

## 添付資料-1 収集した資料の要約

---

収集した評価事例の概要を以下に示す。なお、【詳細調査対象】と記載した事例については、添付資料-2 NAMs の手法を用いた化学物質のリスク評価の事例 (詳細調査結果) に詳細を整理した。

### 1. Case Study on the Use of Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA) for Chronic Toxicity and Carcinogenicity of Agrichemicals with Exemplar Case Studies - Ninth Review Cycle (OECD IATA Case study No.402, 2023)

#### 【詳細調査対象 (1-1 及び 1-2)】

本ケーススタディでは、慢性毒性・発がん性試験を行わずに農薬の Point of Departure (POD) を設定するため、サフルフェナシル及びスピロピディオンを対象として、ICH S1B を参考に構築された Rethinking Carcinogenicity Assessment for Agrichemicals Project (ReCAAP) フレームワークによる Weight of Evidence (WoE) アプローチが適用された。

サフルフェナシルと同じくプロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ (PPO) 阻害活性を有する物質から、GenRA 及び ToxPrint ツールを用いて、米国環境保護庁 (U.S.EPA) でリスク評価済みの 6 物質が類似物質として選定された。ヒトに対する発がん性の可能性に関して、内分泌かく乱性、免疫抑制等が評価された。内分泌かく乱の可能性については既存の毒性試験結果から、EAT (Estrogen、Androgen、Thyroid) 及び性ホルモン生合成系への作用は無いとされたが、ホルモン測定が実施されていなかったため、ToxCast モデルによるエストロゲン受容体 (ER) 及びアンドロゲン受容体 (AR) を介する作用の予測結果も取り入れられた。類似物質のうち、発がん性の可能性があった 2 物質とサフルフェナシルについて、毒性プロファイルの相違が検討された。1 物質はペルオキシゾーム増生剤であり、もう 1 物質は造血系及び肝臓への影響が認められたが、サフルフェナシルでペルオキシゾーム増生の証拠はなく、肝臓に認められた影響も二次的影響であると評価され、発がん性を示唆する証拠は認められなかった。結果として、亜慢性毒性試験で得られた最も保守的な値が POD として採用された。本ケーススタディの不確実性は中程度と評価されている。

スピロピディオンの同じく酵素アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACCase) 阻害活性を有する除草剤及び殺虫剤のうち、ToxPrint を用いた類似物質探索を活用し、標的臓器や毒性エンドポイントが類似するテトロニック酸及びテトラミック酸誘導体の 3 物質が類似物質として選定された。スピロピディオンは甲状腺の重量変化を伴わない

影響 (甲状腺濾胞細胞肥大及び膠様変性) を示したが、ヒトとの関連性を評価するためウリジン二リン酸グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-GT) 誘導及び甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO) 阻害活性について *in vitro* での評価等が行われ、ヒトと関連のない作用機序 (MoA) に基づく影響であることが確認された。発がん性に関連する MoA として内分泌かく乱作用の可能性が評価された。この結果、ホルモン測定は実施されていないものの *in vivo* 試験で表現型への影響はなく、ToxCast Pathway model を用いた ER 及び AR を介した作用のいずれも不活性であった。また、類似物質のうち唯一発がん性の可能性が示唆された物質と類似する所見がスピロピディオンではみられなかったことから、発がん性はないと結論された。結果として、亜慢性毒性試験に基づき最も保守的な POD が採用された。本ケーススタディの不確実性は中程度と評価されている。

## **2. Case Study on the use of Integrated Approaches to Testing and Assessment for potential Systemic Toxicity and Estrogen Receptor Activation of a Group of Bisphenols and Select Alternatives (OECD IATA Case study No.373, 2022) 【詳細調査対象】**

近年、内分泌かく乱作用があるとされるビスフェノール A (BPA) の初期発達段階での影響が懸念され、代替物質の使用が増加した結果、望ましくない代替 (regrettable substitution) の懸念が指摘されている。本ケーススタディは、BPA 及びその代替物質のハザード評価に必要な情報を収集し、優先順位付けやリスク評価に役立てるために実施された。構造類似性や用途の共通性から 25 種の代替物質を選定し、ハイスループットなトランスクリプトーム解析に基づく全身影響 Point of Departure (POD) とエストロゲン受容体 (ER) パスウェイ特異的 POD が算出された。一般毒性に関しては多くの物質で手法間の POD が 1 桁程度の範囲内で一致したが、分布に基づく手法はばらつきが大きかった。ER 解析では一部の物質が ER アゴニストとして作用した。総合的に、全身毒性及び ER 特異的影響に対する NAMs 由来の POD は、従来の動物データに基づく *in vivo* POD よりも保守的な推定値となり、将来の優先度付けやリスク評価に有用であることが示された。なお、本ケーススタディの不確実性は中程度と評価されている。

## **3. Case Study on the use of an Integrated Approach for Testing and Assessment (IATA) for New Approach Methodology (NAM) for Refining Inhalation Risk Assessment from Point of Contact Toxicity of the Pesticide, Chlorothalonil (OECD IATA Case study No.367, 2022)**

本ケーススタディでは、*in vivo* 反復吸入毒性試験の代替として、*in vitro* 3D ヒト気道上皮モデル、粒子サイズ分布、*in silico* 数値流体力学 (Computational fluid dynamics: CFD)、及び *in vivo* のヒト作業ばく露測定を組み合わせ、作業者の呼吸器ばく露リスクを評価できるかが検証された。クロロタロニルについては、ラットの 14 日間用量設定試験において、喉頭の扁平上皮化生の増加が確認されている。しかし、ラットはヒトよりもこの病変への感受性が高いため、ラットのデータをヒトへ外挿することは適切ではない。そこで、*in vitro* 3D ヒト気道上皮モデル (個体ドナー由来 MucilAir™) から得られたデータに基づきヒト等価濃度 (HEC) を導出した上で、作業ばく露リスク評価を行った。その結果、短期・中期の吸入ばく露マージン (MOE) は、呼吸用保護具を使用しない条件でも 5~660,000 の範囲にあり、懸念はないことが示された。以上より、本ケーススタディを通じて、Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) に基づく試験戦略が実務的に適用可能であることが示唆された。

#### 4. Case Study on the use of Integrated Approaches for Testing and Assessment for developmental neurotoxicity hazard characterisation of imidacloprid and the metabolite desnitro-imidacloprid (OECD IATA Case study No.366, 2022)

##### 【詳細調査対象】

イミダクロプリドに関する発達神経毒性 (DNT) 影響について、*in vivo* 試験 (OECD TG426) からは明確な結論は得られていない。本ケーススタディでは、イミダクロプリドとその代謝物デスニトロイミダクロプリドについて、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の活性化に関する DNT *in vitro* バッテリー (DNT-IVB) による試験を行い、*in vitro* 試験から生理学的動力学 (PBK) モデリングを用いて内部ばく露予測し、ハザード特性評価が実施された。その結果、nAChR 活性化による発達神経障害の有害 (性) 転帰経路 (AOP) のうち前半の反応 (nAChR への結合 (Molecular Initiating Event: MIE) → nAChR の活性化 (Key Event: KE 1) → nAChR の脱感作 (KE2) まで) は、イミダクロプリドとその代謝物による作用が認められた。一方、細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達の変化による細胞表現型変化 (KE3) や遺伝子転写の変化、神経発生への影響 (神経細胞分化、移動、軸索形成、シナプス形成、脳領域の組織化) (KE4) については明確な作用は認められなかった。遺伝子発現や形態学的な神経発達の異常にどう繋がるかという後半のプロセスについては、不確実性が残ると評価された。

#### 5. Case Study on the use of Integrated Approaches for Testing and Assessment for developmental neurotoxicity hazard characterisation of acetamiprid (OECD IATA

### Case study No.365, 2022)

アセタミプリドについて、発達神経毒性 (DNT) 試験 (OECD TG 426) において聴覚性驚愕反応の低下が認められたとの報告があるが、その毒性学的意義について明確な結論は得られていない。続いて実施されたメカニズム解析でも解釈には限界があったため、本ケーススタディでは追加的な情報収集及び評価が行われた。入手可能な *in vitro* データから、アセタミプリドへのばく露はニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を介した  $Ca^{2+}$  流入を誘導するとともに、電位依存性カルシウムチャネル (VOCC) 機能を減弱させることが示された。さらに、複数の *in vitro* 試験により、アセタミプリドばく露による形態学的変化及び転写学的変化が検討されたが、一貫した結果は得られなかった。本物質の毒性影響をより特徴付けるため、仮説に基づく有害(性) 転帰経路 (AOP) に裏付けられた一連の DNT-*in vitro* 試験バッテリー (IVB) ならびに核内受容体活性化に関する追加スクリーニングが実施された。また、得られた *in vitro* データについて、生理学的動力学 (PBK) モデリングを用いて内部ばく露量との関連付けが行われた。得られた結果に基づき提案された AOP の molecular initiating event (MIE) 及び初期の key event (KE) は一定程度支持されたものの、有害影響及び関連 KE には依然として不確実性が残るとの結論が示された。

### 6. Case study on the use of Integrated Approaches for Testing and Assessment for DNT to prioritize a class of Organophosphorus flame retardants (OECD IATA Case study No.364, 2022) 【詳細調査対象】

本ケーススタディでは、臭素系難燃剤 (BFR) の代替物質として広く使用されている有機リン系難燃剤 (OPFR) 8 物質を対象に、*in vivo* による発達神経毒性 (DNT) 試験の優先順位付けを目的として DNT-*in vitro* 試験バッテリー (IVB) 非哺乳類動物モデル (ゼブラフィッシュ)、文献情報等による DNT 及び急性神経毒性評価が行われた。OPFR と BFR の相対的な影響を評価するため、Point of Departure (POD) 及びベンチマーク濃度 (BMC) を用いて、複数の *in vitro* 試験及びゼブラフィッシュモデルにおける活性を比較した。さらに、これらの *in vitro* 試験及びゼブラフィッシュモデルから得られた毒性データを、DNT に関する *in vivo* ガイドライン試験結果及びヒトばく露量と比較した。外部ばく露量と内部濃度の関連付けには生理学的動力学 (PBK) モデル (米国環境保護庁 (U.S.EPA) の汎用ハイスループット毒性動態 (HTTK) モデル) を用いた。これらの結果から、DNT-IVB が優先順位付け及びハザード特性評価に適用可能であることが示された。この評価結果に基づき、米国国家毒性計画 (NTP) は、2 物質を *in vivo* DNT 試験の対象として選定し、化合物クラス全体の知見を効率的に補完する戦略を提示した。

## 7. Case study for the integration of *in vitro* data in the developmental neurotoxicity hazard identification and characterisation using flufenacet (OECD IATA Case study No.363, 2022)

本ケーススタディでは、除草剤フルフェナセツを対象に、システマティックレビューに基づく方法で、欧州農薬規則における発達神経毒性 (DNT)-*in vitro* 試験バッテリー (IVB) の適用性を検討した。フルフェナセツは選択的作用機序と OECD TG426 による *in vivo* DNT 試験での陰性結果に基づき DNT の懸念は低いと考えられていたが、Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) の議論を踏まえて再評価が行われた。文献レビューに含まれた、*in vivo* / *in vitro* データ、DNT-IVB の結果を統合し、有害 (性) 転帰経路 (AOP) フレームワークに基づき不確実性分析を実施した。分析の結果、少なくとも 66% の確率で DNT の AO (Adverse outcome) の特定を支持する証拠が利用可能であることが示された。文献から得られたいずれの結果においても下流の key event (KE) への影響が誘発されなかったことから、フルフェナセツが直接的な DNT を示す可能性は低いと結論付けられた。ただし甲状腺ホルモンの変動に基づく別経路の可能性は除外されていない。

## 8. Case study for the integration of *in vitro* data in the developmental neurotoxicity hazard identification and characterisation using deltamethrin as a prototype chemical (OECD IATA Case study No.362, 2022)

本ケーススタディでは、システマティックレビューに基づく方法で、タイプ II ピレスロイド系殺虫剤であるデルタメトリンを対象に、欧州農薬規則における発達神経毒性 (DNT)- *in vitro* 試験バッテリー (IVB) を含む機序情報の統合、及び不確実性の低減が検討された。疫学研究では、ピレスロイド系殺虫剤全体として DNT 懸念が指摘されている。デルタメトリンは経口投与で神経毒性を示すが、OECD TG426 の DNT 試験と文献の *in vivo* 試験では一貫した結果が得られていない。Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) により、文献レビュー、ヒトを対象とした観察研究及び DNT-IVB の情報が統合された。既存の有害 (性) 転帰経路 (AOP) が存在しなかったことから、2 つの molecular initiating event (MIE) から神経行動変化に至る AOP ネットワークを構築し、66% 超の因果関連が推定されるデータを基に、ベイズ解析で key event (KE) との関連性を定量化した。いずれの AOP も 50% を超える発現確率を示し、用量依存性が生理学的動力学 (PBK) モデルにより裏付けられた。また、*in vivo* 試験のばらつきに関しては、母体経由ではなく仔への直接投与でのみ AOP 発動レベルに

達することが示唆された。

## 9. Case Study on use of an Integrated Approach for Testing and Assessment (IATA) for Systemic Toxicity of Phenoxyethanol when included at 1% in a body lotion (OECD IATA Case study No.349, 2021) 【詳細調査対象】

本ケーススタディでは、化粧品防腐剤であるフェノキシエタノールを対象に、動物実験を行わず、NAMs と内部ばく露マージン (MoIE) アプローチを用いた次世代リスク評価 (NGRA) の妥当性が検証された。この評価では、1%の濃度でボディローションに含まれるフェノキシエタノールの全身影響を確認するため、親化合物及び *in silico* 代謝経路予測モデルによって予測された主要代謝物であるフェノキシ酢酸 (PAA) について生物学的活性が確認され、活性が極めて低いことが確認された。評価の結果、最も感度の高い Point of Departure (POD) として、HepG2 細胞におけるベンチマークドーズの信頼下限値 (BMDL<sub>10</sub>) 値 171 µM が導出された。これをヒトの推定内部ばく露量と比較したところ、フェノキシエタノールの MoIE は十分に高い値を示したが、代謝物 PAA については最高血中濃度 (C<sub>max</sub>) で 2、血中濃度曲線下面積 (AUC) で 3 という小さいマージンが得られた。この結果は、今回のアプローチが、従来の動物試験に基づく評価よりも保守的な値を示した一方で、PAA のような代謝物のリスクを非動物手法のみで結論するには不確実性が高く、現時点では信頼性が十分ではないとされた。結論として、本ケーススタディは NGRA の有用な枠組みを提示したが、安全性の最終判断にはさらなる細胞株の追加や不確実性の解消が必要であると結論づけられた。

## 10. 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 (OECD IATA Case study No.327, 2020) 【詳細調査対象】

ストロビルリン系殺菌剤はミトコンドリア複合体 III を阻害する作用を持つ。神経毒性について標準的な反復投与毒性試験では強い兆候は示されていないが、複数の *in vitro* 試験でミトコンドリア複合体 III を介したメカニズムがあることから、神経毒性の潜在性が示唆されている。本ケーススタディでは、アゾキシストロビンの潜在的な神経毒性について、リードアクロスと NAMs により評価することにより、ラット神経毒性試験 (OECD TG424) の代替可能性が検討された。アゾキシストロビンと作用機序やトキシコフォアが類似する 4 種のストロビルリン系殺菌剤を比較対象とし、有害 (性) 転帰経路 (AOP) に基づくミトコンドリア複合体 III 阻害、ミトコンドリア機

能不全、神経細胞変性を各種細胞アッセイで評価した結果、アゾキシストロビンのミトコンドリア複合体 III 阻害は類似物質より弱く、膜電位や神経突起伸長への影響も極めて小さかった。また、毒性動態的な類似性には一定の不確実性が残るものの、その差異は *in vivo* の変動範囲内とみなすことができ、必要であれば、TG424 試験ではなく、単回トキシコキネティクス (TK) 試験を実施することによりこの不確実性を軽減することが可能と考えられた。最終的に、これらの NAMs データから、アゾキシストロビンが類似物質より強い神経毒性を示す根拠は認められず、神経毒性を示さないと結論付けられた。本ケーススタディの不確実性は低い～中程度と評価されている。

#### **11. Use of IATA for identification and characterisation of parkinsonian hazard liability of deguelin by an AOP-based testing and read across approach (OECD IATA Case study No.326, 2020) 【詳細調査対象】**

農薬がミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害することで、黒質線条体神経細胞に毒性を引き起こし、パーキンソン病に類似した症状を呈することが予測される。本ケーススタディでは、この有害 (性) 転帰経路 (AOP) に基づく key event (KE) 評価にリードアクロスと NAMs を適用し、デグエリンのパーキンソン病様運動障害に関するハザード特性評価を行った。AOP の molecular initiating event (MIE) であるミトコンドリア複合体 I への結合を *in silico* 手法で、ミトコンドリアへの影響及び神経毒性影響を *in vitro* 手法で評価し、細胞ばく露に関する生物動態評価と生理学的動力学 (PBK) モデリングを用いて、*in vitro* で観察された影響が想定される *in vivo* ばく露状況においてどの程度関連性を有するかを評価した。その結果、デグエリンはソース物質であるロテノンと同様の作用機序を有するが、その作用はより弱いと結論付けられた。さらに、MIE と KE を反映した技術とアッセイ系の統合による AOP アプローチは、リードアクロスを用いた安全性評価において、より広範な応用が見込まれると結論付けられた。本ケーススタディの不確実性は低いと評価されている。

#### **12. Case study on the use of integrated approaches to testing and assessment for read-across based filling of developmental toxicity data gap for methyl hexanoic acid (OECD IATA Case study No.325, 2020) 【詳細調査対象】**

本ケーススタディでは、2-メチルヘキサン酸 (MHA) の生殖発生毒性データギャップをリードアクロスと NAMs により補完することで、欧州 REACH 規則における情報要件を動物試験に依存せず満たす可能性を検証した。ソース物質として発生毒性陽性群 4 物質と陰性群 3 物質を選定し、さらに 2-メチルペンタン酸 (MPA) を加えて、

NAMs データを取得した。ゼブラフィッシュ胚試験 (ZET)/ZET レポーター、マウス ES 細胞試験 (mEST)、iPSC ベース神経発生モデル (UKN1)、複数の CALUX アッセイ、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害試験等の *in vitro* 生殖発生毒性 (DART) バッテリーの他、*in vitro* トキシコキネティクス (TK) 補正と生理学的動力学 (PBK) モデリングを組み合わせた *in vitro-in vivo* 外挿 (IVIVE) を実施した。さらに、HDAC-QSAR 予測モデルや Dempster-Shafer/Bayesian による統合分類で、MHA の生物活性プロファイルソース物質群と比較した。ZET/ZET レポーター、mEST、UKN1、CALUX、HDAC 阻害等の全て又は大半の NAMs で陽性群は低濃度で明確な影響や阻害を示した一方、陰性群は影響が弱いか高濃度側での作用にとどまった。MHA のプロファイルは陰性群に近似し、強い発生毒性シグナルは一貫して認められなかった。バイオキネティックモデルによる補正と IVIVE-PBK により、MHA の毒性発現に必要な外部用量は高用量であり、現実的なヒトばく露下では発生毒性の発現可能性は低いと推定された。統合分類モデルも、MHA を陰性群側へ分類する傾向で一致した。本ケーススタディの不確実性は低い～中程度と評価されている。

### 13. Use of IATA for prediction of a 90 day repeated dose toxicity study (OECD 408) for 2-Ethylbutyric acid using a read-across approach from other branched carboxylic acids (OECD IATA Case study No.324, 2020) 【詳細調査対象】

本ケーススタディでは、2-エチル酪酸 (2-EBA) の亜慢性毒性を、構造の類似する 9 種の分岐鎖カルボン酸を用いたリードアクロスと NAMs で評価した。類似物質のうち、反復投与毒性試験が実施されている 2-エチルヘキサン酸 (2-EHA) 及びバルプロ酸 (VPA) の結果から、2-EBA に肝毒性があり、特に肝臓における脂肪変性に対する懸念があるとするリードアクロス仮説が導かれた。肝臓における脂肪変性の有害(性) 転帰経路 (AOP) ネットワークに基づく molecular initiating event (MIE) / key event (KE) に基づき *in silico* 及び *in vitro* による評価、細胞モデルでの脂肪蓄積試験等を実施した結果、2-EBA は PPAR $\alpha$  の活性化以外に顕著な作用を示さず、脂肪蓄積も試験した最高用量まで誘導されなかった。本ケーススタディで調査した NAMs データでは、2-EBA は *in vitro* 試験で実施した最高用量まで脂肪変性を誘発しないことを示唆した。2-EBA の最も感受性の高い *in vitro* エンドポイントの 10 パーセンタイル値を用いて定量的 *in vitro-in vivo* 外挿 (QIVIVE) によるラットの経口相当用量を求めたところ、730~948.6 mg/kg/日であり、亜慢性毒性試験のデータギャップを埋めるために使用可能であると考えられた。また、QIVIVE を用いてヒト経口等価用量 (OED) を直接算出したところ、243~245.7 mg/kg/日と推定された。本ケーススタディの不確実性は低いと評価されている。

#### 14. Case study on the use of integrated approaches for testing and assessment to inform read-across of p-alkylphenols: repeated-dose toxicity (OECD IATA Case study No.323, 2020) 【詳細調査対象】

本ケーススタディは、*p*-アルキルフェノール類を対象とした反復投与毒性評価において、作用機序 (MoA)/有害 (性) 転帰経路 (AOP) に基づくリードアクロスの有用性と規制上の適用可能性の検証を目的として実施された。肝臓を主要な標的臓器として設定し、既存の動物試験データのギャップを補うため、*in silico* 及び *in vitro* を組み合わせた方法が採用された。*In silico* ツールを用いて警告構造や腸管吸収率が類似していることが確認され、*in vitro* 試験により、反応性代謝物の量と細胞毒性の影響が確認された。その結果、アルキル鎖長の延長や分岐構造による立体障害の影響が増大するに伴い、ダンシル基で標識したグルタチオン (dGSH) 付加体の生成量や細胞毒性が減少する明確な傾向が示され、構造から生物学的応答を予測する妥当性が裏付けられた。最終的に、ソース物質の最小の無毒性量 (NOAEL) を適用するワーストケースシナリオが採用され、本アプローチ全体の不確実性は中程度と評価された。*In vitro* 手法のみではトキシコキネティクス (TK) /トキシコダイナミクス (TD) を定量的に評価し、*in silico*・*in vitro*・*in vivo* データのギャップを完全に埋めるには不十分であった。将来的には、追加の *in vitro* 試験や NAMs を組み合わせる必要がある。

#### 15. Case study on the use of integrated approaches for testing and assessment for 90-day rat oral repeated-dose toxicity of chlorobenzene-related chemicals (OECD IATA Case study No.322, 2020)

本ケーススタディでは、クロロベンゼン関連物質のラットを用いた 90 日間経口反復投与毒性試験を対象として、これらの試験を実施することなく、*in silico/in vitro* の方法やリードアクロスをを用いて評価した。P450 によって生成される活性代謝物が標的臓器において酸化ストレス、グルタチオンの低下、タンパク質結合を誘導することが示され、これらの key event (KE) が有害影響につながる可能性が示唆された。また、反復投与毒性試験において、無毒性量 (NOAEL) と log Kow の間に負の相関が観察された。log Kow に基づくこれらの物質の P450 へのアクセス可能性を考慮すると、この傾向は合理的と考えられる。本研究は、クロロベンゼン関連物質のハザード評価にリードアクロスが適用可能であることを示している。なお、本ケーススタディの不確実性は中程度と評価されている。

## 16. Case Study on the use of Integrated Approaches for Testing and Assessment for Systemic Toxicity Arising from Cosmetic Exposure to Caffeine (OECD IATA Case study No.321, 2020)

本ケーススタディでは、反復投与毒性データが欠如しているカフェインを対象物質として、構造類似物質を用いたリードアクロスによる消費者ばく露リスク評価を実施した。QSAR Toolbox ツールや ToxCast データを用いて、構造類似物質として複数のメチルキサンチン類が選定され、その作用機序 (MoA) の比較から、最も毒性が強いテオフィリンがソース物質として採用された。さらに生理学的動力学 (PBK) モデルを用いてカフェインの内部ばく露量を推定し、テオフィリンの *in vivo* データに基づく Margin of Internal Exposure (MoIE) として 25 を導出した。MoIE は血中濃度等の内部指標を基にしたものであり、外部ばく露に基づく既定の Margin of Exposure (MOE) 100 と同等の保守性を持つと判断された。共通の MoA と適切な *in vivo* データに基づくため不確実性は低く、PBK を用いた内部ばく露量の算定により、種差のトキシコキネティクス (TK) に対する既定の不確実性係数である 4 の代替となることが示された。本ケーススタディにより、NAMs に基づくリードアクロスが活用できることが示された。

## 17. Case Study on use of an Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) and New Approach Methods to Inform a Theoretical Read-Across for Dermal Exposure to Propylparaben from Cosmetics (OECD IATA Case study No.320, 2020)

短鎖パラベン類は高用量の反復投与でも明確な標的臓器毒性を示さず、弱いエストロゲン様活性が報告されているが、その作用は天然ホルモンより極めて低いとされている。本ケーススタディでは、プロピルパラベン (PP) の生殖毒性に関するデータギャップを補完し、化粧品使用時の安全性を示すことを目的として、NAMs がリードアクロスにどのような付加価値をもたらすかが検討された。

Tier 0 として、化学構造、物性、*in silico* データ、既存 *in vitro* / *in vivo* 試験情報、化粧品からのばく露量が収集された。その結果、パラベン類の物性は類似しており、アルキル鎖長の増加と核内受容体に対する弱い結合性の間に関連があることが示された。毒性学的懸念の閾値 (TTC) を上回るばく露が推定されたため、評価はリードアクロスを主体とする Tier 1 に進んだ。Tier 1 では、あえて PP の *in vivo* 生殖毒性試験を除外し、類似物質 4 物質をカテゴリー化した。その結果、ブチルパラベン (BP) が最も近似した類似物質と判断され、保守的な Point of Departure (POD) として BP の無影響量 (NOEL) 2 mg/kg/day が設定された。Tier 2 では、*in vitro* トキシコキネティク

ス (TK)/トキシコダイナミクス (TD)、トキシコゲノミクス、生物活性データ、複数のデータベース情報を用いて代謝・作用様式・強度の傾向を比較した。さらに、生理学的動力学 (PBK) モデルにより内部ばく露量を推定し、相対強度を踏まえて PP のリスク評価を統合した。結果として、NAMs により生物学的類似性と強度傾向が明確化され、リードアクロスの信頼性が向上した。以上の結果から、低毒性の化学物質の安全性評価における NAMs 活用の有用性が示された。

## **18. Application of AOPs to assist regulatory assessment of chemical risks – Case studies, needs and recommendations (PARC, 2023)**

2022 年春に欧州連合パートナーシップ European Partnership Human Biomonitoring for Europe (HBM4EU) と Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals (PARC) 内で開催されたワークショップにおいて、規制の文脈における有害 (性) 転帰経路 (AOP) の利用に関連する問題がさまざまな観点から議論された。本報告はその議論の内容を整理したものであり、AOP の枠組みがヒトのリスク評価プロセス、特にハザードの優先順位付けと特性評価、Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)、疫学研究における作用のバイオマーカー (BoE) の特定と検証に有効であることが証明された例を示している。ただし、応答-応答関係 (response-response relationship) に関する定量的情報の欠如や、化学物質データ (ばく露と毒性) を AOP にマッピングする効率的な方法の欠如等、規制当局による AOP の利用及び受け入れを妨げるいくつかの限界が特定された。これらを克服し、次世代リスク評価 (NGRA) における AOP のより適切な実装を保証するために有用と考えられる提案、進行中の取り組み、第三者によるツールがまとめられている。

AOP が適用可能な 5 つの主要領域として以下が示されている。

- (1) 化学物質のハザードに基づくスクリーニングと優先順位付けの支援
- (2) 疫学研究におけるばく露-健康関連性 (例：生物学的信頼性評価) の生物学的妥当性の提供
- (3) IATA への情報提供
- (4) 複数物質の複合ばく露リスク評価の支援
- (5) 統合的ばく露モデル構築への基盤

## **19. An AI supported case study applying in vitro studies using the ONTOX toolbox: Protocol for probabilistic risk assessment of Perfluorooctanoic acid (PFOA) (ASPIS, 2025)**

次世代リスク評価のためのオントロジー駆動型・人工知能ベース化学物質反復投与毒性試験 (ontology-driven and artificial intelligence-based repeated dose toxicity testing of chemicals for next-generation risk assessment: ONTOX) は EU の Horizon 2020 プログラムの一環として実施されている研究プロジェクトで、動物実験を用いずに化学物質のヒトのリスク評価を行う次世代手法の確立を目的としている。本プロジェクトでは、対象物質としてパーフルオロオクタン酸 (PFOA) を選び、確率論的リスク評価 (PRA) のケーススタディが計画され、本資料には評価プロトコルが示されている。ばく露評価には、スコーピングレビューで整理された手法や R\*を用いた独自手法が活用される計画とされている。ハザード特性評価では既存の手法と ONTOX が生成する *in vitro* データを組み合わせ、リスク評価全体を通じて、生理学的動力学 (PBK) モデル、定量的 *in vitro-in vivo* 外挿 (QIVIVE)、生理学的マップ、ブールモデル、大規模人工知能 (AI) モデル等の ONTOX ツールボックス全体が活用される計画とされている。本手法は、PFOA に関するケーススタディのためのものであり、*in vitro* 研究を用いた PRA の概念実証を目的としている。

\* R: データ分析や統計計算に特化したプログラミング言語

## 20. Integration of new approach methods for the assessment of data-poor chemicals (Katie et al., 2025)

ハイスループットの *in vitro* 生物活性データを含む NAMs を用いて POD を設定することは、ヒトの健康影響に関するハザード評価のスピードを加速させる。ハザードとばく露予測を統合して生物活性：ばく露比 (BER) を導出し、リスクに基づく優先順位付けに用いること、さらに NAMs に基づく生物活性フラグを用いて追加の予測やメカニズムに基づくスクリーニングが必要となる潜在的なハザードを示すこと、この2点を組み合わせることは、従来の毒性試験データが限られている物質を管理するための前向きなアプローチとなる。本研究では、国際的な研究者及び規制科学者のコンソーシアムである「Accelerating the Pace of Chemical Risk Assessment (APCRA)」イニシアチブを通じて実施された NAMs に基づく評価事例研究が示されている。主な目的は、200 物質のデータ生成と解釈を通じて、NAMs に基づく POD、BER 及び生物活性に基づくフラグを用いて、従来の毒性データが限られている物質に対処するための、再利用可能 (refusable) で受け入れ可能なアプローチを開発することであった。複数のデータストリーム (*in silico*、*in vitro* 等の NAMs を含む) が使用された。ハイスループットトランスクリプトーム解析及び表現型プロファイリングデータに加え、標的指向型の生化学アッセイ及び細胞ベースアッセイを用い、物質固有のデータでパラメータ化した汎用ハイスループット毒性動態 (HTTK) モデルと組み合わせることで、

ばく露予測と比較可能な用量を推定した。このケーススタディにより、国際的な規制当局の科学者は、動物実験の必要性を軽減しながら、ハザード及びリスクに基づくデータニーズに対応し、予測的な化学物質管理のための効率的なアプローチを活用できるようになる。本研究は、スクリーニングレベルの評価をする NAMs ベースの Point of Departure (POD) を提供するために、トキシコダイナミクス (TD) 及びトキシコキネティクス (TK) に関する NAMs を複数使用することの実現可能性を示している。

## **21. Opportunities and insights from pharmaceutical companies on the current use of new approach methodologies in nonclinical safety assessment (Jacintha et al., 2025)**

NAMs に基づく行政対応の経験の共有は、ヒトのリスク評価を改善し、医薬品の安全性試験における動物実験の使用を減らす上で極めて重要である。より広範な受入れを促進するため、バイオテクノロジー・イノベーション機構は企業を対象に NAMs の利用状況を調査し、バイオ医薬品の安全性評価において大型動物実験に替えて NAMs を採用した、NAMs ベースの当局向け資料 (regulatory filings) の事例を収集した。これらの科学的に正当化されたアプローチは、特に生物種の関連性の限界、標的モジュレーションに関する経験、及び/又は重篤な疾患への対応といった状況において、世界の保健当局に概ね受け入れられた。NAMs に基づく世界の当局向けの提出で一定の成功を収めているが、企業からは世界的な規制の調和と臨床への応用可能性に関する懸念が寄せられている。NAMs は、ガイダンスのさらなる充実と業界と規制当局の連携により、より広く普及する可能性がある。事例の中では、抗体医薬品の承認申請において in silico Weight of Evidence (WoE) 評価等を活用し ePPND 試験 (非ヒト霊長類でのバイオテクノロジー応用医薬品の経験に基づきデザインされた拡張出生前・出生後発生毒性試験) を回避した実績が紹介されている。

## **22. Report on the European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA) “New Approach Methodologies (NAMs) User Forum Kick-Off Workshop” (Mark et al., 2025)**

欧州動物実験代替アプローチパートナーシップ (EPAA) は、2023 年 12 月に欧州化学品庁 (ECHA) にて「NAMs ユーザーフォーラム・キックオフワークショップ」を開催した。本フォーラムの目的は、化学物質安全性評価における次世代リスク評価 (NGRA) での NAMs の行政利用について理解を深めることであった。会合では、過去の EPAA 皮膚感作ユーザーフォーラム及び欧州委員会消費者安全科学委員会 (SCCS) の知見が紹介され、さらに NAMs の活用を示す 5 つのケーススタディが報告された。

この中にはベンゾフェノン-4、ビスフェノール類、ブチルヒドロキシトルエン、分岐鎖カルボン酸、分岐鎖アルキルカルボン酸が含まれる。議論を通じ、関係者から NAMs 利用に関する多様な知見が共有された。NGRA における NAMs の行政利用に向けて、ばく露評価、ハザード同定、段階的かつ標的指向型 (targeted) の試験戦略、NAMs データを用いたリスク評価、NAMs の実装上の課題、オミクス技術の活用、そして人材育成とトレーニングの必要性等、具体的な提言がまとめられ、今後の EPAA フォーラムの形式やテーマについても提案が行われた。