暴露した際のヒト組織内及び <i>in vivo</i> ラットの濃度予測	—

2.1.6. 結果

OCR で測定した複合体IIIの阻害 (KE1) は、評価対象化合物であるアゾキシストロビンの複合体III阻害率は55%、類似化合物であるピラクロストロビンやピコキシストロビンは80%、アンチマイシン A は88%以上の阻害効果を示した。膜電位への影響 (KE2) は、

アンチマイシン A が顕著で、評価対象化合物と類似化合物では桁違いに小さい結果を示した。神経細胞の変性 (KE3) について、SH-SY5Y 細胞の神経突起伸長アッセイでは、評価対象化合物は陰性であったが、類似化合物の一部は弱い影響を示した。

2.1.7. 結論

本ケーススタディのリードアクロス仮説は、OCRや膜電位への影響などのNAMデータによって裏付けられた。このことから、アゾキシストロビンの複合体IIIを介する潜在的な神経毒性が類似化合物と比較してより強いという証拠はなく、評価対象化合物のアゾキシストロビンは神経毒性を示さないと結論付けられた。

3. エストロゲン受容体 (ER) 活性物質の IATA の利用による評価に関するケーススタディ

3.1. 内分泌かく乱物質について

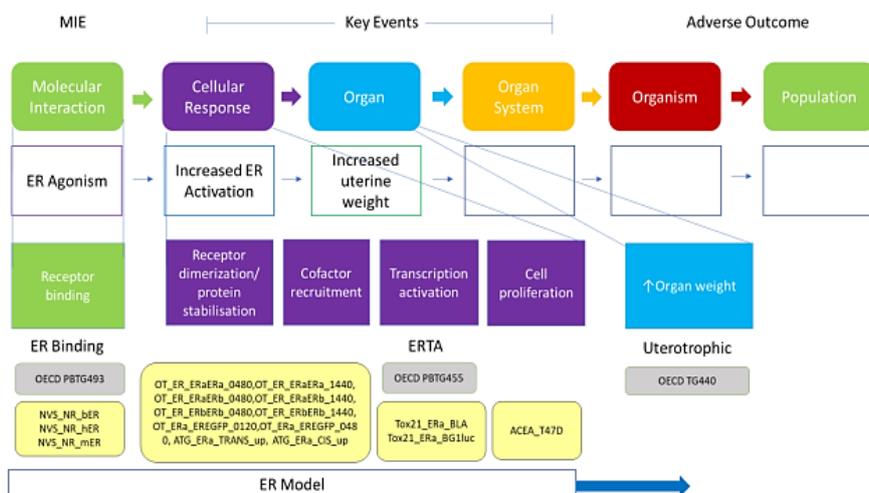
内分泌かく乱物質は正常な内分泌機能を阻害し、生殖能力の低下などの悪影響をもたらす可能性を有する。内分泌系は高度に統合された複雑なシステムであり、暴露後の活動は、調査する器官やタイムポイントによって変動する。潜在的な影響を把握するために、内分泌活性物質への暴露後の健康影響が研究されており、多くの研究論文やレビューが執筆されている。これらの研究発表以外にも、内分泌かく乱化学物質の評価に関する多数のガイダンス文書や標準化された試験ガイドラインが発表されている。OECDは、科学文献の中から、標準化することが可能であり、化学物質の規制の中で内分泌かく乱化学物質がもたらすリスクを検出し、特徴付けるのに使用可能な試験方法を調査した。内分泌かく乱物質の試験と評価に関する概念的フレームワーク（2012年改訂版）には、OECDの試験ガイドラインや、化学物質の内分泌かく乱作用の評価に利用可能な試験方法が掲載されている。分析が必要な環境中の潜在的な内分泌かく乱物質の数を

鑑みると、これらの物質をより早く分析するために、より迅速で費用対効果の高い方法を取り入れる必要がある。

3.2. 本ケーススタディにおける IATA について

本ケーススタディではハイスループットスクリーニング(HTS)アッセイとER活性の計算モデルを組み合わせIATAを構築している。内分泌活性物質への暴露後の健康影響はよく研究されており、今回の事例では哺乳類系でER結合から下流のER経路を調べる16種類のハイスループット*in vitro*アッセイを集めたデータを用いてERアゴニスト活性の評価が行われた。図3は計算モデルの基礎となったER経路とキーイベント及び*in vitro* HTSアッセイと各キーイベントとの対応関係を示したものである。

16種類のアッセイはEPAのToxcastプログラムにて使用されたアッセイ群より選定された。いずれもER経路のいくつかのKE（例：受容体の二量化、DNA結合、転写促進、遺伝子発現、細胞増殖）に加えて、MIE（受容体結合）を測定するものである。また、これらのアッセイにはヒト、マウス、ウシのER結合アッセイや、様々なヒト組織におけるER経路の相互作用が含まれている。本IATAの用途は、ERアゴニスト活性に基づく環境化学物質のスクリーニングとさらなる実験を行うための優先順位付けであり、さらなる実験としては高次の*in vivo*試験（雌の思春期アッセ



ER pathway showing MIE and key events and how they relate to OECD technical guidance (grey squares). Perturbation of the MIE and downstream key events (KEs) are evaluated using high-throughput screening (HTS) assays (yellow squares). ER = Estrogen receptor; ERTa = ER transactivation; MIE = molecular initiating event.

図3. ER 経路, *in vivo* HTS アッセイとキーイベントとの対応関係

表3. 本 IATA が代替となることを目標とするガイドライン

PBTG493	ER Binding	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) In vitro Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity	OECD, 2015b
PBTG455	ER Transactivation	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	OECD, 2015a
TG440	Uterotrophic assay	Uterotrophic Bioassay in Rodents: A Short-Term Screening Test for Oestrogenic Properties	OECD, 2007

イ、二世世代生殖毒性試験など)が想定されており、この結果から内分泌関連活性性を評価することが考えられる。現行のガイドラインであるER結合 (OECD TG493), ER転写活性化 (OECD TG455), 子宮肥大試験 (OECD TG440) の代替とすることが本モデルの目標である (表3)。

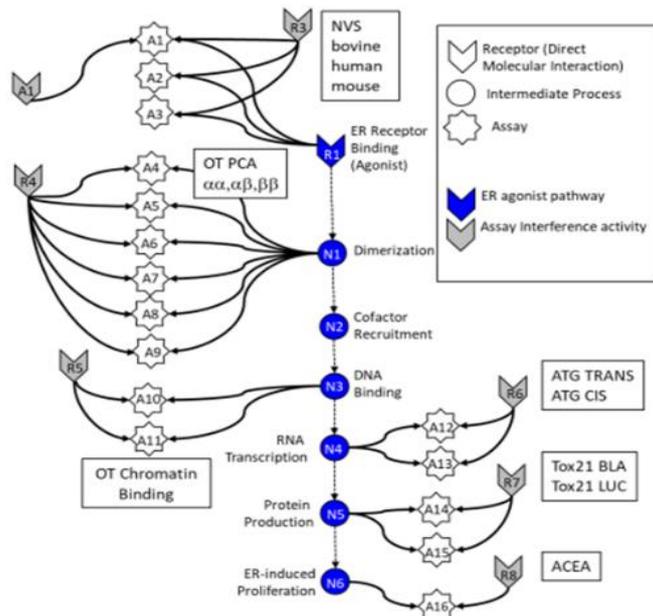
3.3. 本 IATA の仕組み

本 IATA は検査対象物質が ER アゴニストとして作用するかどうかの情報を提供するように設計されている。個々のアッセイのデータについて計算モデルに統合し、モデルから得られたスコアが物質の ER アゴニスト活性の特定、定量化に利用される。

無細胞結合アッセイを除くアッセイにおいては化学物質を濃度反応形式で実施し、無細胞結合アッセイでは最初に単一のスクリーニング濃度 (25 μ M) で実施し、被験物質がアッセイで活性化した場合、濃度反応形式でアッセイを実施した。RNA 転写レベルを測定するアッセイを除く全ての *in vitro* アッセイについて

は17 β -エストラジオールで正規化した (17 β -エストラジオールの活性=1)。RNA 転写産物のデータは溶媒 (DMSO) 対照からの倍数変化として正規化した。異なる *in vitro* アッセイの結果を統合する際には、0.01~100 μ M の14種類の標準化された濃度での合成濃度反応曲線を作成し、結果を「ER 経路モデル」と呼ぶ計算モデルに含めた。本モデルの仕組みを図4に示す。

この図には、3種類のノードがある。黒色のノードは、図3のERアゴニスト経路における一連の既知の生物学的プロセスを表す。灰色のノードは、化学物質が引き起こす可能性のあるアッセイ干渉プロセスである。白色のノードはアッセイである。ER または干渉ノードとアッセイノードを結ぶ線は、生物学的ノード (アゴニストまたは干渉) の1つが活性化された場合に、どのアッセイが活性化されるかを示している。例えば、化学物質が真のアゴニストである場合、矢印がER受容体結合/アゴニストノードと全てのアッセイノードを結んでいるため、すべてのアッセイ (A1~A16) がアクティブになる。化学物質がアゴニストではなく、例えば干渉プロセスR3によってアッセイA1



The input data for the model includes concentration-response data for 16 ER-related *in vitro* assays. The model produces scores for agonist activity (blue) and for assay interference activity (grey). These scores can then be compared with reference chemicals, structure classes, and other properties.

図4. ER 経路モデルの仕組み

～A3 が妨害された場合、アッセイ A1～A3 は活性化されますが、他のアッセイはどれも活性化されません。このモデルを用いて各化学物質のアゴニスト、アンタゴニスト、干渉の各ノードの濃度反応曲線を作成し、濃度反応曲線の積分として AUC が得られる。ER アゴニストの AUC モデルスコアは 0 (活性なし) から 1 (17β-エストラジオールの活性) の範囲になるように正規化される。モデルスコアは 0.001 未満の値の際は ER の活性化がないとみなし、スコアが 0.1 以上の場合は、陽性と判断する。スコアが 0.001<AUC<0.1 の際は、これらの化学物質が 1 つまたは 2 つのアッセイでのみ活性を示し、活性は試験された最高濃度に限られていたため、活性の有無は決定できません。

このモデルを、1812 種類の化学物質からなる ToxCast ライブラリに適用したところ、活性が試験した濃度範囲外であった弱いアゴニストを除き、正しくアゴニストを同定することができた。なお、この 1812 種類の化学物質の中には 387 種の農薬活性成分が含まれている。

3.4. ER 経路モデルの性能評価

ER 経路モデルの性能評価の一環として、以下の 3 組の参照化学物質と比較した。

- (1) *in vitro* ER アッセイの結果から ER アゴニスト活性を有すると複数報告のある参照化学物質のセット (*in vitro* 参照化学物質)
- (2) *in vivo* ガイドラインに則した子宮肥大データを有すると複数報告のある参照化学物質のセット (*in vivo* 参照化学物質)
- (3) 米国 EDSP Tier1 ガイドラインの ER アッセイ (ER 結合アッセイ, ER 転写活性化アッセイ, ER 子宮刺激性アッセイ) のデータの結果を持つ化学物質セット

比較の結果、ER 経路モデルの精度は参照化学物質と比較して 84% から 93% の一致を示した。

3.5. アッセイ数の違いによる性能変化について

ER 経路モデルについて、16 種類のうちの一部のみを用いた場合であっても同等の性能が発揮できるかを検討した。検討では ER アゴニスト活性の単純な相加モデルを開発し、完全な ER 経路モデルに対してキャリブレーションを行い、サブセットモデルでは、式を用いて化学物質固有の ER アゴニスト AUC 値の算出を行った。次に 16 種類のアッセイをすべて組み合わせた個別のサブセットモデル (計 65,535 個) を、性能指標としてバランス精度を用いて、フルモデルに対して評価した。分析の結果、16 種類のアッセイを用いた完全なモデルと同等の性能を発揮するアッセイのサブセットが多数存在することが判明し、最もアッセイ

数が少ないサブセットでのアッセイ数は 4 つであった。

3.6. ER 経路モデルの動向

ER 経路モデルは専門家による詳細なレビューを受けており、2015 年 6 月、米国 EPA は ER 経路モデルを生物活性のスクリーニングに用いることを認め、子宮肥大 (OCSPP 890.1600)、内分泌受容体結合 (OCSPP 890.1250)、および内分泌受容体転写活性化 (OCSPP 890.1300) の 3 つの Tier1 アッセイに代替できるようにした。本ケーススタディによる手法は一部の EDSP の Tier1 試験 (結合, ERTA, 子宮肥大) の代替として、米国 EPA によってすでに使用されており、エストロゲン関連内分泌活性に関する最近の ECHA/EFSA ガイドライン (ECHA and EFSA 2018) では、好ましいデータソースとされている。他の規制機関においても規制決定の際に HTS アッセイと計算モデルの使用を検討していることから、この ER 経路モデルは、これらの決定に情報を提供するための優先順位付けの代替手段として使用することができ、また、規制決定の状況で必要とされる場合には、特定の内分泌作用モード (ER アゴニスト) に関する情報を提供するために使用することができる。

3.7. 結論

本ケーススタディでは、物質による ER アゴニスト活性を通じた潜在的な内分泌かく乱作用を同定するための IATA を紹介している。このモデルを用いて、4～16 種類の *in vitro* HTS アッセイを用いて、IATA としての使用可能性を評価した。これらの ER HTS アッセイの結果は、ER アゴニスト活性をアッセイ固有の干渉や細胞毒性から識別できる計算モデルに統合された。本 IATA は、*in vitro* および *in vivo* の参照化学物質の ER アゴニスト活性を 84～93% の精度で予測することが実証された。この ER 経路モデルの性能評価の結果は、ER アゴニスト活性の化学物質のスクリーニングにおける本 IATA の精度、感度、特異性を示している。本 IATA の分析結果は、既存の OECD TG の代替として、エストロゲン活性に関連する規制決定に利用できる可能性を科学的に裏付けるものである。

4. おわりに

本調査では OECD 主導の Case Studies Project において実施された IATA に関するケーススタディについて検討した。現在までに 24 件のケーススタディが公表されており、そのうちの神経毒性及び内分泌かく乱の 2 つについて内容把握を行った。

アゾキシストロピンの神経毒性に関するケーススタディでは、類似した作用機序等を持つ他のストロピ

ルリン系化合物の情報を利用したリードアクロスを
用いて神経毒性能の評価が可能である。また、エスト
ロゲン受容体の ER アゴニスト活性に関するケースス
タディでは、ER 経路に係る *in vitro* アッセイを組み合
わせた IATA の利用により ER アゴニスト活性能の評
価が可能であるという内容が報告されていた。

今回のケーススタディでは、リードアクロスやアッ
セイを組み合わせた IATA を用いることで、現在は *in*
vivo 試験を要求している試験について、今後、動物を
用いずに評価できる可能性が示唆されている。

アッセイを組み合わせた IATA について、今回紹介
した例では ER アゴニスト活性に関する内容であった
が、他の毒性についてもそのメカニズムが判明してい
れば同様の手法によって IATA を構築し評価するこ
とは可能と考えられ、将来的には *in vivo* 要求試験につ
いても試験の代替・省略ができる可能性があると推測さ
れる。

選定した 2 件のケーススタディは、特定の神経毒性
及び内分泌かく乱に関わる重要事象 (KEs) を、代替
試験法を用いて検出することにより、既存の試験方法
を代替できる可能性が示すが、いずれもあらゆる神経
毒性や内分泌かく乱に適用できるというわけではな
い。しかしながら、今後、国際機関において、このよ
うな代替試験法の開発と IATA に関するケーススタ
ディを積み重ねることによって、将来の農薬の評価にお
いて、データ要求の抜本的な見直しを国内で議論する
際に重要な知見となると考えられる。例えば、毒性に
関わる構造が既知の既存化学物質があった場合に、同
じ構造を有する新規化合物については、動物試験の代
わりに代替試験法の結果と既存化学物質の毒性デー
タによるリードアクロスを受け入れる。あるいは有害
性発現経路 (AOP) の確立したエンドポイントにつ
いては代替試験法のみで評価を行うといった評価法導
入について議論する際に役立つ。また、これまで動物
試験の結果に基づき登録してきた既存化学物質につ
いても、必ずしも既存の動物試験ではヒトへの影響を
捉えきれていないのではないかという社会的関心を
集める科学文献等があった場合に、ヒトとの関連性を
よりの確に検出できる代替試験法の必要性が国際的
に認識されることが示唆される。その結果、国際的に
合意された代替試験法や IATA が開発され、それら
を活用することで既存化学物質に対する社会的関心・不
安に答えていく、あるいは評価を見直すといったこと
に、極めて有用であると考えられる。ハイスループ
ットスクリーニング (HTS) は、農薬の登録申請に必要
なデータとしての活用には向いていないが、新規化合
物の開発段階におけるスクリーニングや、登録後の科
学の進展に応じた新たなニーズに対して規制当局自
らがスクリーニングを行うといった場合に有用なツ

ールとなる可能性がある。

また、他の毒性に係る新たな IATA の構築方法とし
ては当該毒性経路に係る経路を把握し、その後当該経
路に関与するアッセイに関する情報を収集 (場合によ
っては新たに開発) し、得られたアッセイを基に構築
した IATA について実際に利用可能であるかを検証す
ることが必要である。

今後も本件に関する調査を続けることがさらなる
動物試験の代替に繋がると考えられる。

引用文献

1) Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>

2) CASE STUDY ON THE USE OF INTEGRATED
APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT FOR
MITOCHONDRIAL COMPLEX-III-MEDIATED
NEUROTOXICITY OF AZOXYSTROBIN - READ-
ACROSS TO OTHER STROBILURINS
[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2020\)23&docLanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2020)23&docLanguage=en)

3) CASE STUDY ON THE USE OF AN INTEGRATED
APPROACH TO TESTING AND ASSESSMENT FOR
ESTROGEN RECEPTOR ACTIVE CHEMICALS
[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2019\)28&docLanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2019)28&docLanguage=en)

(全 URL のリンクについての確認は、2023 年 8 月 8
日に実施)