

新たなリスク評価手法等の活用  
食品中の化学物質の毒性を予測するリードアクロスに関する研究

食品関連化学物質のリスク評価における  
リードアクロス手法の適用と信頼性評価に関する研究  
(JPCAFSC20232301)

主任 山田 隆志 (国立医薬品食品衛生研究所)



分担 小野 敦 (岡山大学)



吉成 浩一 (静岡県立大学)



安部 賀央里 (名古屋市立大学)



研究協力 赤堀 有美 (化学物質評価研究機構)



# リードアクロス (Read across) とは

毒性データが不足する評価対象物質を、類似物質とグループ化し、それらの既存の毒性データを参照して評価対象物質の毒性エンドポイントを推定する手法



評価対象物質：

データギャップを持つ評価対象の物質。  
ターゲット物質、標的物質ともいう。  
評価するため、何らかの方法でデータ  
ギャップを埋める必要がある。

類似物質：

評価対象物質と構造その他の面で類似  
性があると考えられる。参照物質の候  
補となる。リードアクロスにおいては、  
試験データがある類似物質である。

参照物質：

評価対象物質との類似性や関連データ  
の有無に基づき、データギャップの穴  
埋めに使用するのに適切な物質。ソー  
ス物質ともいう。

- アナログアプローチ： ごく少数の物質をもとにグループ化する。  
(例：評価対象物質 + 参照物質1-2種など)
- カテゴリーアプローチ： より広範な類似物質群を基にグループ化し、その特性に明らかな  
傾向がある場合に使用する。

# リードアクロスが求められる背景

- リスク評価の対象となる未評価の化学物質の数が増加
- 毒性に関する情報が限られている、あるいは全くない化学物質が数多く存在
  - 代謝物、分解物、不純物等
- 従来の毒性試験データを入手するためのリソース（時間、コスト）や実行可能性に制限がある場合の評価アプローチとして期待
- 国際動向：規制強化の動きと動物実験の削減
  - 例：欧州REACH規則：動物試験は最終手段（Last resort）  
→(Q)SAR/リードアクロス / Weight of Evidence (WoE) の使用を推奨
  - 例：欧州化粧品規則：化粧品原材料の動物試験禁止

このような状況を踏まえて、化学物質の規制に関わる国際機関や諸外国の規制当局は利用の促進を図っている。

# 国際的なリードアクロスの活用状況

■ 高生産量化学物質（HPV）のスクリーニングレベルでの有害性評価において、有効に活用されてきた。

➤ 米国EPA HPVチャレンジプログラム

➤ 国際化学工業協会 HPVケミカルイニシアティブ（OECDと共同）



遺伝毒性（Ames変異原性以外）/反復投与毒性等、1990年代から約30年の使用実績

多数のカテゴリーについて包括的な評価を実施

| Category  | Program | Number of Chemicals | Number of Robust Study Summaries |
|---|---------|---------------------|----------------------------------|
| Aliphatic acids   | OECD    | 78                  | 1125                             |
| Alkyl sulfates, alkane sulfonates and olefins           | OECD    | 61                  | >1300                            |
| Aluminum alkoxides                                      | US EPA  | 2                   | 1195                             |
| Amine oxides  | OECD    | 15                  | 180                              |
| Fatty acid methyl esters                                | US EPA  | 30                  | >500                             |
| Glycerides  | OECD    | 28                  | 748                              |
| Hydrotropes   | OECD    | 8                   | 125                              |
| Linear and branched alkylbenzene sulfonates (LAS/ABS)   | US EPA  | 9                   | 192                              |
| Long chain alcohols (C6-C22 primary aliphatic alcohols) | OECD    | 30                  | ~1400                            |

コストと実験動物の使用の削減を達成

| Endpoint   | OECD Guideline | Tests Avoided | Cost per test (USD) | Cost Total Saved (USD)       | Animals: number per test | Animals: number replaced |
|--|----------------|---------------|---------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Acute oral toxicity (rodent)                               | 423            | 174           | 2,292               | 398,866                      | 12                       | 2,088                    |
| Repeated dose 28-day oral toxicity (rat)                   | 407            | 248           | 76,810              | 19,048,949                   | 40                       | 9,920                    |
| Prenatal developmental toxicity (rat)                      |                | 230           | 84,912              | 19,529,460                   | 560                      | 128,800                  |
| Two-generation reproductive toxicity (rat)                 | 421, 422       | 259           | 143,076             | 32,907,582                   | 412                      | 94,760                   |
| Mouse Erythrocyte micronucleus assay (mouse)               | 474            | 13            | 17,524              | 227,809                      | 100                      | 1,300                    |
| Acute aquatic toxicity (various fish species)              | 203            | 177           | 6,521               | 1,154,193                    | 42                       | 7,434                    |
| <b>Total benefits of reduced vertebrate animal testing</b> |                |               |                     | <b>40,359,277-53,737,399</b> |                          | <b>115,502-149,542</b>   |

# リードアクロスの課題

- 類似物質の探索（特に複雑なエンドポイントにおいて）
  - 構造の類似性のみでは不十分
  - 動態、代謝、生物学的作用（メカニズム）等も重要
- 類似性の評価
  - 科学的妥当性と信頼性の評価は、専門家判断への依存度が高い

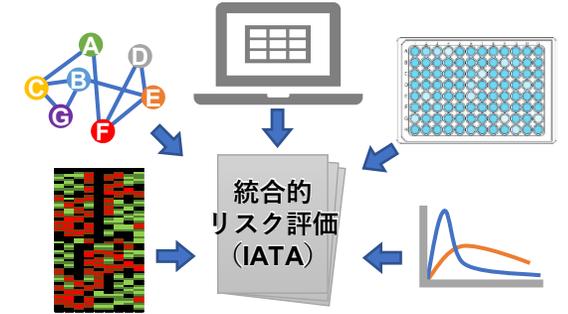
さらに行政受入れに向けて・・・

- リードアクロスの正当性の説明（どのような内容をどの程度説明するか等）
- 不確実性の評価
  - 類似物質の妥当性評価
  - 参照物質のデータの質 等
- 多くの場合、複雑かつケースバイケースの評価が必要 → 評価方法の標準化

# リードアクロスの信頼性向上のためのNAMsの導入検討

**New Approach Methodologies (NAMs)とは：**

*In silico*、*in vitro*など非動物ベースのアプローチ  
動態や代謝、メカニズムに関連した生体内のキーイベントの評価  
などを包括。NAM (New Approach Method)とも。



海外リスク評価機関や規制当局は、新しい動物試験要求を最小限に抑え、NAMs活用を促進するロードマップを近年相次いで公表している。これらの戦略に基づき、研究開発が一層促進されると予想される。

現段階ではすべてのケースに適切な単一のアプローチはなく、ケース毎に専門家による適格性の確認が必要である。 活用事例を増やしながらか、NAMsがいかにリードアクロスの信頼性や説明性を向上させることができるかを検証していくことが求められている。

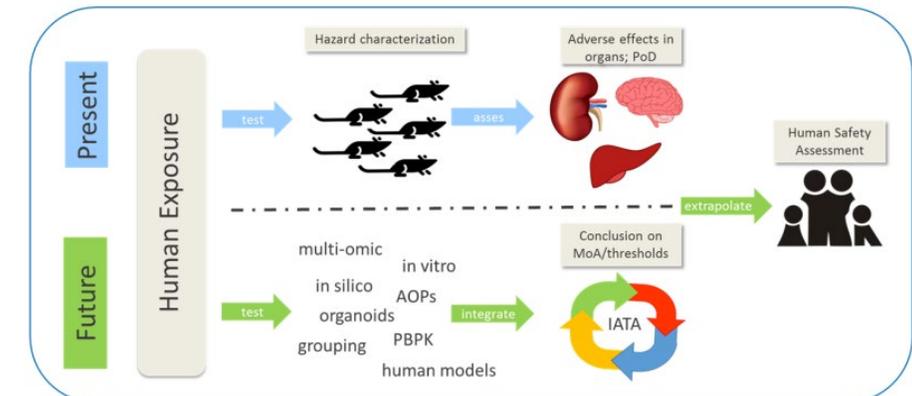
APPROVED: 2 May 2022  
doi:10.2903/sp.efsa.2022.EN-7341



**Development of a Roadmap for Action on  
New Approach Methodologies in Risk Assessment**

Sylvia E. Escher<sup>1</sup>, Falko Partosch<sup>1</sup>, Sebastian Konzok<sup>1</sup>, Paul Jennings<sup>2</sup>, Mirjam Luijten<sup>3</sup>, Anne Kienhuis<sup>3</sup>, Victoria de Leeuw<sup>3</sup>, Rosmarie Reuss<sup>4</sup>, Katrina-Magdalena Lindemann<sup>4</sup>, Susanne Hougaard Bennekou<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Fraunhofer ITEM, <sup>2</sup> Vrije Universiteit Amsterdam, <sup>3</sup> National Institute for Public Health and the Environment, <sup>4</sup> Eura AG, <sup>5</sup> The National Food Institute Denmark



EFSA (2022), Development of a Roadmap for Action on New Approach Methodologies in Risk Assessmentより

# 本研究の目的と研究体制

## 研究目的：

リードアクロスの既存のガイダンスと最新の活用状況を整理し、本邦におけるガイダンスの作成の基本となる情報を取りまとめて、食品健康影響評価に活用する際の考え方を提案する。

## 研究体制：

- |   |  |             |
|---|--|-------------|
| 1 | ガイダンスの調査・分析に基づくリードアクロスの手順と不確実性の評価方法の状況整理           | 山田          |
| 2 | リスク評価機関におけるリードアクロスの活用状況の把握および食品健康影響評価における適用可能範囲の提案 | 山田、小野       |
| 3 | NAMs の開発状況の調査とNAMs を活用した類似物質の同定の信頼性向上に関する研究        | 小野、吉成、安部、山田 |
| 4 | 食品健康影響評価にリードアクロスを活用する際の考え方の提案                      | 山田、小野、吉成、安部 |

# プロジェクトの進め方



研究項目1. ガイダンスの調査・分析に基づくリードアクロスの手順と不確実性の評価方法の状況整理

リードアクロスの手順の整理  
不確実性の評価方法の整理

研究項目2. リスク評価機関におけるリードアクロスの活用状況の把握および食品健康影響評価における適用可能範囲の提案

リスク評価機関におけるリードアクロスの活用状況の把握  
食品健康影響評価における適用可能範囲の提案

研究項目3. NAMsの開発状況の調査とNAMsを活用した類似物質の同定の信頼性向上に関する研究

NAMの開発状況の調査  
トキシコキネティクス (TK) 関連パラメータを組み合わせたリードアクロスの信頼性評価手法の検討  
リードアクロスに有用なトキシコダイナミクス (TD) 関連試験の同定

研究項目4. 食品健康影響評価にリードアクロスを活用する際の考え方の提案

リードアクロス  
手順と結果の評  
価手法の整理

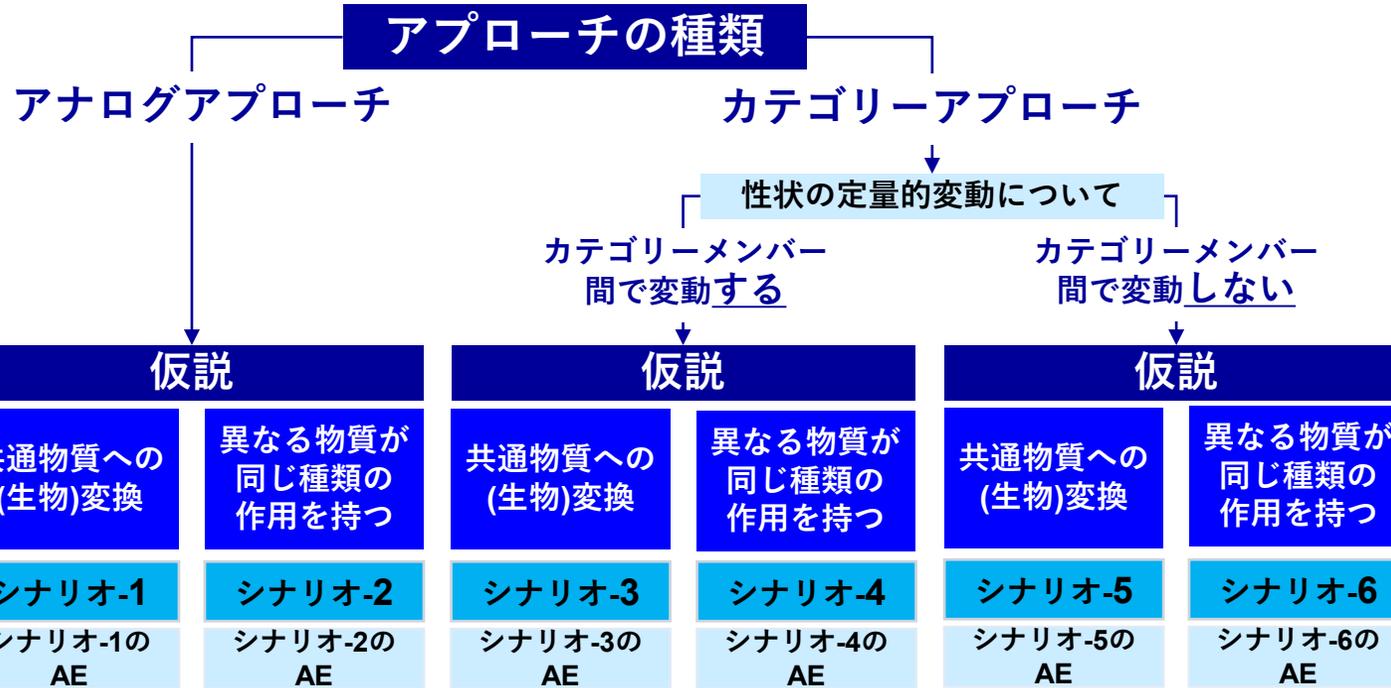
NAMsを用いた  
リードアクロスの  
実施方法の検討

# 近年の国際動向-1

## Read-across Assessment Framework (RAAF) (ECHA, 2017)

ECHA  
Read-Across Assessment Framework (RAAF)

- リードアクロスは、欧州REACH規則の事業者による「登録」において最も使用される代替法
- 欧州化学品庁 (ECHA) が「登録」文書中のリードアクロスを一貫して評価できるよう、RAAFが作成された
- 以下の6種のシナリオ毎に複数のAssessment Element (AE) を定め、その内容を5段階で評価



**✓ AEの評価段階**

- 5：非常に高い信頼性で受入れ可能
- 4：中程度の信頼性で受入れ可能
- 3：十分な信頼性で受入れ可能
- 2：現在の形式では受入れ不可能
- 1：受入れ不可能

**シナリオ-1のAEの例：**

AE1.1：共通の物質がどのように生成されるか？

AE1.2：生成物が同じ標的に、同じ影響を生じるか？

AE1.3：共通の物質の標的へのばく露が類似か？

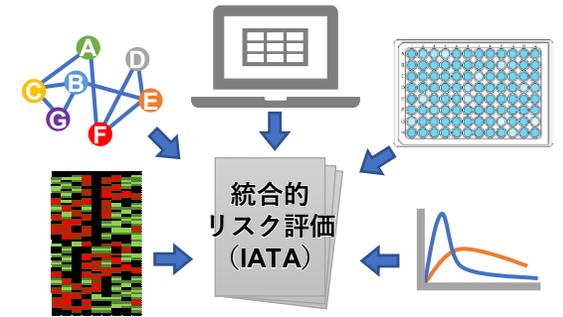
AE1.4：親物質や不純物による全身影響が考慮され、予測エンドポイントに影響ないか？

AE1.5：類似しない物質が生成する場合、その影響が考慮されているか？

# 近年の国際動向-2

## OECD IATA Case Studies Project (Integrated Approaches to Testing and Assessment, 試験と評価のための統合的アプローチ) (since 2015)

- IATAとは、*In silico, in chemico, in vitro*, 既存の*in vivo*データ等様々なタイプの情報を組み合わせて統合的に評価する評価手法
- IATAによる複数の情報を組合わせた評価に関する、各国のケーススタディを共有
- ケーススタディには、複数のリードアクロスのケーススタディがあり、NAMsを用いたものもある
- 各ケーススタディはメンバー国の専門家がレビューを実施



### <ケーススタディの一例>

|                    | ケーススタディ数 | 不確実性の報告あり | NAMs使用あり | Low/No Tox.の評価 |
|--------------------|----------|-----------|----------|----------------|
| Repeated Dose Tox  | 9        | 9         | 7        | 4              |
| Reproductive Tox   | 1        | 1         | 0        | 0              |
| Developmental Tox. | 1        | 1         | 1        | 1              |
| Neurotoxicity      | 3        | 2         | 3        | 1              |
| Genotoxicity       | 1        | 1         | 1        | 0              |
| Mutagenicity       | 1        | 1         | 0        | 0              |



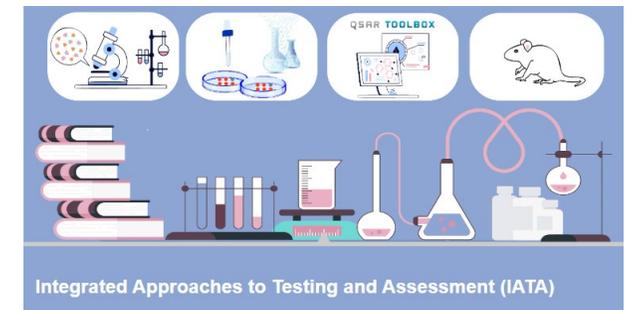
定量的な有害性評価値の導出を実施したケーススタディもある

# 近年の国際動向-2（続き）

## OECD IATA Case Studies Project (since 2015)

- リードアクロスにおけるNAMsの役割（NAMsを用いたリードアクロス事例より）
  - リードアクロスの仮説強化/構造以外の類似性根拠の強化
    - ✓ トキシコキネティクスや代謝情報の提供（例：*in silico*や*in vitro*代謝データ）
    - ✓ Mode of Action (MoA)/Adverse Outcome Pathway (AOP)メカニズム情報の提供（例：MoA/AOPのイベントに対応する*in vitro*データ等）
    - ✓ 生物学的応答の類似性情報提供（例：トランスクリプトームデータ）
  - 定量的予測の精緻化
    - ✓ 例：Physiologically Based Kinetic model(PBK)モデルを用いた参照物質と評価対象物質の体内動態の比較・補正

→ 不確実性の低減に寄与する



Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)

<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata/>

# 近年の国際動向-3

## OECD

### “Guidance on grouping of chemicals”

- リードアクロスの原則と方法を提供
- 2014年に公開された第2版がある
- 改定された第3版公開（2025年11月）
  - 情報の充足
    - ✓ OECD IATA Case Studies Projectからの教訓
    - ✓ その他の欧州REACH規則におけるリードアクロスの利用経験や欧米等でのプロジェクト事例に基づく補強
  - 生物学的類似性の提供等におけるNAMsの有用性に関する内容
  - リードアクロスの実施手順に「問題の定式化」、「データギャップ分析」及び「不確実性評価」の追加
  - 報告様式の改定 等

## EFSA “Guidance on the use of read across for chemical safety assessment in food and feeds”

- EFSA（欧州食品安全機関）が管轄する分野のリスク評価におけるリードアクロスを一貫性をもって適用するための、新規ガイダンスを作成
- パブコメを経て、2025年7月に承認および公開
  - EFSAにおける様々な評価目的に適用可能な、柔軟かつ科学的根拠を提供する標準化されたワークフローとガイダンスを提示
    - ✓ リードアクロス手順に含めるべき標準的要素の明示
  - NAMsの活用に関する言及あり
  - 手順に「問題の定式化」、「データギャップ分析」及び「不確実性評価」を含む
  - 不確実性評価の報告様式あり

# EFSA リードアクトロスガイダンス-1

Adopted: 2 July 2025

DOI: 10.2903/j.efsa.2025.9586

SCIENTIFIC OPINION



## Guidance on the use of read-across for chemical safety assessment in food and feed

EFSA Scientific Committee | Susanne Hougaard Bennekou | Ana Allende | Angela Bearth | Josep Casacuberta | Laurence Castle | Tamara Coja | Amélie Crépet | Thorhallur Halldorsson | Laurentius (Ron) Hoogenboom | Pikka Jokelainen | Helle Knutsen | Konstantinos Koutsoumanis (until 25 February 2025)<sup>†</sup> | Claude Lambré | Søren Nielsen | Dominique Turck | Antonio Vicent Civera | Roberto Edoardo Villa | Holger Zorn | Emilio Benfenati | Romualdo Benigni | Qasim Chaudhry | Lucian Farcal | George Kass | Alexis Nathanail | Alicia Paini | Rositsa Serafimova

Correspondence: mese@efsa.europa.eu

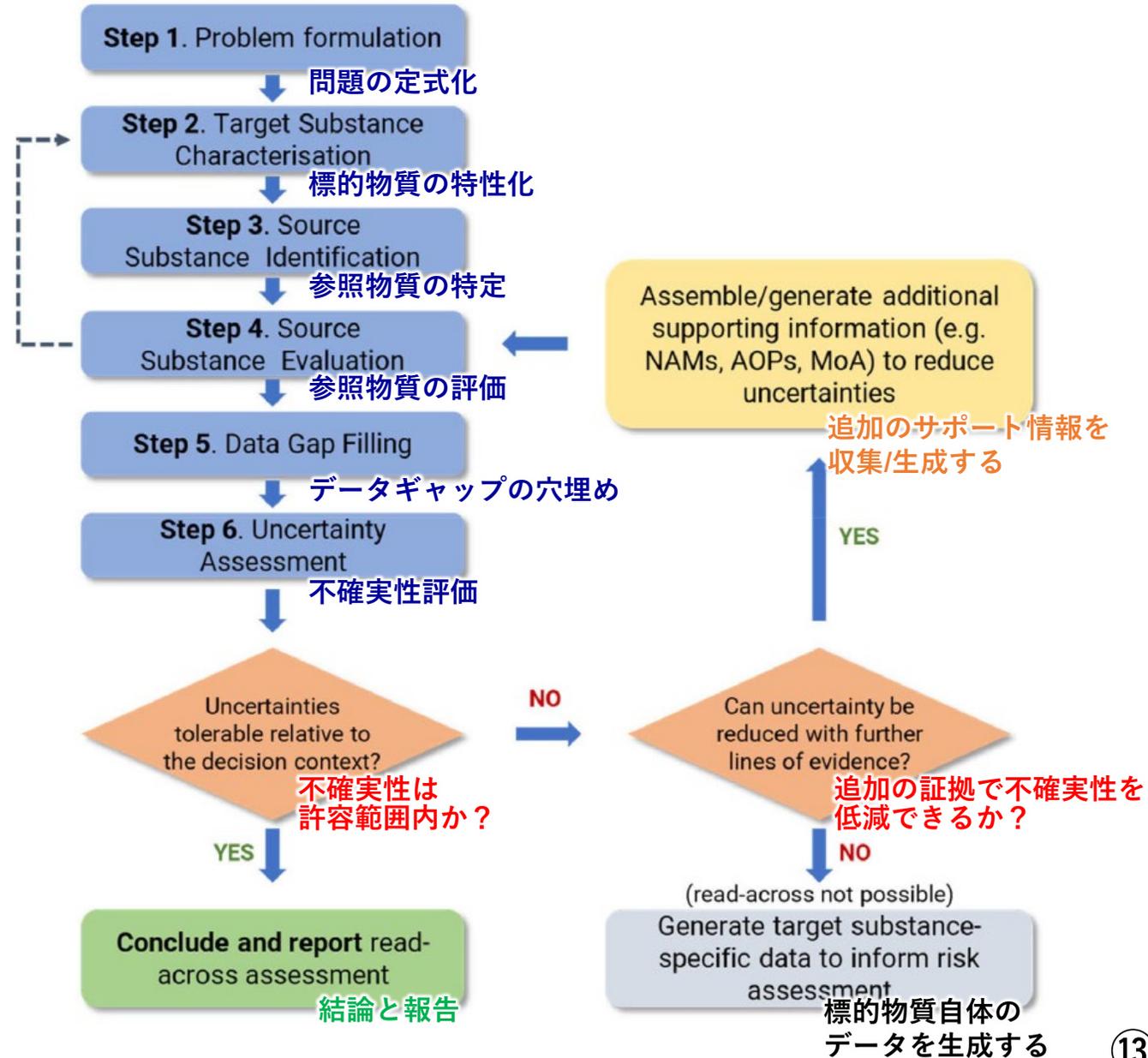
The declarations of interest of all scientific experts active in EFSA's work are available at <https://open.efsa.europa.eu/experts>

### Abstract

Read-across is a method used in chemical risk assessment to predict the toxicological properties of a target substance by using data from structurally and mechanistically similar substances, known as source substances. EFSA's Scientific Committee has developed an approach for using read-across in food and feed risk assessment. This method provides a step-by-step guide to applying read-across as part of a weight-of-evidence evaluation for individual substances. It includes an explanation of the key aspects to consider at each step of the read-across workflow, i.e. problem formulation, target substance characterisation, source substance identification, source substance evaluation, data gap filling, uncertainty assessment, conclusion and reporting. It highlights the importance of clarity, impartiality and quality to derive transparent and reliable read-across conclusions. A particular emphasis is placed on the analysis of uncertainty and whether the overall uncertainty can be lowered to tolerable levels by using standardised approaches, and/or additional data from new approach methodologies (NAMs). The guidance outlines methods to integrate data from NAMs to support read-across in the relevant steps, improving the robustness of the assessment. The ultimate goal is to equip risk assessors and applicants with a comprehensive framework to carry out read-across assessments systematically and transparently, thereby supporting the safety evaluation of chemicals in the food and feed chain.

### KEYWORDS

data gaps, Food and feed safety, new approach methodologies (NAMs), read-across, risk assessment, target and source substances, uncertainty



- Step 1. 問題の定式化                      評価の目的及び受け入れ可能な不確実性を明確にする
- Step 2: 標的物質の特性化              リードアクロスの初期的な仮説を設定する
- Step 3: 参照物質の特定
- Step 4: 参照物質の評価                リードアクロスの仮説を最終化する
- Step 5: データギャップの穴埋め
- Step 6: 不確実性評価

- リーダクロスはリソースを要する可能性のある方法論と説明されており、目的によってはTTC(毒性学的懸念の閾値)アプローチや(Q)SAR利用が適していることもあるとされる。
  - この点はリーダクロスを利用する前提として非常に重要であり、我が国ではどのような場合においてリーダクロスの実施を選択するかを明確にする必要がある。
- 実施手順に含めるべき要素を明らかにし手順を標準化することを強調している。
  - 手順の標準化は、不確実性を削減できるだけでなく、評価において着目すべき点を明らかにできる意味でも我が国におけるリーダクロスの手順を検討する上で有用な考え方と言える。
- リードアクロスの信頼性を向上させるためのNAMsデータの活用に関する記載が多くなされている。
  - リードクロスにおけるNAMs活用の必要性は、評価目的や受け入れ可能な不確実性に依存する。実際の評価においてNAMsデータが求められる事例について把握していく必要がある。

# リードアクロスの全体的な留意点

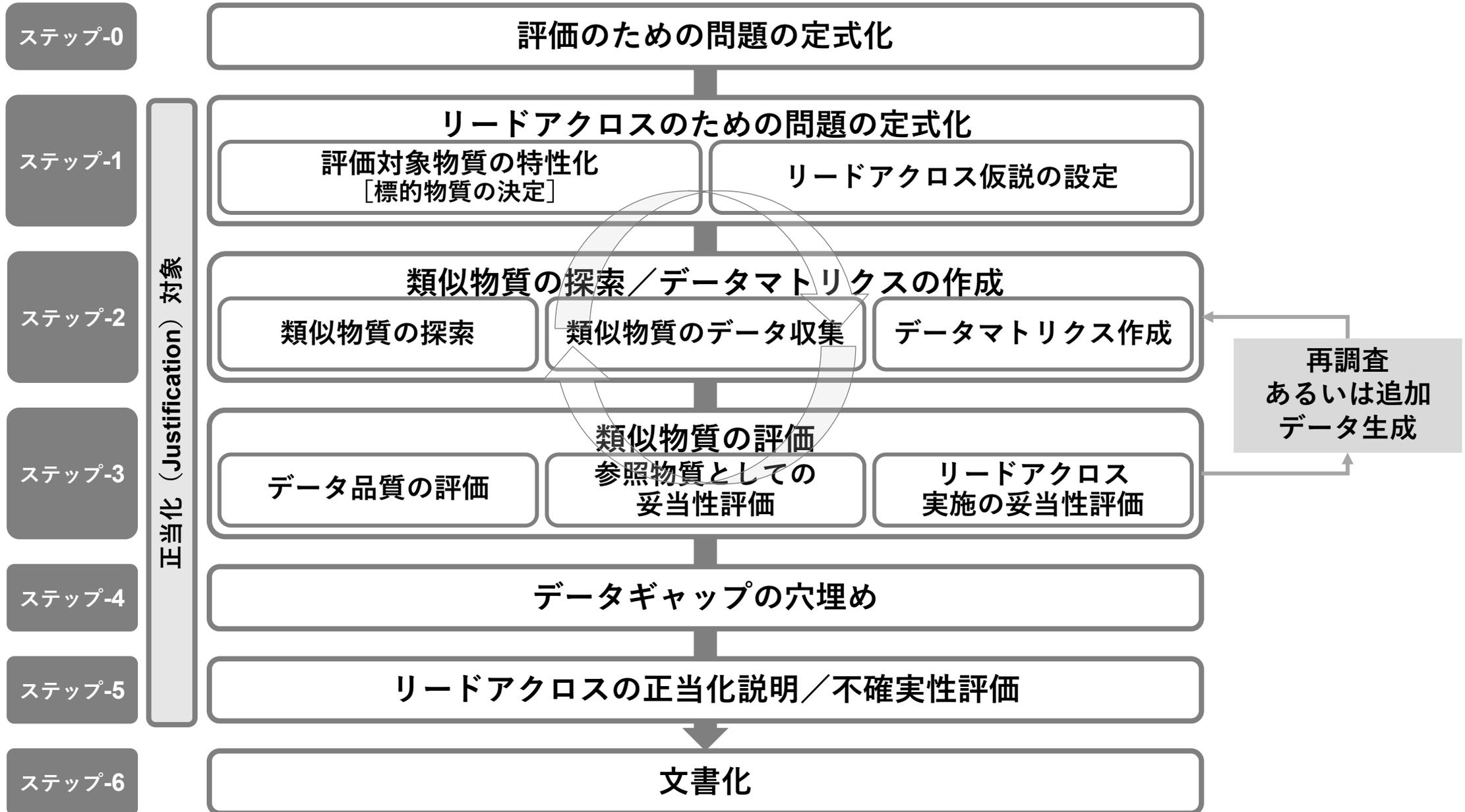
## < 実務的側面 >

- リードアクロスの実施あるいはその結果の評価は、従来の実験データに基づく評価以上の工程・専門性（化学構造、*in silico*、NAMs結果を扱う場合、当該NAMsに関する専門性等）を含むため、**従来評価以上の労力・専門性を要する場合が多い。**
- リードアクロスを選択する以前に、リードアクロス以外の手法（(Q)SAR、TTCアプローチ等）の適用可否を確認し、リードアクロスの必要性を判断する。

## < 技術的側面 >

- リードアクロスの実施手順は、状況に応じて開始ステップが異なる可能性があるため、**柔軟性を持たせる必要がある。**
- 一方、得られる結果の不確実性を低減させるために、各手順に含めるべき**標準的要素の順守**が必要である。
- リードアクロスを実施するための**類似物質の特定方法**についての画一的な方法はないため、類似性を判断する客観的情報と専門家判断を併用することでその**正当性を説明する必要がある。**
- 有害性がないことを示す場合、一般的に有害性がある場合に比べより多くの証拠が必要になる。
- 生物学的類似性の説明にNAMsを使用することは有用である。一方、NAMsのデータがなくとも、不確実性が受け入れられるのであれば、そのリードアクロスの結論は受け入れられる。

# リードアクロスの手順



# リードアクロスの手順における留意点-1

ステップ-0

評価のための問題の定式化

ステップ-1

リードアクロスのための問題の定式化

評価対象物質の特性化  
[標的物質の決定]

リードアクロス仮説の設定

ステップ-2

類似物質の探索／データマトリクスの作成

類似物質の探索

類似物質のデータ収集

データマトリクス作成

ステップ-3

類似物質の評価

データ品質の評価

参照物質としての妥当性評価

リードアクロス実施の妥当性評価

ステップ-4

データギャップの穴埋め

ステップ-5

リードアクロスの正当化説明／不確実性評価

ステップ-6

文書化

正当化 (Justification) 対象

以下を明確化する

[1]リードアクロスにより予測した結果の活用場面

[2] 類推するエンドポイント及びリードアクロスする情報品質レベル

[3] 受入れ可能な不確実性またはばく露マージン (MoE : Margin of Exposure)

[4]リードアクロス評価の検討継続を不可とする考え方

再調査  
あるいは追加  
データ生成

■評価対象物質の情報収集  
→評価対象物質のアイデンティティ（評価に影響を与える不純物、構造特性等）の明確化  
→標的物質の決定／データギャップ分析

■リードアクロス仮説の設定\*  
評価対象物質の特徴等に基づき、何に着目して類似性を定義するか等を説明(ステップ-3までに最終化)

\*リードアクロス仮説：  
なぜ参照物質の情報に基づき標的物質のデータギャップの穴埋めができるのかの根拠を示すもの

# リードアクロスの手順における留意点-2

ステップ-2

## 類似物質の探索／データマトリクスの作成

類似物質の探索 ※ 類似物質 = 参照物質の候補

類似物質のデータ収集

データマトリクス作成

- リードアクロスの仮説に基づき類似物質の特定方針を設定
- ステップ-2⇔ステップ-3は、繰り返しが必要になる可能性があり、特定方針を見直す場合がある。

### <留意点>

- 少なくとも**2つ以上のデータベース**を用いる。
- **複数の類似性の観点**に基づき、類似物質を特定する。
- 類似物質の選択に際して、標的物質にない毒性を減弱させる構造を有する物質は基本的に選択しない。
- 探索段階では、構造が類似しているが**毒性プロファイルが異なる物質も収集**

→ 2つの物質群の比較・分析により、毒性発現に寄与する構造的特徴や作用機序を特定し、予測の精度と信頼性を向上させられる可能性があるため

### 類似物質のデータ収集

- 情報収集をする際は、**一貫した方法に基づき実施**することが重要。
- 実験データがない場合、(Q)SARの結果も参考となる。

### データマトリクスの作成

- 収集した情報はデータマトリクスに整理する。
- 毒性に関する情報については、試験の信頼性を評価できる情報（Klimischコード等）を加える。

→ データギャップの穴埋めを行うエンドポイントの入手性に応じてステップ-3「類似物質の評価」に供する物質を決定する。

必要な記録

類似物質の特定方針 | 検索したデータベース・ツールの名称等（Version含む） | 検索時のヒット物質及び数 |  
探索時に使用した入力情報（検索時のオプション設定含む） | 類似物質の包含/除外基準及びその根拠

# リードアクロスの手順における留意点-3

ステップ-2

ステップ-3

再調査  
あるいは追加データ生成

## 類似物質の評価

データ品質の評価

参照物質としての  
妥当性評価リードアクロス  
実施の妥当性評価

- 一貫した方法で信頼性を評価する。
- ステップ-0で設定した情報品質に合致する物質のみが参照物質となり得る。
- 品質が満たない場合でも、「サポート物質」として正当性の説明に利用可能。
- **NAMs等の非標準化試験の場合、評価目的やそのデータが評価全体に与える影響に応じてデータ品質を評価する。**
  - (Q)SAR: OECD QAF (2024)
  - *In vitro*試験：
    - ✓ OECD GIVIMP (2018),
    - ✓ ICCVAM, Validation, Qualification, and Regulatory Acceptance of New Approach Methodologies (2024)

- **アナログアプローチの場合には、標的物質との共通性・一貫性を確認する。**
- **カテゴリーアプローチの場合には、標的物質を含めたカテゴリーメンバー内の共通性・(傾向の)一貫性を確認する。**
  - 上記では、**リードアクロスの仮説**で設定した、類似性評価に利用する項目で**具体的な証拠を確認する。**
  - 類似性だけでなく、**相違が評価対象とするエンドポイントにおける有害性の種類(例：標的臓器の違い)や強さの違いを生じる可能性があるかも評価する。**

- **問題の定式化の内容に鑑み、リードアクロスを実施することの妥当性について検討する。**
- 妥当性ではないと判断する場合の選択肢(例);
  - **他の類似物質**を探す(ステップ-2に戻る)。
  - カテゴリーアプローチの場合、**サブカテゴリー化**を検討する。
  - 作用の強さの傾向を確認する必要がある等のデータギャップが特定された場合、そのデータの入手可能性(試験によるデータ生成を含む)について検討する。
  - 評価の中止を判断する。

ステップ3の評価の結果として、追加データが必要と判断された場合、可能であればNAMs等による追加データを取得する。

# リードアクロスの手順における留意点-4

ステップ-0

評価のための問題の定式化

ステップ-1

リードアクロスのための問題の定式化

評価対象物質の特性化  
[標的物質の決定]

リードアクロス仮説の設定

ステップ-2

類似物質の探索 / データマトリクスの作成

類似物質の探索

類似物質のデータ収集

データマトリクス作成

ステップ-3

類似物質の評価

データ品質の評価

参照物質としての妥当性評価

リードアクロス実施の妥当性評価

ステップ-4

データギャップの穴埋め

ステップ-5

リードアクロスの正当化説明 / 不確実性評価

ステップ-6

文書化

正当化 (Justification) 対象

**データギャップの穴埋め**

- 問題の定式化及びデータマトリクス内容に基づき、適切な穴埋め戦略を決定する。
  - ワorstケース（類似物質が示す最も強い毒性値を用いる）
  - 類似性に基づく最近傍値
  - 傾向分析に基づく予測値 等

**リードアクロスの正当化説明**

- リードアクロスの各ステップにおける正当性を証拠を示して説明する。

**不確実性評価**

- 各ステップの不確実性の要因及び結果への影響の大きさを明らかにし、半定量的に評価する。
- 最終的に全体の不確実性を評価し、受入れ可否を評価する。
- 不確実性が受容できない場合、その原因を特定し、その低減対策を検討する。

- 実施したリードアクロスを再現できるレベルが望ましい。

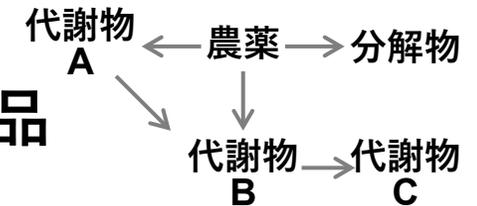
再調査  
あるいは追加  
データ生成

# 食品健康影響評価における適用可能範囲の提案

- リードアクロスが適用可能もしくは必要な分野について整理した。

- ✓ 農薬代謝物・分解物の毒性評価

1つの農薬に10以上の代謝物がある場合があるが、代謝物の標品入手は困難。互いに類似している。



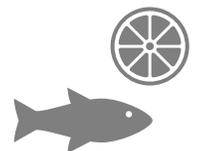
- ✓ 器具・容器包装物質のポジティブリスト化に伴う既存化学物質の毒性評価

市場に流通済みの約2,000物質について、溶出量が多い場合は反復投与毒性の評価が必要となる。



- ✓ 毒性情報の限られている食品汚染物質の毒性評価

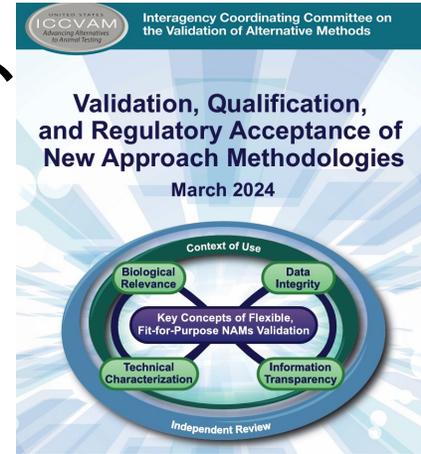
データ取得の責任を負う特定の事業者は存在せず、食品安全委員会で独自に既存データを収集してリスク評価を行う必要がある。



など

# NAMsの信頼性を評価するためのフレームワーク

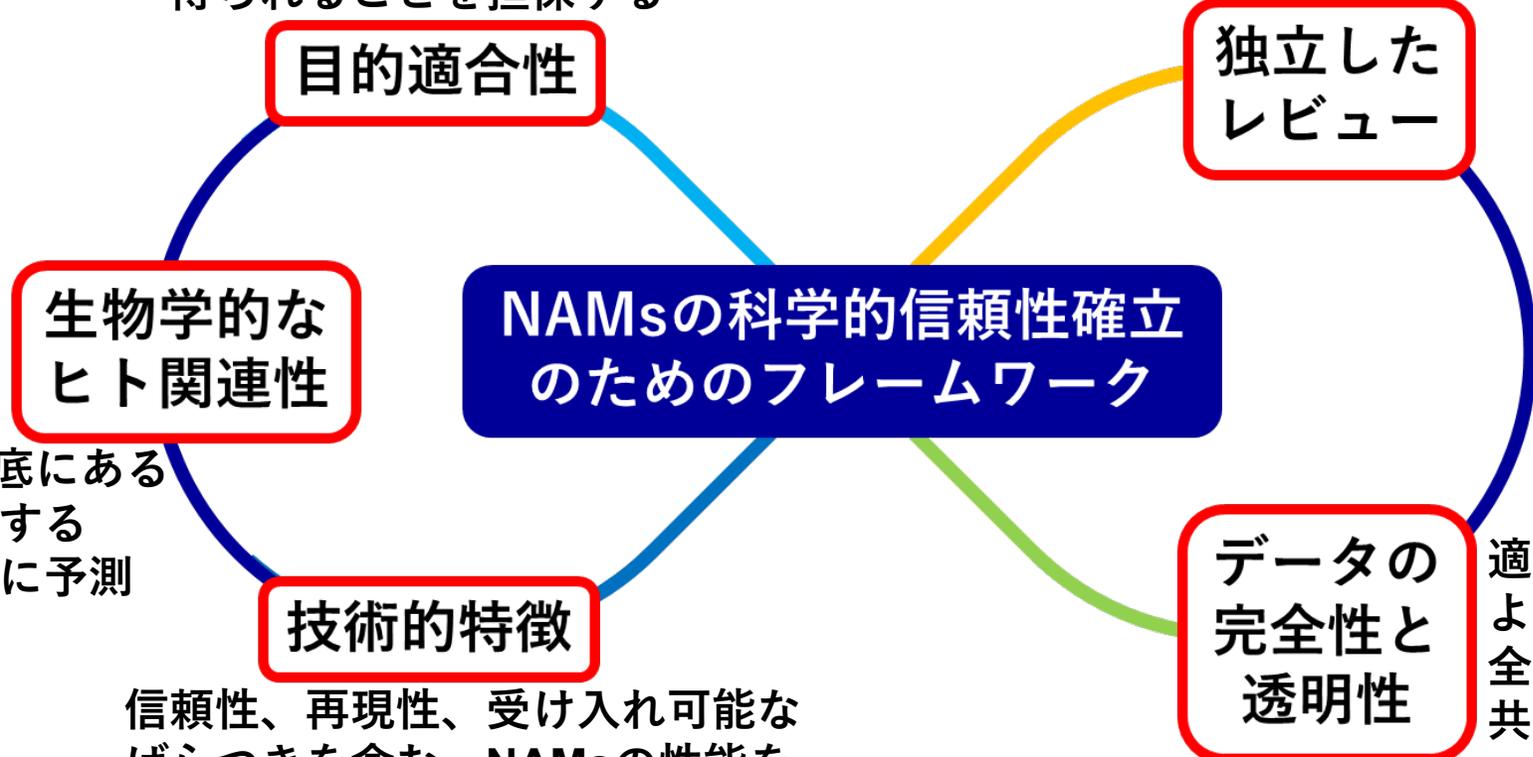
■ NAMsの信頼性の構築には、主要な要素によるフレームワークの確立、同じ経路に対する複数のNAMsの比較、WoEによる裏付けといった、体系的でエビデンスベースの手法が必要である。



ICCVAM report (2024)

NAMsが特定の行政上の問いに適切な回答を得られることを担保する

専門家と行政が独立にNAMsを科学的に吟味することにより、信頼を構築する



生物学的なヒト関連性

NAMsの結果が、根底にある生物学を通じ、関連するヒト健康影響を正確に予測することを確認する

技術的特徴

信頼性、再現性、受け入れ可能なばらつきを含む、NAMsの性能を、厳密に規定する

独立したレビュー

データの完全性と透明性

適切なキュレーションにより高データ品質を徹底し、全データと手法を公開・共有する

## *In silico* model of Caco-2 permeability



1,458 chemicals

Caco-2膜透過性（腸管吸収性）試験データ:

- Ning-Ning Wang et.al., J. Chem. Inf. Model. 2016, 56, 4, 763-773
- Hai Pham The et.al., Mol. Inf. 2011, 30, 376-385

[データの透明性]

Training : Test = 8 : 2

ML modeling



精度の良い *in silico* Caco-2透過性予測モデルを構築した。

- Munroデータセット（ラット慢性毒性換算NOEL）を用いて、構築したモデルによるCaco2膜透過性 *in silico* 予測値（ $-\log P_{app}$ ）とラット反復投与NOEL (NOAEL)との関係を解析したところ、**透過性が低いほど無毒性量の値は大きい傾向が見られた。**
- **透過性予測の結果が、*in vivo*毒性影響と関連付けられることを確認**

[生物学的関連性]

# TD関連NAMsの構築：in silico AChE活性阻害予測モデルの構築

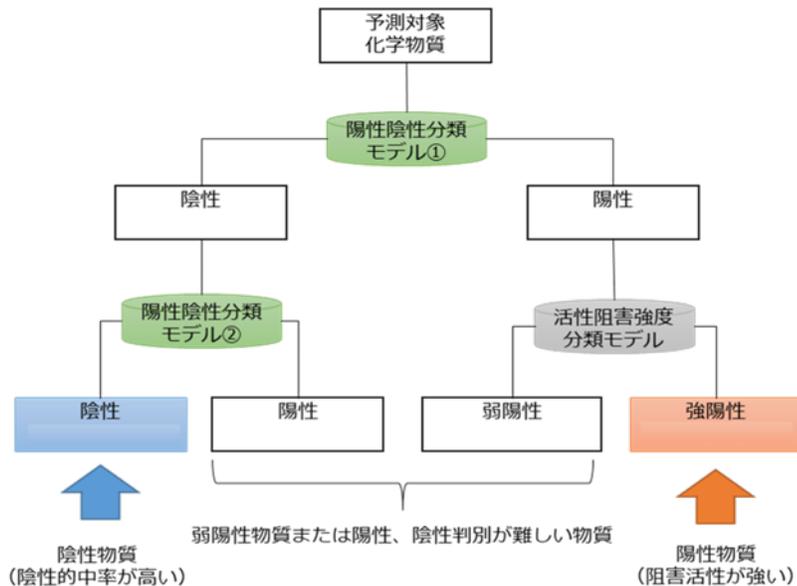
化学構造情報からアセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性阻害強度を予測する  
半定量的モデルを構築

学習データ：米国の毒性プロジェクト Tox21のAChE活性阻害に関するアッセイデータ [データの透明性]  
ヒトの細胞ベースのアッセイデータ (AID1347395)、酵素ベースのアッセイデータ (AID1347397)、ミクロソーム添加のアッセイデータ (AID1347399) を統合して使用

AChE活性阻害の定義：Tox21のPUBCHEM ACTIVITY SCOREの最大値を使用 [生物学的関連性]  
強阻害、弱阻害、陰性の3つに分類

予測モデル構築：機械学習アルゴリズム lightGBM、4x3 入れ子式交差検証にて評価  
分子記述子計算ソフト alvaDescを用いた分子記述子を使用

AChE活性阻害強度を予測する半定量的モデルのフローチャート



## 陽性陰性分類モデル①

- ・ バランスの取れた予測 (F1 score; 感度と陽性的中率の調和平均) を重視

## 陽性陰性分類モデル②

- ・ 陰性的中率を重視

## 活性阻害強度分類モデル

- ・ 陽性的中率を重視

偽陰性をできるだけ回避し、陽性物質の強度分類を達成

[評価の目的適合性に応じた予測系]

## *In vitro*試験によるAChE活性阻害

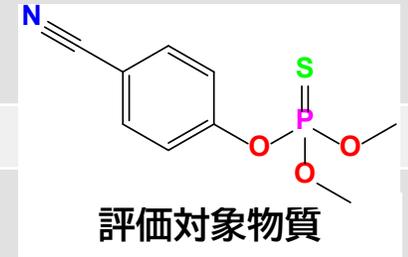
- 酵素源：組換えヒトAChE (Sigma-Aldrich)
  - Acetylthiocholineを基質とし、生じたthiocholineを定量
  - 代謝活性化系として、ラット肝ミクロソームとNADPH生成系を添加
  - ポジティブコントロール、ネガティブコントロール試験を実施
  - ✓ 被験物質：有機リン系農薬 27種、カルバメート系農薬 20農薬
  - ✓ 有機リンにはオキソン型とチオノ型があり、チオノ型が生体内でオキソン型に代謝されることで、毒性を発揮することが知られる。
- *In vitro*のアッセイ結果と、*in vivo*のコリンエステラーゼ活性阻害に一定の相関が見られた。
- 有機リン系農薬では、試験系に肝ミクロソームを添加することで、チオノ型の阻害活性が認められるようになり、*in vitro* - *in vivo*試験間の一致率が向上した。

[生物学的な関連性を高めるために、*in vitro*試験に代謝活性化系を組み込むことの重要性]

# ケーススタディ：NAMsを用いたリードアクロス-1

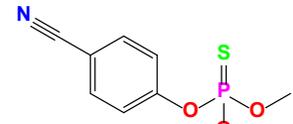
- AChE活性と神経毒性の関連に着目し、本プロジェクトで構築したCaco-2透過性予測モデル、AChE活性予測モデル、AChE活性評価アッセイを用いて、神経毒性を示す物質を多く含む有機リンを対象とするケーススタディを実施した。

|        | 項目         | 内容   |
|--------|------------|--|
| ステップ-0 | 問題の定式化     | <ul style="list-style-type: none"><li>● 評価対象物質のラットへの90日間反復投与でAChE活性阻害による神経毒性が生じる可能性があるか？</li><li>● AChE活性阻害を生じる場合、そのNOAEL値はどの程度になるかを評価する。</li></ul>  |
|        | 調査範囲       | <ul style="list-style-type: none"><li>● 食品安全委員会の評価書がある農薬を対象とする（ケーススタディのため）</li></ul>   |
|        | 受入れ可能な不確実性 | <ul style="list-style-type: none"><li>● 不確実性に関する個別の評価項目は低、中、高の3段階で評価し、「高」は受入れ不可</li></ul>  |
| ステップ-1 | リードアクロスの仮説 | <ul style="list-style-type: none"><li>● <u>有機リン化合物とAChEが共有結合体を形成し、活性阻害</u></li><li>● 一般にチオノ型（P=S体）よりオキソン型（P=O体）においてAChE活性阻害が強くなる</li><li>● 評価対象物質（シアノホス）はP=O体を生成するが30分以内に速やかに代謝され、AChE活性が減弱したと考えられる別の代謝物に代謝</li></ul> <p>→ 評価対象物質を安全サイドで評価するために類似物質の選定要件を整理</p> <ol style="list-style-type: none"><li>① 評価対象物質と同様Phosphorothioateの構造を有し、リン原子の反応性が評価対象物質と類似 or 強い</li><li>② <i>In silico/in vitro</i>のAChE活性阻害評価結果が類似 or 評価対象物質より強い</li><li>③ P=O体が速やかに代謝される他、O-メチルにおける脱メチル、P-O-アリール結合の開裂、この開裂により生じたフェノール体の抱合体形成といった、評価対象物質と類似の代謝経路を有する</li><li>④ 類似 or 評価対象物質より強い作用を示す可能性のある動態を有する</li></ol> |



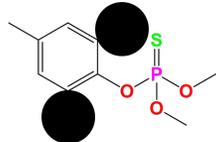
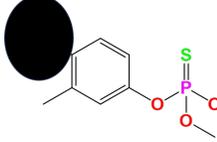
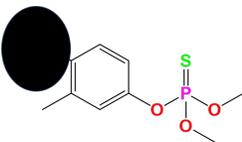
# ケーススタディ：NAMsを用いたリードアクロス-2

ステップ -2 類似物質の特定 食安委で評価済み農薬のうち、Phosphorothioate類を対象に、RDKitあるいはMorganフィンガープリントを用いたクラスター解析を試行し、いずれのフィンガープリントでも評価対象物質と共通のクラスターに属していた3物質を類似物質候補とした



評価対象物質

*In silico*: 陽性  
*In vitro*: 87.2% (陽性)  
*In silico\_Caco-2*: 4.58

| ステップ -3  | 類似物質の評価                          | P206  | P248  | P256  |  |
|--|----------------------------------|---|---|---|--|
| 構造   |                                  |  |  |  |  |
| ①評価対象物質と同様の構造を有し、リン原子の反応性が評価対象物質と類似 or 強い (構造類似性)          | [不確実性：高]                         | [不確実性：中]  | [不確実性：高]  | → <i>in silico/in vitro</i> ツールを用いてChE活性を確認し、不確実性を低減する (以下参照)                       |  |
| <i>In silico</i> AChE活性阻害予測/<br><i>In vitro</i> AChE活性阻害評価 | 陽性の可能性<br>がある<br>/ 陰性            | 陽性<br>/ 陽性  | 陽性<br>/ 陽性  | 陽性<br>/ 陽性  |  |
| ②AChE活性阻害評価結果が類似 or より強い                                   | [不確実性：高]                         | [不確実性：低]  | [不確実性：中]  | [不確実性：中]  |  |
| ③評価対象物質と類似の代謝経路を有する  | いずれも [不確実性：低]                    |   |   |   |  |
| ④類似 or より強い作用を示す可能性のある動態を有する                               | [不確実性：中]                         | [不確実性：中]  | [不確実性：中]  | [不確実性：中]  |  |
| 毒性プロファイル   | タンパク質との反応性に違いがある可能性がある。 [不確実性：中] | 信頼できるデータであり、評価対象物質と一貫した所見となっている。 [不確実性：低]   |   |   |  |
| リードアクロス実施の妥当性  | データ品質                            | 満たしている  | 満たしている  | 満たしている  |  |
|  | 仮説充足度                            | 評価対象物質との構造類似性、生物活性類似性が低く、仮説①及び②を満たしていない。  | 受け入れ可能な範囲の不確実性で、仮説①～④を満たしている。   | 仮説①は満たしていないが、仮説②により仮説①の不確実性は軽減され、仮説③及び④を満たしている。                                     |  |
|  | 結論                               | 妥当ではない  | 参照物質として妥当である  | 参照物質として妥当である  |  |

(*In silico*/*In vitro* AChE活性阻害評価、Caco-2透過性予測：技術的特徴や生物学的関連性を確認した上で活用)

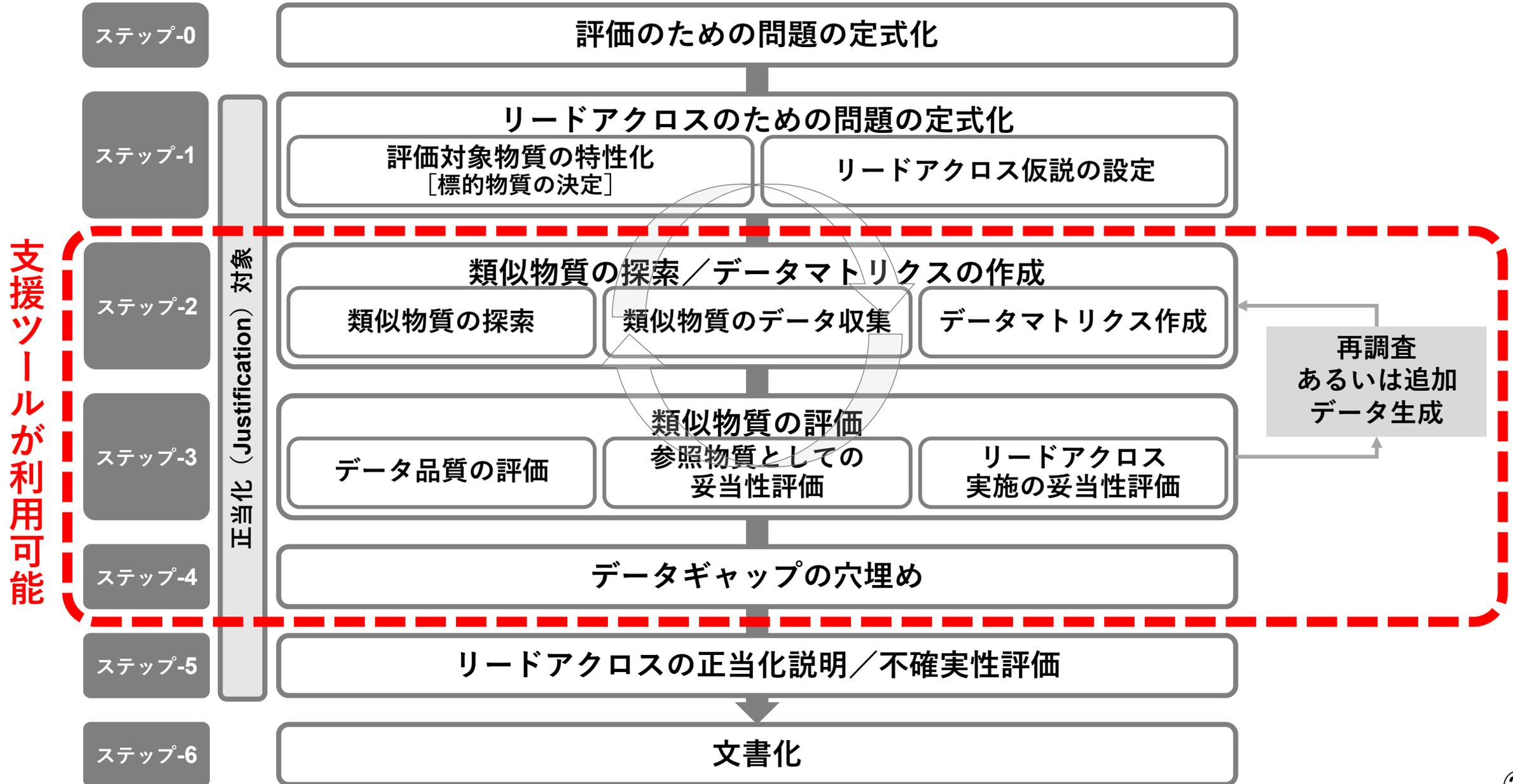
# ケーススタディ：NAMsを用いたリードアクロス-3

|        |             |  |
|--------|-------------|--|
| ステップ-4 | データギャップの穴埋め | <ul style="list-style-type: none"> <li>● 参照物質であるP248及びP256の90日の毒性試験(ラット)におけるAChE阻害活性に基づくNOAELは0.1-1.5mg/kg/日程度である。</li> <li>● ワーストケースシナリオを適用した結果として、評価対象物質(シアノホス)は90日間の毒性試験(ラット)においてAChE阻害活性を示す可能性があり、参照物質の内、低い方の<b>NOAEL ≒ 0.1 mg/kg/日を適用</b>する。</li> <li>● なお、<b>シアノホスの実際の90日間試験のNOAELは0.2 mg/kg/日</b>であった。</li> </ul> |
|--------|-------------|--|

|                  |                                       |                           |                            |  |
|------------------|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------|--|
| ステップ-5/-6        | リードアクロスの正当化(Justification)・不確実性評価/文書化 | 類似性以外に関する不確実性の評価          |                            |  |
|                  |                                       | 問題の定式化                    | リードアクロス結果の評価目的での利用に対する不確実性 | 低：リードアクロス結果の利用目的が定義され、穴埋めするエンドポイントも明示されている。また受け入れ可能な不確実性レベルが提示されている。   |
|                  |                                       | 標的物質                      | 適切な識別ができているか               | 低：評価対象物質は明確に特定、定義されているが、不純物情報はなかった。  |
|                  |                                       | 参照物質                      | 適切な識別ができているか               | 中：参照物質は2物質である。参照物質は明確に特定、定義されているが、不純物情報はなかった。  |
|                  |                                       |                           | DB・検索条件/網羅性                | 中：類似物質は食品安全委員会が評価した農薬を対象とした。ケーススタディであるため網羅性は限定的である。検索条件は評価対象物質の構造的特徴、よく知られたMoA及び教師なしアプローチに基づくものであり、適切である。                  |
|                  |                                       |                           | リードアクロスに使用したデータ品質          | 低：食品安全委員会の評価書においてデータ品質は評価されており、評価書内でデータ品質に対する言及がない情報は信頼性が高いと考えられる。   |
|                  |                                       | データギャップの穴埋め方法             |                            | 中：アナログアプローチによるリードアクロスである。  |
|                  |                                       | データギャップの穴埋め方法の穴埋めに関する妥当性  |                            | 中：2物質の情報に基づく、ワーストケースシナリオを用いたアナログアプローチである。代謝物のAChE活性阻害が十分に評価できていないことに加え、 <i>in vitro</i> でAChE活性阻害が見られた濃度と血中濃度の関係が解析されていない。 |
|                  |                                       | 専門家判断                     |                            | 低：構造類似性の判断において、専門家判断を活用した。   |
|                  |                                       | データマトリクス                  |                            | 低：作成済  |
| 透明性があり、再現可能な文書化か |                                       | 低：必要な情報源等を含め文書化している。      |                            |  |
| 結論：              |                                       | 低-中：安全サイドの評価として受け入れ可能である。 |                            |  |

[化学構造情報に加え、NAMsの併用により、リードアクロスの説明性向上]

# 実務への実装に向けて：リードアクロスの支援ツール



# 支援ツール(1) : OECD QSAR Toolbox

- リードアクロスによりデータの欠落を補完するツール（無料で利用可能）  
(<https://qsartoolbox.org/>)
- 類似物質の検索機能・グループ化を支援する機能と、種々の規制エンドポイントの試験データ（データベース）を備えている。
- 継続的に機能の改良が行われている（サステイナビリティ）。

Documents

- Document 1
  - [C: 1;Md: 1;P: 0] Search chemical
    - [C: 858;Md: 4675;P: 0] Aliphatic Carbon
      - [C: 6;Md: 35;P: 0] Subcategorized: ...

# 支援ツール(2):

# 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS)



- エンドポイント：反復投与毒性
- 信頼性が高い試験データ
- 試験の用量反応データを参照可能

| Endpoint                   | Study No. | Dose   |
|----------------------------|-----------|--|
| Substance Identity         |           |  |
| Repeated Dose Toxicity     |           |  |
| -LOEL                      | (3/52)    | M: 12 mg/kg/day, M: 50 mg/kg/day, M: 62 mg/kg/day    |
| -NOEL                      |           |  |
| Blood Chemical Examination | (1/26)    | M: 12 mg/kg/day                                      |
| General Signs              | (3/195)   | M: 25 mg/kg/day, M: 400 mg/kg/day, M: 31 mg/kg/day   |
| Hematological Examination  | (1/57)    | M: 12 mg/kg/day                                      |
| Histopathological Findings | (3/1089)  | M: 12 mg/kg/day, M: 25 mg/kg/day, M: 31 mg/kg/day    |
| Necropsy                   | (3/261)   | M: 100 mg/kg/day, M: 400 mg/kg/day, M: 250 mg/kg/day |
| NOEL/LOEL                  | (3/6)     | M: <6 mg/kg/day, M: 25 mg/kg/day, M: 31 mg/kg/day    |
| Organ Weights              | (1/56)    | M: 25 mg/kg/day                                      |

**代謝**

| Test Item | mg/kg  | 10   | 10   | 10   | 10    |      |      |      |       |      |      |      |       |      |
|-----------|--------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|------|
|           |        | mean | SD   | S... | F1 F3 | mean | SD   | S... | F1 F3 | mean | SD   | S... | F1 F3 |      |
| BUN       | mg/dL  | 16.2 | 0.6  |      |       | 14.3 | 0.4  | *    |       | 15.5 | 0.3  |      | 15.7  | 0.5  |
| CRN       | mg/dL  | 0.77 | 0.02 |      |       | 0.70 | 0.00 | **   |       | 0.74 | 0.02 |      | 0.71  | 0.01 |
| TP        | q/dL   | 6.5  | 0.1  |      |       | 6.4  | 0.1  |      |       | 6.5  | 0.1  |      | 6.5   | 0.0  |
| BA        | µmol/L | 18.0 | 1.0  |      |       | 21.8 | 2.0  |      |       | 19.8 | 2.7  |      | 21.2  | 2.2  |
| ALB       | q/dL   | 4.8  | 0.1  |      |       | 4.6  | 0.0  |      |       | 4.7  | 0.0  |      | 4.7   | 0.0  |

**用量反応を含む毒性試験データ**

**作用機序/有害性発現経路**

Figure 1. Hepatotoxic pathway induced by allyl acetate.

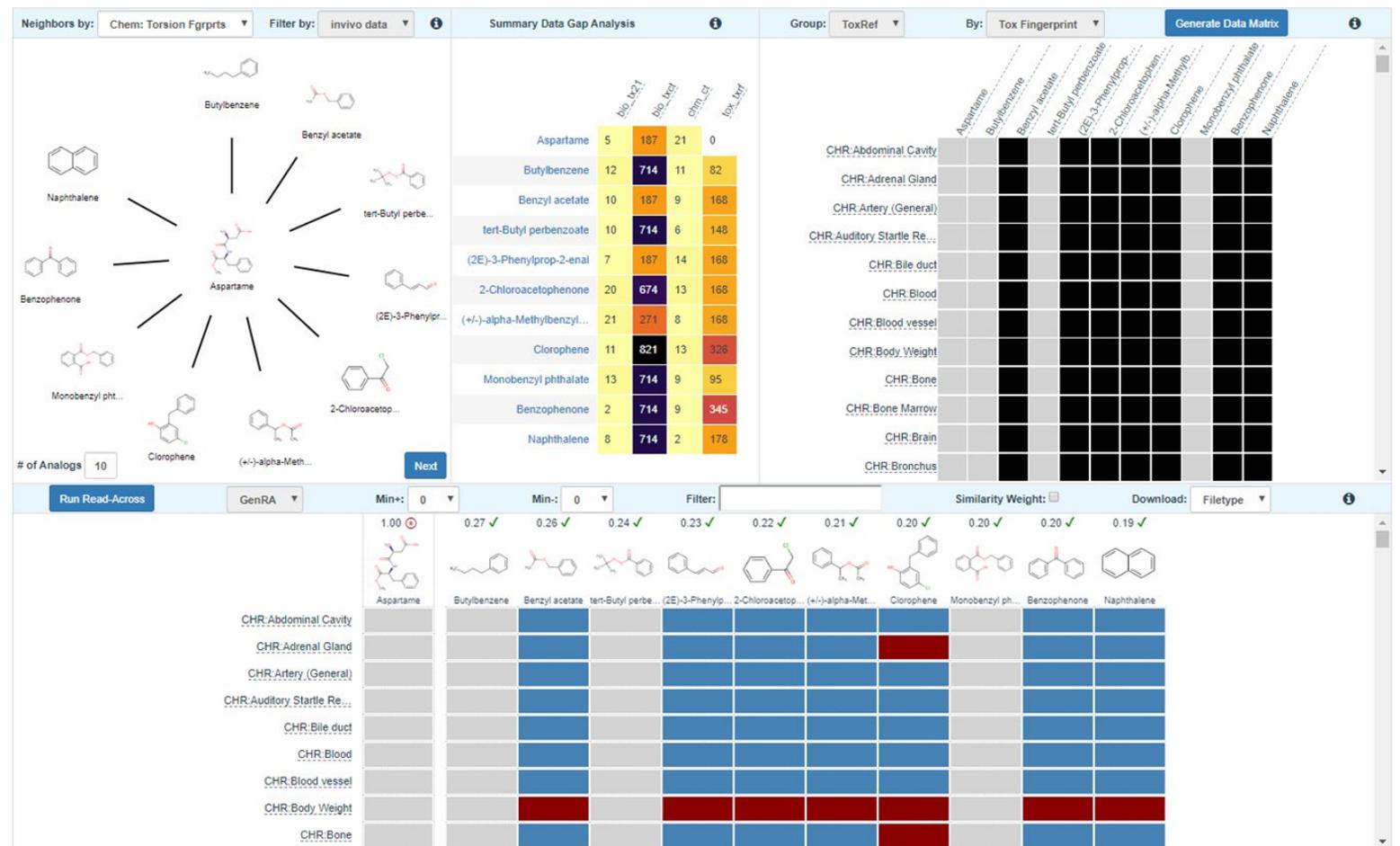
# 支援ツール(3): Generalized Read-Across (GenRA)

- 米国環境保護庁が開発したWebアプリケーション
- 化学構造や生物活性などの観点から、自動的に類似物質を検索して表示



再現性のあるリード  
アクロスの毒性予測  
を行うためのアルゴ  
リズムによる自動化  
されたアプローチ

<https://www.epa.gov/chemical-research/generalized-read-across-genra>





# 食品健康影響評価にリードアクロスを活用する際の考え方の提案

## 提案書の構成

- 背景
  - ✓ リードアクロスの概要
  - ✓ 食品健康影響評価でのリードアクロスの必要性と国際動向
- 既存のガイダンス
  - ✓ OECDのグルーピングガイダンス
  - ✓ EFSAのリードアクロスガイダンス
- 食品安全委員会での法的位置づけと食品健康影響評価における適用範囲
  - ✓ 食品安全委員会での法的位置づけ
  - ✓ 食品健康影響評価における適用範囲
- 食品安全影響評価におけるリードアクロスの実施に関する提案
  - ✓ リードアクロスを実施するための前提条件・前提理解
  - ✓ リードアクロス手順に含めるべき標準的要素
  - ✓ 本文書で採用するリードアクロス実施手順
  - ✓ 各ステップの説明
- 用語集

# 課題と将来の展望

## ■ 基礎知識・技術の習得と意識の変革：

- 「科学的根拠に基づいたWoEによる合理的な評価手法の一つ」としての認識

## ■ 段階的な導入と経験の蓄積：

- 海外機関で評価済みの結果の受け入れの検討
- 構造の類似性が高く機序が明確な物質群、曝露レベルの極めて低い物質群など
- NAMsデータはないが評価が困難ではない物質グループなど

## ■ 専門家との連携体制の構築と人材育成：

- 専門家（化学、生化学、有害性/リスク評価）との情報交換、アドバイスを得られる体制
- 研修などによる人材育成

## ■ 透明性と説明責任の確保：

- 評価プロセスを明確に文書化
- 内部レビュー体制の確立

## ■ 再評価可能な枠組み：

- 技術の進展に応じて結果を再評価し修正する柔軟性の担保