

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）

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要（添付資料1の内容を貼ったもの）	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性
1-1	402	ICAPO	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	農業	サフルフェナシル	慢性毒性及び発がん性  (12ヵ月間慢性毒性試験 (TG452)、マウスによる18ヵ月間発がん性試験 (TG451) 又はラットによる24ヵ月間慢性毒性・発がん性併合試験(TG453))	リードアクリルスを活用して農業リスク評価のためのデータ要件を満たし、げっ歯類慢性毒性試験及び発がん性試験 (OECD TG 451、452、453) として PODを推定すること	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業のPoint of Departure (POD) を設定するため、スビ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ボ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物質はベ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ベ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。	・ICH S1B を参考に構築されたReCAAPフレームワークによる、発がん性を含む農業の安全性評価のためのヒトへの慢性リスクに対するWoEに基づき、類似物質の発がん性に関する知見を活用してPODを設定する。  <サフルフェナシルの特性> ・サフルフェナシルの作用機序は植物酵素であるPPOの阻害 ・変異原性・染色体異常誘発性なし ・亜慢性毒性 (ラット、マウス、イヌ) で貧血及びボルフィリン症を示唆する血液学的変化あり  <NAMsが活用されたポイント> ・ホルモンかく乱作用の有無 ・類似物質の毒性プロファイルとの比較 ※リードアクリルスの表現が用いられているが、ソース物質からの予測ではなく、類似物質の毒性プロファイルを発がん性の可能性を考察する材料としている。	in silico in silico リードアクリル	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ToxCastモデルによる予測 発がん性に関連する作用機序として、サフルフェナシルの内分泌かく乱作用の可能性が評価された。サフルフェナシルの毒性試験において甲状腺、雌雄生殖系系への影響がなく、血液検査の結果からもEAT及び性ホルモン合成系への作用がないことが示唆するが、in vivo試験でホルモン測定がされていなかった。</li> <li>・CERAPP(Collaborative Estrogen Receptor Activity Prediction Project)のモデル[ERアゴニスト・アンタゴニスト・結合性]:不活性</li> <li>・COMPARA(Collaborative Modeling Project for Androgen Receptor Activity)モデル[ARアゴニスト・アンタゴニスト・結合性]:不活性</li> <li>→in silicoでも不活性であることが示された。</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>■類似物質探索 ・GenRA: リードアクリルツール (構造類似性指標: Morgan Fingerprint)</li> <li>■類似性評価 ・ToxPrintツール(構造・生物活性類似性に基づく評価) →ToxPrintのパラメータを用いた主成分分析及びクラスタリングを実施し、類似物質を選定した。</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>■類似物質の毒性プロファイルに基づく考察 ・類似物質として特定された6物質のうち4物質は「ヒトに対する発がん性は低い」物質。残り2物質 (オキサジアンゾンとフルチアセトメチル) は「ヒトに対する発がん性がある可能性が高い」であった。WoE評価では発がん性が懸念される上記2物質との毒性データの相違が論じられ、評価された。 ・オキサジアンゾンはベルオキシゾーム増生剤であり、これが肝臓の機序と考えられていたが、サフルフェナシルは亜慢性毒性試験でベルオキシゾーム増生の証拠はなかった。 ・フルチアセトメチルは肝臓腫瘍と膵臓腫瘍があるとされ、亜慢性毒性試験で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はこのような影響は見られなかった。 ・上記の発がん性が認められた2物質では血液学的変化に続き、脾臓、骨髄、肝臓への影響が認められたが、サフルフェナシル等の発がん性のない物質で認められた肝臓への影響はPPO阻害とボルフィリン症に関連する二次的な影響である可能性が高い。 →「発がん性がない」と考えられることから、慢性毒性試験を実施しない評価として、サフルフェナシルの90日間の亜慢性毒性試験に基づき最も保守的なPODが採用された。</li> </ul>	<p>不確実性評価: 有 [不確実性ランク: 低=懸念とはならず、結論の信頼性に影響を及ぼさない、中=中程度の懸念となり、IATAの結論の信頼性に影響を及ぼす可能性がある]</p> <p>IATA全体としての不確実性: 中</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1)慢性毒性試験/発がん性試験がないことに関する不確実性: 低</li> <li>2)WoEに基づく評価: 低</li> <li>3)ホルモン測定欠如: 中</li> <li>4)内分泌データのギャップにモデルやToxCastデータを含めないこと: 中</li> <li>5)免疫毒性エンドポイントの詳細の不足: 中</li> <li>6)内分泌エンドポイントのデータギャップを説明するためのQSARモデリング: 中</li> <li>7)体系的な文献検索と比較した文献レビュー: 中</li> <li>8)リードアクリルにおける類似物質選定: 中</li> <li>9)リードアクリルにおけるEPAがレビューしていない物質の除外: 中</li> <li>10)作用機序 (MoA)/AOP: 低</li> <li>11)米国ベースの文献: 低</li> <li>12)データの信頼性及び受容性: 低</li> <li>13)最新の OECD ガイドラインに基づく試験の解析: 低</li> <li>14)仮説の正当化に使用した全データの整合性とWoE: 低</li> </ol>	作成国の公式な行政判断を表すものではないと記載されている
1-2	402	ICAPO	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	農業	スビロピディオン	慢性毒性及び発がん性  (12ヵ月間慢性毒性試験 (TG452)、マウスによる18ヵ月間発がん性試験 (TG451) 又はラットによる24ヵ月間慢性毒性・発がん性併合試験 (TG453))	リードアクリルスを活用して農業リスク評価のためのデータ要件を満たし、げっ歯類慢性毒性試験及び発がん性試験 (OECD TG 451、452、453) として PODを推定すること	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業のPODを設定するため、サフルフェナシル及びスビ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WoEアプローチが適用された。 スビロピディオンと同じく酵素アセチルCoAカルボキシラーゼ (ACCCase) 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。スビ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ニリン酸グルクロンシルトランスフェラーゼ (UDP-GT) 誘導及び甲状腺ベルオキシダーゼ (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ビ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。	・ICH S1B を参考に構築された、ReCAAPでのフレームワークによる、発がん性を含む農業の安全性評価のためのヒトへの慢性リスクに対するWoEに基づき、類似物質の発がん性に関する知見を活用してPODを設定する。  <スビロピディオンの特性> ・遺伝毒性なし ・スビロピディオンの農業MOAは、酵素ACCCaseの阻害。ただし、ほ乳類、真菌、紅葉植物への阻害は弱い。 ・加水分解で2-aryl- cyclic-1,3-dione derivative (SYN547305)になり、ピペリジン環からのメトキシ基脱離を経て代謝物SYN548430になる。 ・遺伝毒性なし ・亜慢性試験でマウスでは肝臓への影響、ラットで肝臓及び甲状腺への影響、イヌで一般状態への影響 (含む唾液分泌過多、歩行不安定、運動失調、沈静、痙攣、呼吸異常、協調運動障害、周囲への無関心) あり。  <NAMsが活用されたポイント> ・UDP-GT誘導の有無 ・TPO阻害活性の有無 ・ホルモンかく乱作用の有無	in vivo in vitro in vitro in silico in silico リードアクリル	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ラットの肝臓におけるUDP-GT誘導確認 ・2種類の試験結果がある ・ラットへの90日試験でT4のグルクロン酸抱合体が有意に増加した。 ・ラットへの13日間の混餌投与試験でT4のグルクロン酸抱合体が有意に増加した。</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ラット肝ミクロソームを用いたUDP-GT誘導確認 ・T4のグルクロン酸転移酵素活性を有意に亢進した。</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ラットミクロソームを用いたTPO活性の測定 ・スビロピディオン及びSYN547305のいずれもTPO活性はなかった。 →TPO阻害活性がなく、UDP-GT誘導をすることは、ヒトと関連性がないことが知られており、スビロピディオンで観察された甲状腺への影響は直接的影響ではなく、二次的影響の可能性が示唆された。ただし、他の機序 (脱ヨウ素酵素阻害等) の可能性は残っている。</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ToxCast Pathway modelによる予測 ・ER (アゴニスト・アンタゴニスト) : 不活性 ・AR (アゴニスト・アンタゴニスト) : 不活性</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>■類似性評価 ・ToxPrintツールによる構造・生物活性類似性に基づく評価 →ToxPrintのパラメータを用いた主成分分析及びクラスタリングを実施し、類似物質を抽出した →ACCCase阻害を有する除草剤及び殺虫剤として23種を特定後、ToxPrintの情報を用いて主成分分析及びクラスター解析を実施。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 (TAs/TADs) の3物質に絞込まれた</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>■類似物質の毒性プロファイルに基づく発がん性の考察 ・選定された類似物質のうち、スビロジクロフェンのみで発がん性が疑われ(肝臓: マウス、精巣/子宮: ラット)、EPAの評価では他のTAs/TADsで発がん性は認められていない ・甲状腺への影響: 肝臓で誘導されるUDT-GTが甲状腺の発がん性に関連する可能性があったが、スビロピディオンでTPO活性阻害はなく、甲状腺への直接的な影響が認められていないことに加え、ヒトに関連のないMoAであることが知られている ・ホルモンかく乱: ER、ARを介したMoAはない ・TAs/TADsで唯一発がん性の可能性が示唆されたスビロジクロフェンと類似する発がん性を示唆する所見がスビロピディオンに認められなかったことから、ヒトに対する発がんリスクはない ・上記以外の毒性プロファイルや動態情報等を用い、WoE評価を実施 →「発がん性がない」と考えられることから、慢性毒性試験を実施しない評価として、スビロピディオンの90日間のイヌの亜慢性毒性試験に基づき最も保守的なPODが採用された</li> </ul>	<p>不確実性評価: 有 [不確実性ランク: 低=懸念とはならず、結論の信頼性に影響を及ぼさない、中=中程度の懸念となり、IATAの結論の信頼性に影響を及ぼす可能性がある]</p> <p>IATA全体としての不確実性: 中</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1)スビロピディオンにおけるげっ歯類の慢性毒性/発がん性試験の欠如に起因する不確実性: 低</li> <li>2)WoEに基づく評価: 低</li> <li>3)ホルモン測定欠如: 中</li> <li>5)免疫毒性エンドポイントの詳細の不足: 低</li> <li>6)内分泌エンドポイントのデータギャップを説明するためのQSARモデリング: 低</li> <li>7)体系的な文献検索と比較した文献レビュー: 中</li> <li>8)リードアクリルにおける類似物質選定: 中</li> <li>9)MoA: 低</li> <li>10)米国ベースの文献: 低</li> <li>12)データの信頼性及び受容性: 低</li> <li>13)最新の OECD ガイドラインに基づく試験の解析: 低</li> <li>14)仮説の正当化に使用した全データの整合性とWoE: 低</li> </ol>	作成国の公式な行政判断を表すものではないと記載されている

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）

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要（添付資料1の内容を貼ったもの）	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性	
2	373	Health Canada	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	環境化学物質	ビスフェノール類	エストロゲン受容体 (ER) 活性、全身毒性	ビスフェノールA (BPA) 及びその25の代替物質に関してNAMsを用いて評価の優先順位付を実施すること	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 <i>in vivo</i> 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。	<BPAの特性> ・内分泌攪乱物質として知られており、ERの活性化が懸念されている ・ER活性化と発がん性、生殖発生毒性、不妊、糖尿病、神経疾患等の影響の関連が報告されている ・動物試験の結果から、妊娠前から生後1年間の発達段階のばく露は、BPAへの感受性を高める傾向がある ・ラットを用いた試験において0.015 mg/kg/dayで発達神経毒性が認められている  <NAMsが活用されたポイント> ・(Q)SARモデルによるER作用の予測 ・ハイスループットトランスクリプトミクス (HTTr) に基づくER活性化の最小生物活性濃度の決定 ・ <i>In vitro</i> 生物活性データ及びHTTrデータに基づく全身毒性の最小生物活性濃度の決定 ・ POD (全身毒性、ER) 導出のための <i>in vitro-in vivo</i> 外挿 (IVIVE)	<BPAの特性> ・内分泌攪乱物質として知られており、ERの活性化が懸念されている ・ER活性化と発がん性、生殖発生毒性、不妊、糖尿病、神経疾患等の影響の関連が報告されている ・動物試験の結果から、妊娠前から生後1年間の発達段階のばく露は、BPAへの感受性を高める傾向がある ・ラットを用いた試験において0.015 mg/kg/dayで発達神経毒性が認められている	<i>In silico</i>	■ (Q) SARモデル ・ CERAPP(Collaborative Estrogen Receptor Activity Prediction Project)で得られた約7,500物質のER 活性データを用いて作成された、複数の(Q)SARモデルを統合したCERAPP (Collaborative Estrogen Receptor Activity Prediction Project) コンセンサスモデルを用いて、ERへの結合性、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性の予測を実施した ・ OECD QSAR Toolboxは、構造、作用機序、物理化学的性質、代謝等の類似性に基づき物質をグループ化するツールとして利用された。警告構造や意思決定ツリーを用いることで、ER結合性及び発生・生殖毒性 (DART) に関する知見を得るため利用された →すべてのビスフェノール類がER結合性及びアゴニスト活性を持つと予測された	不確実性評価：有 IATAの全体としての不確実性：中 1) 一般全身毒性に基づく最小生物活性濃度の導出：中 2) ER活性化に基づく最小生物活性濃度の導出：低-中 3) PODを導出するためのIVIVE：中 4) ケーススタディ化合物に対する限定的なHTTrデータ：低	OECD (2022：文献No.2)では「公式な行政的な決定として説明されるべきではない」と記載されているが、Health Canada関係者も共同著者となっている同報告を含めた論文 (文献No.22) において「a case study as a part of Canadian Chemical Management Plan (CMP)」と説明されている
									<NAMsが活用されたポイント> ・(Q)SARモデルによるER作用の予測 ・ハイスループットトランスクリプトミクス (HTTr) に基づくER活性化の最小生物活性濃度の決定 ・ <i>In vitro</i> 生物活性データ及びHTTrデータに基づく全身毒性の最小生物活性濃度の決定 ・ POD (全身毒性、ER) 導出のための <i>in vitro-in vivo</i> 外挿 (IVIVE)	<i>In vitro</i>	■ ToxCastデータベースに基づく全身毒性の最小生物活性濃度の決定 ・ ToxCastデータベースから一般全身毒性の生物活性閾値として、AC <sub>50</sub> 値の分布の5パーセンタイル値を収集した。再現性及び信頼性の低いデータを除くため、警告フラグ (caution flags) が3未満であること、AC <sub>50</sub> 値が最低試験濃度を上回っていること、ヒット率が50%以上であること等を基準とした →ToxCastの5パーセンタイルAC <sub>50</sub> 値 (Half-Maximal Activity Concentration) と、HTTrから導出された指標 (詳細は、後述のHTTrデータに基づく全身毒性影響評価に適用可能な最小生物活性濃度の算出を参照) を比較した結果、殆どが両者は1桁以内の範囲で一致していることが確認された。ToxCastの5パーセンタイルAC <sub>50</sub> 値とHTTrの25番目ランク遺伝子のBMCのうち、いずれか低い方の値が採用された			
										オミクス解析	■ ヒト乳がん由来MCF-7細胞を用いたトランスクリプトーム解析 ・ 細胞を10段階の用量 (0.0005~100 µM) で48時間ばく露した後、TempO-Seq®次世代シーケンシング法 (NGS) により遺伝子発現が測定された。解析はR-ODAFガイドライン (Omics Data Analysis Frameworks for Regulatory application guidelines) に準拠して実施され、線形スケールで1.5倍以上の変化、かつFDR (false discovery rate) 補正済みp値0.05未満の基準を満たす遺伝子を変動遺伝子 (DEG) として同定した ・ HTTr解析の精度を確保するため、溶解度、細胞毒性及び細胞ストレスに基づき試験濃度のフィルタリングが行われた →試験した16物質について、用量及び物質に依存した詳細な遺伝子発現変動プロファイルが取得され、以降の作用強度を解析する基礎データとされた			
										オミクス解析	■ HTTrデータに基づくER 活性化に関する最小生物活性濃度 ・ アプローチ1：HTTrで得られた各ビスフェノール類の遺伝子発現プロファイルを、46個の遺伝子で構成される既知のERαバイオマーカーシグネチャと照合した。Running Fisherアルゴリズムを用いて相関性を評価し、定義された閾値 (-log(p値)) を初めて超えた濃度をLOECとして特定した ・ アプローチ2：IPA (Ingenuity Pathway Analysis) ツールを活用し、変動遺伝子の中からERパスウェイで抑制又は活性化された上流調節因子 (Upstream Regulator) と標的遺伝子を同定した →アプローチ1及びアプローチ2の両方から、BPAが最も強力なアゴニストであることが特定された 2つの手法から得られた値には強い相関が認められ、ER活性の検出における信頼性が確認された 感度の違いとして、IPA標的遺伝子の5パーセンタイルベンチマーク濃度 (BMC) (アプローチ2) の方が、バイオマーカーのLOEC (アプローチ1) よりも感度が高く、より保守的なPODの導出に達していた			
										オミクス解析	■ HTTrデータに基づく全身毒性影響評価に関する最小生物活性濃度 ・ HTTrデータから最小生物活性濃度を決定するため、BMDExpress v2.3を用いてBMCモデリングが実施された 最適モデルは(1) 線形モデル選択のためのカイ二乗検定 (nested Chi-square test) (cut-off 0.05)、(2) 赤池情報量基準 (AIC)、(3) 適合度検定のp値 (> 0.1) の3つの基準に従って決定された。また、生物活性濃度の算出方法として以下の手法が検討された i) NTPによって確立された、最も感受性の高い遺伝子セットのBMCの中央値 ii) 10パーセンタイル値と最初のモード値のいずれか低い方のBMC iii) 5パーセンタイル値のBMC iv) 遺伝子の累積プロットから導出された25番目にランク付けされた遺伝子のBMC →遺伝子をBMCの低い順に並べ、転写活性が指数関数的に増加し始めるポイントとして、25番目にランクされた遺伝子のBMCを保守的な推定値として採用した			
										PBKモデル	■ POD (全身毒性、ER) 導出のためのIVIVE ・ <i>in vitro</i> での最小生物活性濃度をヒトの投与等量 (AED) へ変換するため、IVIVEを実施した ・ ハイスループットトキシコキネティクス (HTTK) のRライブラリの測定値やADMET Predictor v10による予測値 (血漿タンパク結合率、肝クリアランス) を用い、100%のバイオアベイラビリティを仮定した汎用薬物動態モデルで定常状態血漿中濃度 (Css) を推定した。この際、モンテカルロ法でCssの生理学的変動を考慮した →NAMsに基づく統合 POD (全身影響及びER経路) はBPAが最も低いことが確認された。NAMsから導出されたPODを既存の動物試験データと比較した結果、すべての物質で動物試験試験に基づくPODより低い値を示し、十分に保守的な指標であることが実証された			
										<i>In vivo</i>	■ 動物試験データの収集 ・ EPAのToxVal (CompTox Dashboard) やECHA REACHドシエから、経口の反復投与、発生、生殖毒性試験におけるNO(A)ELやLO(A)ELを収集。収集データは、詳細なハザード特定の目的ではなく、NAMsから導出した指標 (POD NAMs) が健康保護において保守的であることを検証し、動物データがない物質の優先順位付けに役立てる比較対象として使用された ・ 代替物質25物質のうち、BPAを含む5物質については子宮肥大反応アッセイ (TG440) の結果も収集され、すべて陽性であることが確認された。この結果は <i>in silico</i> モデル、トランスクリプトーム解析及びToxCastの結果に見られるER活性との比較に用いられた →得られた動物試験結果と、NAMsから導出されたPODの比較の結果、NAMsから導出されたPODは既存の動物試験のPODより常に低い値となり、保守的であることが確認された			

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)

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要 (添付資料1の内容を貼ったもの)	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性
4	366	EU-ToxRiskプロジェクト	Case study on the use of Integrated Approaches for Testing and Assessment for developmental neurotoxicity hazard characterisation of imidacloprid and the metabolite desnitro-imidacloprid	農薬	イミダクロプリド及びデスニトロイミダクロプリド (代謝物)	発達神経毒性 (DNT)	農薬リスク評価において、OECD TG426試験で認められた神経毒性影響に関して、代謝物も考慮した <i>in vitro</i> 及び <i>in silico</i> によるメカニズム解析に基づきハザード特性評価を実施すること	イミダクロプリドに関する発達神経毒性 (DNT) 影響については、 <i>in vivo</i> 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 <i>in vitro</i> パッケージ (DNT-IVB) による試験を行い、 <i>in vitro</i> 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。	<イミダクロプリドの特性> ・nAChRの活性化により発達神経障害を引き起こすネオニコチノイド系殺虫剤である ・マウスを用いた試験から、低用量のイミダクロプリドが仔の行動障害を引き起こす可能性がある ・代謝物デスニトロイミダクロプリドについて、ほ乳類の毒性データはない。ニコチンと同様、脊椎動物のα4β2、α1、α3のnAChRに対して同様の特異性を持つ ・適用するAOP: MIEとしてnAChRへの結合→KE1としてnAChRの活性化→KE2としてnAChRの脱感作→KE3として細胞内Ca <sup>2+</sup> シグナル伝達の変化による細胞表現型変化→KE4として遺伝子転写の変化、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)  <NAMsが活用されたポイント> ・nAChRの活性化によって引き起こされる発達神経毒性のAOPの各KEに対応した影響評価	<イミダクロプリドの特性> ・nAChRの活性化により発達神経障害を引き起こすネオニコチノイド系殺虫剤である ・マウスを用いた試験から、低用量のイミダクロプリドが仔の行動障害を引き起こす可能性がある ・代謝物デスニトロイミダクロプリドについて、ほ乳類の毒性データはない。ニコチンと同様、脊椎動物のα4β2、α1、α3のnAChRに対して同様の特異性を持つ ・適用するAOP: MIEとしてnAChRへの結合→KE1としてnAChRの活性化→KE2としてnAChRの脱感作→KE3として細胞内Ca <sup>2+</sup> シグナル伝達の変化による細胞表現型変化→KE4として遺伝子転写の変化、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)  <NAMsが活用されたポイント> ・nAChRの活性化によって引き起こされる発達神経毒性のAOPの各KEに対応した影響評価	<i>in silico</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ドッキングシミュレーションによるヒトnAChRへの結合性確認</li> <li>・Induced Fit Dockingエンドポイント (IFD) によるヒトnAChRに対するドッキングシミュレーションが実施された</li> <li>→イミダクロプリドはnAChRに対して2つの異なる結合様式を示した。イミダクロプリドのヒトnAChRに対する結合性は、他のネオニコチノイドと比較して弱いが、代謝物であるデスニトロイミダクロプリドは、ニコチンと同様の反応性を示すと考えられた</li> </ul> <i>invitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■KE1: ヒトnAChRの活性化の確認</li> <li>・LUHMES細胞やSH-SY5Y細胞へのCa<sup>2+</sup>流入を指標として、ヒトnAChRの活性化が確認された</li> <li>→イミダクロプリド及びデスニトロイミダクロプリドはnAChRを活性化させ、特に代謝物は、親物質より高い活性を示した</li> </ul> <i>invitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■KE2: 脱感作 (受容体機能抑制) の評価</li> <li>・LUHMES細胞やSH-SY5Y細胞へのCa<sup>2+</sup>流入抑制を指標として、イミダクロプリド及び代謝物であるデスニトロイミダクロプリドの脱感作能力が確認された</li> <li>→両物質ともnAChRの脱感作を引き起こすことが確認され、代謝物は低濃度 (約100 nM) でIC<sub>50</sub>に達し、強い影響が確認された</li> </ul> <i>invitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■KE4: 細胞毒性</li> <li>TD42 iPSC細胞、SHSY5Y細胞、LUHMES細胞、神経堤細胞、感覚ニューロンに対する細胞毒性試験が実施された</li> <li>→いずれの細胞に対しても代謝物による明らかな細胞毒性影響はみられなかった</li> </ul> <i>invitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■KE4: 神経突起の伸長への影響確認</li> <li>・LUHMES細胞及びhiPSC由来感覚ニューロンを用いて神経突起の伸長への影響が評価された</li> <li>→イミダクロプリドによる明らかな影響はみられなかった</li> </ul> <i>invitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■KE4: 神経堤細胞の遊走への影響確認</li> <li>・神経堤細胞を用いて細胞移動への影響が評価された</li> <li>→イミダクロプリドによる明らかな影響はみられなかった</li> </ul> <i>invitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ロゼット形成への影響確認</li> <li>・ヒトiPS細胞を用いて神経外胚葉前駆細胞 (NEP) への分化及びロゼット形成に対する影響が評価された</li> <li>→イミダクロプリドによるロゼット形成への影響はみられなかった</li> </ul> <i>invitro</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■レポーター遺伝子アッセイ</li> <li>・CALUX® (Biodetection Systems) を用いて、核内受容体 (ERα、AR、GR、PR、TRβ、LXR、PXR、PPARα、PPARγ、PPARδ、RAR) 及びAhRに対するアゴニスト活性測定が実施された</li> <li>・CALUX® (Biodetection Systems) を用いて、ストレスバスキュー (Hif1α、AP-1、ESRE、NFκB、Nrf2、p21、p53、TCF) の活性化も測定された</li> <li>→イミダクロプリドは、試験した最高濃度までいずれのアッセイも活性化しなかった</li> </ul> <i>in vivo</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■魚類胚急性毒性試験 (OECD TG236)</li> <li>・ゼブラフィッシュ胚を用いた魚類胚急性毒性試験により、イミダクロプリドの致死性及び催奇形性能が評価された</li> <li>→イミダクロプリドによる致死性及び発生異常は誘発されず、EC値は算出できなかった</li> </ul> <i>in vivo</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>■魚類を用いた行動影響試験 (コイルアッセイ、基礎遊泳アッセイ)</li> <li>・ゼブラフィッシュ胚を用いた行動影響試験 (コイルアッセイ及び基礎遊泳アッセイ) により、自発運動等の行動変化が評価された</li> <li>→コイルアッセイでは、散発的なコイル頻度の変化しか誘発されなかったが、試験後期においてコイル持続時間に有意な影響が認められた。基礎遊泳アッセイにおいても、移動距離及び平均バースト数の有意な減少が認められた</li> </ul> オミクス解析 <ul style="list-style-type: none"> <li>■KE3: トランスクリプトーム解析</li> <li>・Ca<sup>2+</sup>シグナルの変化が、神経発達に関連する遺伝子発現にどのような影響を与えるかを解析するため、iPSC TD42、神経堤細胞、神経外胚葉前駆細胞、SH-SY5Y細胞、LUHMES細胞を用いたRNA-Seqによるトランスクリプトーム解析が実施された</li> <li>→イミダクロプリド及びデスニトロイミダクロプリドによる有意な遺伝子発現の変化 (DEGs) はほとんど/全く観察されなかった。これにより、nAChR活性化が直接的に大規模な転写変化を引き起こすという仮説を、本データでは強く支持するには至らなかった</li> </ul> PBKモデル <ul style="list-style-type: none"> <li>■PBKモデルによるQIVIVE</li> <li>ラット及びヒトにおいて、全身モデルを用いてPBKモデルが構築された</li> <li>ラットのデータから構築されたPBKモデルを用いたQIVIVEによるreverse dosimetryの結果、<i>in vitro</i> 試験で影響がみられた濃度 (2 μM) に脳内濃度が到達する場合のヒト摂取量は0.2 mg/kg/dayと予測された</li> </ul>	不確実性評価: 有 IATA全体の不確実性 (高: High): 一貫したAOPが確立されていないこと、及び後期のキーイベント (KE) への理解が不足していることが要因。  1) 仮説の不確実性: 中 2) 採用されたアプローチの信頼性: 高 3) 使用された方法/アッセイの信頼性: 中 4) 性能評価に用いた参照化学物質の信頼性: 低 5) データの質の信頼性: 中 6) 全データの整合性と証拠の重みの信頼性: 中	現時点では当局がこの結果をそのまま規制判断の根拠として受け入れる段階にはない。

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)

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要 (添付資料1の内容を貼ったもの)	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性	
6	364	米国 (NIEHS, JHSPH, Inotiv-RTP, EPA, Neurocr line Biosciences Inc)	Case study on the use of Integrated Approaches for Testing and Assessment for DNT to prioritize a class of Organophosphorus flame retardants	環境化学物質	有機リン系難燃剤 (OPFR)	発達神経毒性 (DNT), 急性神経毒性 (NT)	代替物質として使用されている有機リン系難燃剤の <i>in vivo</i> によるDNT試験実施の優先順位付け及びハザード特性評価を実施すること	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、 <i>in vivo</i> 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- <i>in vitro</i> 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 <i>in vitro</i> 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 <i>in vitro</i> 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 <i>in vivo</i> 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 <i>in vivo</i> 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。	<OPFRの特性> 構造が有機リン系殺虫剤と類似しているため、以下の8物質についてDNT及び急性神経毒性への懸念が持たれている (triphenyl phosphate [TPHP], isopropylated phenyl phosphate [IPP], 2-ethylhexyl diphenyl phosphate [EHDP], tert-butylated phenyl diphenyl phosphate [BPDP], trimethyl phenyl phosphate [TMPP], isodecyl diphenyl phosphate [IDDP], (tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate [TDCIPP], tris(2-chloroethyl)phosphate [TCEP])  <NAMsが活用されたポイント> ・同一物質群に含まれる評価優先順位付けにNAMsが利用可能かを検討 ・複数の <i>in vitro</i> アッセイ間の活性比較のためにBMCを算出し、NAMsの各データを相互に直接比較。 ・HTTKモデルを使用して、 <i>in vitro</i> 及びげっ歯類モデルにおけるレベルとヒトのばく露量の関連付け	<OPFRの特性> 構造が有機リン系殺虫剤と類似しているため、以下の8物質についてDNT及び急性神経毒性への懸念が持たれている (triphenyl phosphate [TPHP], isopropylated phenyl phosphate [IPP], 2-ethylhexyl diphenyl phosphate [EHDP], tert-butylated phenyl diphenyl phosphate [BPDP], trimethyl phenyl phosphate [TMPP], isodecyl diphenyl phosphate [IDDP], (tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate [TDCIPP], tris(2-chloroethyl)phosphate [TCEP])  <NAMsが活用されたポイント> ・同一物質群に含まれる評価優先順位付けにNAMsが利用可能かを検討 ・複数の <i>in vitro</i> アッセイ間の活性比較のためにBMCを算出し、NAMsの各データを相互に直接比較。 ・HTTKモデルを使用して、 <i>in vitro</i> 及びげっ歯類モデルにおけるレベルとヒトのばく露量の関連付け	<OPFRの特性> 構造が有機リン系殺虫剤と類似しているため、以下の8物質についてDNT及び急性神経毒性への懸念が持たれている (triphenyl phosphate [TPHP], isopropylated phenyl phosphate [IPP], 2-ethylhexyl diphenyl phosphate [EHDP], tert-butylated phenyl diphenyl phosphate [BPDP], trimethyl phenyl phosphate [TMPP], isodecyl diphenyl phosphate [IDDP], (tris(1,3-dichloroisopropyl) phosphate [TDCIPP], tris(2-chloroethyl)phosphate [TCEP])  <NAMsが活用されたポイント> ・同一物質群に含まれる評価優先順位付けにNAMsが利用可能かを検討 ・複数の <i>in vitro</i> アッセイ間の活性比較のためにBMCを算出し、NAMsの各データを相互に直接比較。 ・HTTKモデルを使用して、 <i>in vitro</i> 及びげっ歯類モデルにおけるレベルとヒトのばく露量の関連付け	<p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■神経前駆細胞 (NPC) の増殖試験                     <ul style="list-style-type: none"> <li>・NPCの増殖は重要なプロセスであり、これが乱れると中枢神経系 (CNS) の細胞数が減少し、小頭症等を引き起こす可能性がある。NPC増殖を評価するために以下の2つのアッセイが用いられた                             <ol style="list-style-type: none"> <li>胎児由来ヒトNPC (hNPCs)</li> <li>胚性幹細胞由来ヒト神経前駆細胞 (hNPC1)</li> </ol> </li> </ul> </li> <li>■オリゴデンドロサイト分化試験                     <ul style="list-style-type: none"> <li>・NPCは増殖後、神経細胞及びグリア細胞へ分化を開始する。オリゴデンドロサイトはCNSにおいて軸索をミエリン化する機能を持つグリア細胞の一種であり、代謝能の限界近くで活動しているため、化学的攪乱やオリゴデンドロサイト増殖・分化の変動に対して特に敏感である。オリゴデンドロサイト分化を評価するためにhNPCsを用いたアッセイが使用された</li> </ul> </li> <li>■遊走試験                     <ul style="list-style-type: none"> <li>・増殖した細胞は、発生源から脳内の最終位置へ移動する。細胞移動の過程は細胞種によって異なる時期に起こる。移動過程は出生後数ヶ月間継続し得るため、脳は長期間にわたる損傷に特に敏感である。以下の3細胞種について遊走を評価した                             <ol style="list-style-type: none"> <li>神経細胞 (NC) の遊走</li> <li>ニューロンの遊走</li> <li>オリゴデンドロサイトの遊走</li> </ol> </li> </ul> </li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■神経突起伸長の評価                     <ul style="list-style-type: none"> <li>・神経細胞の分化・成熟過程において、軸索と樹状突起は神経ネットワークを形成する。これは初期段階では神経突起の伸長と分枝によって達成される。この過程への攪乱はシナプス形成障害や神経機能障害を引き起こしうる。ネットワーク形成の複雑性により、この過程は化学的攪乱に対して脆弱であり、例えば遺伝子発現、膜受容体、イオンチャネル、細胞内シグナル伝達等への干渉は、神経突起の伸長と成長に影響を及ぼす可能性がある。神経突起伸長を評価するため、6種類の異なるアッセイ (げっ歯類、ヒト、2D、3D、末梢神経系 (PNS)、CNSニューロン) が用いられた                             <ol style="list-style-type: none"> <li>神経突起伸長@USEPA (ラット) : 皮質混合初代培養細胞を用いた神経突起伸長測定</li> <li>神経突起伸長@MolDevices : ヒトiPSC由来ニューロン (iCell) を用いた神経突起伸長測定</li> <li>神経突起伸長@USEPA (ヒト) : ヒト胚性幹細胞由来ニューロン (hN2TM)</li> <li>中枢神経系神経突起伸長@UKonstanz : ルンドヒト中脳細胞 (LUHMES)</li> <li>PNS神経突起伸長@UKonstanz : ヒト胚性幹細胞 (WA09株) 由来のヒト感覚ニューロン (human sensory neurons)</li> <li>神経突起伸長@IUF : 胎児由来の初代hNPCs 3D培養細胞</li> </ol> </li> </ul> </li> <li>■電気生理学的活性/ネットワーク形成                     <ul style="list-style-type: none"> <li>・神経細胞が成熟した機能を発揮するには、シナプスを介した細胞間接続を形成する必要がある。自発的な電気的活性を持つ <i>in vitro</i> モデルで、電気生理学的手法により機能的なシナプスを有する神経ネットワークの発達を評価できる。化学物質ばく露によるシナプス形成過程の障害は、電気的活動を変化させる可能性が高い。ネットワーク形成と神経機能を評価するため、以下の2つのアッセイが用いられた                             <ol style="list-style-type: none"> <li>急性ニューロン電気生理学的活性@USEPA : ラットの初代混合皮質を用いた自発性ネットワークスパイク活動 (細胞外で記録された活動電位「スパイク」) を記録</li> <li>ネットワーク形成@USEPA : ラットの皮質混合初代培養細胞を用いた自発電気活動測定</li> </ol> </li> </ul> </li> </ul> <p><i>in vivo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■行動試験 (ゼブラフィッシュ初期生活段階)                     <ul style="list-style-type: none"> <li>行動試験 (自発運動) はDNTリスク評価において重要とみなされるが、<i>in vitro</i>での測定は困難である。初期発生段階のゼブラフィッシュは、ヒトのDNTを予測する全生物学的アプローチとしての可能性を示している。ゼブラフィッシュを用いた同様の運動アッセイが以下の3つの異なる研究室で評価された                             <ol style="list-style-type: none"> <li>行動試験@Biobide : 生型AB系統のゼブラフィッシュ胚: 速度、運動持続時間、活動頻度</li> <li>行動試験@OregoneStateU : 熱帯性5D野生型ゼブラフィッシュ胚: 光運動行動</li> <li>行動試験@UCDavis : 熱帯5D野生型成体ゼブラフィッシュ胚: 光運動行動</li> </ol> </li> </ul> </li> </ul> <p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■BMCアプローチ                     <ul style="list-style-type: none"> <li>DNT-IVB内の個々のアッセイから得られたデータからBMCを算出し、個々のアッセイの結果を比較した</li> <li>→評価対象とした潜在的な主要プロセスすべてにおいて、TCEPを除き、OPFRはグループとしてBFRと同等の活性を示し、OPFRはクラスとして活性 (神経毒性作用) があることが示された</li> </ul> </li> </ul> <p>PBKモデル</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■PBKモデルを用いた外部ばく露と内部濃度を関連付け                     <ul style="list-style-type: none"> <li>US EPAが開発したHTTK Rパッケージに含まれるPBKモデル (腸管、肝臓、その他の身体部位の3コンパートメントモデル) を用いた外部ばく露量と内部濃度の関連付けが実施された</li> <li>→試験したOPFRの大半において、<i>in vitro</i> BMCは親物質のヒトばく露から推定される血漿濃度範囲よりも約2桁高いことが示唆された</li> </ul> </li> </ul>	<p>不確実性評価: 有</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>試験バッテリー全体でのデータ不足: 一部の難燃剤がバッテリー内の全試験で評価されておらず、当該化合物にとって最も感度の高いエンドポイントが何かを議論することが困難</li> <li>アッセイの信頼性: 「神経突起伸長」等のアッセイはこの分野で一般的に用いられるが、全てのアッセイが同一ではなく、本バッテリーで試験した6つの神経突起伸長アッセイ全体ではOPFRは3/6で活性、残り3つでは不活性であった。同様にゼブラフィッシュ行動試験ではTCEPは3試験のうち1試験で活性であった。この差異の原因としては、以下が挙げられる (ただしこれらに限定されない):                     <ol style="list-style-type: none"> <li>試験した用量/濃度範囲</li> <li>使用したモデル (<i>in vitro</i> ではiPSC対ES細胞、補完動物ではゼブラフィッシュ系統)</li> <li>その他プロトコルパラメータ (培地タイプ、卵膜の有無、培地量、ばく露-静止/交換)</li> </ol> </li> <li>アッセイバッテリー内でのヒット数: 化合物が活性を有する必要があるアッセイの数 (作業注: 陽性判断するためのアッセイ数と考えられる) である。例えば、TCEPは神経細胞増殖アッセイ、ゼブラフィッシュ試験の1/3で活性が確認されているが、ゼブラフィッシュ試験内での不一致により、このデータの信頼性は低い。</li> <li>アッセイ間における結果の方向性の欠如: 複数のアッセイで活性が認められる化合物もあるが、現時点ではこれらの作用が観察される順序が不明確である。例えばBDE-47では、ネットワーク形成が最も感度が高い (BMCが最低) ように見えるが、ネットワーク形成の変化が神経突起伸長に影響を与えるのか、その逆なのかを判断するのは困難である。</li> <li>代謝: <i>in vitro</i> アッセイに伴う大きな制限と不確実性のひとつは、代謝能力の欠如により結果をヒトに関連付けることが困難である点である。したがって、<i>in vitro</i>の結果から化合物の代謝物が <i>in vivo</i> で生物学的活性化されるか不活性化されるかは不明である。</li> <li>IVIVCの基礎原理: <i>in vitro</i> データをヒトばく露レベルに当てはめる際、この手法は吸収、クリアランス、生物学的利用能 (例: 血漿タンパク質への結合、血液脳関門及び胎盤通過の可能性) を含む基礎的なPKモデルの仮定を利用する。さらに、化学物質がプラスチック器具や細胞培養液の成分に結合する可能性があるため、<i>in vitro</i> における生物学的利用能に関する情報は限られている。生理学的・薬物動態パラメータにおける個体間変動も存在する。これら全ての要因が本アプローチ適用時に不確実性を生じさせる可能性がある。</li> <li>アッセイの重み付け: 本ケーススタディでは全アッセイに等しい重み付けが適用されている。ただし、生物学的複雑性が高いアッセイ (ネットワーク形成やゼブラフィッシュ等) を、生物学的複雑性が低いアッセイよりも重み付けを高く設定する可能性も検討すべきである。</li> </ol>	この結果に基づき米国国家毒性計画 (NTP) は、2物質 (分枝構造 (IPP) と直鎖構造 (TPHP)) を <i>in vivo</i> DNT試験の対象として選定した

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）

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要（添付資料1の内容を貼ったもの）	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性
9	349	Cosmetics Europe (BIAC)	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	化粧品	フェノキシエタノール	全身毒性	動物実験を実施せずに、 <i>in vitro</i> の生物活性データ及びPBKモデルを適用し、対象物質を1%の濃度で含むボディローションを使用する際の全身毒性を評価すること	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 <i>in silico</i> 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 (Cmax) 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。	<p>&lt;フェノキシエタノールの特性&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・良好な安全性プロファイル有する物質として知られており、抗菌剤 (防腐剤) として、洗い流すタイプ及び洗い流さないタイプの化粧品の双方で、最大1%の濃度で使用されている</li> <li>・遺伝毒性はない</li> <li>・ウサギを用いた90日間経皮投与毒性試験のNOAELは357 mg/kg/day</li> <li>・フェノキシエタノールは体内で速やかにフェノキシ酢酸 (PAA) に代謝される</li> <li>・PAAはToxCastアッセイデータや<i>in silico</i>予測結果において親物質と同様に低い生物学的活性しか示さないことが確認されている</li> </ul> <p>&lt;NAMsが活用されたポイント&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・毒性発現に関連する複数の薬理的プロファイリングの活性の有無を確認</li> <li>・細胞活性が生じる最小濃度の推定</li> <li>・代謝物の予測</li> <li>・体内における代謝、消失速度、代謝物の挙動を定量化</li> <li>・内部ばく露量 (Cmax、AUC) の推定</li> </ul>	<p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■分子ドッキングシミュレーション</li> <li>・ヒトマレート脱水素酵素 (MDH) アイソザイムであるミトコンドリアMDH (mMDH) または溶解性の細胞質MDH (sMDH) はフェノキシエタノールの標的となり得るかを検証するため、Discovery StudioのCDOCKERモジュールを用いて分子ドッキングシミュレーションを実施した。フェノキシエタノールの構造を、NAD<sup>+</sup>/NADH存在下でmMDH及びsMDHの活性部位内にドッキングした</li> <li>→フェノキシエタノールがmMDHまたはsMDHを競合的に阻害する可能性は極めて低いことが示された</li> </ul> <p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■警告構造の確認</li> <li>OECD QSAR Toolbox, Derek Nexus, COSMOS, CERAPP, CoMPARA, MIE Atlas等の<i>in silico</i>ツールを用い、毒性機序、核内受容体結合、変異原性の警告構造が網羅的に調査された</li> <li>→フェノキシエタノールは、OECD QSAR Toolboxにおいて 齧歯類における<i>in vivo</i>小核試験に関するプロファイラ (H-acceptor-path3-H-acceptor) が検出された。また、COSMOSにおいて甲状腺ホルモン受容体 (THR) への結合の可能性があると推定された。フェノキシ酢酸 (PAA) では、Derek Nexusにおいて肝毒性の警告構造 (フェノキシ酢酸またはその誘導体) が検出された。また、OECD QSAR Toolboxではエストロゲン受容体 (ER) への結合、タンパク質への結合及び肝毒性に関するプロファイラが検出された。COSMOSにおいてER及びTHRの両方に対する結合の可能性があると予測された</li> </ul> <p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■代謝経路の予測解析</li> <li>代謝経路予測ソフト Meteor Nexus (v3.1.0) を用いた予測の結果、主要代謝物としてPAAが予測されたほか、芳香族水酸化やグルクロン酸結合等を含む19種類の代謝物が予測された</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■薬理的プロファイリング</li> <li>・医薬品の副作用に関連するSafetyScreen44™と呼ばれる方法を用い、44種類の主要ターゲット (24のGタンパク質共役受容体、7つの酵素、2つの核内受容体、8つのイオンチャネル、3つのトランスポーター) に対し、10 µMの濃度で結合試験及び酵素活性試験が実施された</li> <li>→全てのターゲットにおいて活性なしと判定された</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■細胞ストレスパネル試験</li> <li>・HepG2細胞によるCell Stress Panelを用いた試験で、酸化ストレス、DNA損傷、炎症、ミトコンドリア機能障害等の主要な細胞ストレス経路に関連するバイオマーカーを測定した結果、最高用量の1000 µMまで、ストレス経路の活性は認められなかった</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ヒト初代肝細胞 (PHH) を用いた代謝・クリアランス試験</li> <li>・PHHに10, 30, 100 µMの濃度で3時間暴露し、親物質の消失と代謝物の生成を測定した結果、主要代謝物として約88%がPAAに変換されることが確認された。また、固有クリアランス値が得られた</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■代謝物生成確認試験</li> <li>・生物活性試験で使用されたヒト由来細胞株 (HepG2, HepaRG, MCF-7) を用い、最大1000 µMまでの濃度で24時間ばく露を行い、培地及び細胞内における親物質とPAAの濃度推移を分析した結果、HepaRGやHepG2ではPAAの生成が確認された</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■<i>in vitro</i>生物学的利用能モデル</li> <li>・<i>in vitro-in vivo</i>外挿 (IVIVE) を実施するにあたり、<i>in vitro</i>試験のPODを避離フェノキシエタノール濃度または設定濃度とするか判断するため、<i>in vitro</i>での避離分画を推定し、<i>in vitro</i>と<i>in vivo</i>の結合能の違いを評価した</li> <li>→IVIVEにおいて、保守的な判断として設定濃度をPODとして用いた</li> </ul> <p>オミクス解析</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■全ゲノムトランスクリプトミクス解析 (TempO-Seq)</li> <li>・HepG2, HepaRG, MCF-7細胞を用いて、遺伝子発現変化を測定し、ベンチマーク用量 (BMD) モデリングにより無観察転写影響レベル (NOTEL) を算出した</li> <li>→生物学的活性は非常に限定的であったが、MCF-7細胞では好中球脱顆粒化の経路の2つの遺伝子 (ANO6とRAB36) の発現変化が認められ、HepG2では最も少ない遺伝子数で、1つのパスウェイ (シグナル伝達) のみに反応があった。最も感度の高いPODとしてHepG2細胞のデータに基づき、BMDL<sub>10</sub>値 171 µMが導出された</li> </ul> <p>PBKモデル</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■PBKモデル解析 / ハイスルーブットキシコキネティクス (HTTK) モデル解析</li> <li>・Berkeley Madonnaソフトウェア及びRパッケージのHTTKを用いて、皮膚、脂肪、肝臓、膵、及びその他の組織からなる灌流制限モデルを構築した。解析に用いたパラメータは、生理学的パラメータ、化学物質特異的パラメータ、代謝パラメータ、ばく露シナリオに関するパラメータである。代謝パラメータでは、ADH3遺伝子多型を考慮したモンテカルロ・シミュレーションが用いられた。フェノキシエタノールの血漿中濃度の95パーセンタイル値はCmaxが6.2 µM、AUCが15 µM/hと予測された。また、代謝物PAAについては、腎臓で最も高いばく露 (Cmax 69 µM、AUC 1569 µM) が予測された</li> </ul>	<p>不確実性評価：有 (本ケーススタディでは確実性とHigh, Moderate, Lowのいずれかで評価された)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 消費者の外部ばく露量の確実性: 高</li> <li>2) 消費者の内部ばく露量 (濃度) 及び標的臓器確実性: 高</li> <li>3) 代謝物の特定の確実性: 高</li> <li>4) バイオマーカーの網羅性の確実性: <ul style="list-style-type: none"> <li>・フェノキシエタノール: 中</li> <li>・代謝物PAA: 低</li> </ul> </li> <li>5) <i>In vitro</i> 毒性動態の確実性: 中</li> <li>6) 短期間試験から長期ばく露の確実性: 中</li> <li>7) PODの設定の確実性: <ul style="list-style-type: none"> <li>フェノキシエタノール: 中</li> <li>代謝物PAA: 中</li> </ul> </li> </ol>	OECD加盟国全体で規制目的の直接的な方法論の採用を意味するものではない。さらに、本ケーススタディは、執筆加盟国による公式な規制決定として解釈されるべきではない。	

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)

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要 (添付資料1の内容を貼ったもの)	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性											
10	327	EU-ToxRiskプロジェクト	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	農薬	アゾキシストロビン (ミトコンドリア機能障害)	神経毒性	リードアクロスを活用したミトコンドリア複合体IIIを介した潜在的な神経毒性をNAMsデータに基づき評価し、げっ歯類の神経毒性試験 (OECD TG424) の代替とすること	ストロピ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、リードアクロスト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種のストロピルリン系殺菌剤を比較対象とし、有害(性) 転写経路 (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。	<アゾキシストロビンの特性> ・ストロピルリン系殺菌剤に分類される農薬 ・ミトコンドリア複合体IIIのシクロムbのキノール酸化部位に結合してATP産生を阻害する作用を持つ。 ・ウシ由来の結晶構造ISQBの例では、アゾキシストロビンのメトキシメチルアクリレート基は Phe128と Tyr313の間に位置し、Glu271と水素結合を介して相互作用する。 ・ストロピルリン系殺菌剤は、標準的な反復投与毒性試験では神経毒性の強い兆候はないが、複数のin vitro試験で複合体III阻害を介した潜在的な神経毒性シグナルが示唆されている。 ・ストロピルリン系殺菌剤は生体発生毒性、発がん性に関する懸念はない(クレソキシメチルを除く) ・アゾキシストロビンはラットで経口吸収率が高いが、脳への分布は限定的	<NAMsが活用されたポイント> ・AOPの流れ (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) に沿って、MIE〜KE3までの各段階がNAMsで評価された ・類似物質調査 ・MIE評価には、モデリングによるミトコンドリア複合体IIIと化合物の相互作用の評価 ・KE1: 複合体III阻害の細胞レベル評価 (細胞の酸素消費速度 (OCR) 測定) ・KE2: ミトコンドリア機能不全の多面的評価 (酸素消費量、膜電位、乳酸濃度、ATP量を複数の細胞種で測定) ・KE3: 神経細胞変性の評価 (神経突起伸長及び細胞生存率の測定) ・細胞への反復投与による長期ばく露の影響評価 (神経突起の伸長及び細胞生存率・神経突起変性・ATP量・乳酸濃度) ・in vitro, in silicoモデルによる細胞内濃度のモデル化 ・PBKモデルによる、被験物質にばく露した際のヒト組織内及びin vivo ラットの濃度予測	in silico ■構造類似性調査 化学物質の類似性は3つのレベルで検討されている: Tanimoto係数、3D構造類似性、SMARTSパターン 標的化合物: アゾキシストロビン ソース化合物: ビラクロストロビン、ピコキシストロビン、トリフロキシストロビン、クレソキシメチル 参照化合物: アンチマイシンA ・構造類似性は、KNIME解析プラットフォームに統合されたワークフローを用いて計算 ・SMILESはU.S.EPA chemical dashboard及びCHEMID Plusから取得 ・化合物ごとの分子フィンガープリントは、化学情報系ツールのオープンソースライブラリであるRDKitを用いてMACCSキー (Molecular Access System) で計算 ・化合物間の構造類似性の評価にはTanimoto係数が用いられた  →構造類似性を確認した結果、ストロピルリン系のソース化合物はアゾキシストロビンと全体構造の類似性が低い (0.3~0.69) が、生物活性に重要な部分構造は共通しており、Tanimoto係数が活性の類似性を十分に反映しないと考えられた	in silico ■3次元の構造類似性調査 ・RDKitを用いて得られた10個のコンフォーマーを用いて、USR-CATによる3D記述子が計算され、アゾキシストロビンに対するソース物質の3D類似性が0.61~0.76となり、2D類似性よりも内部類似性をよく反映していることがわかった	in silico ■構造類似性調査 ・SMARTSパターンを用いて構造類似性を評価した結果、アゾキシストロビンとソース物質は、構造類似性は低いものの、両者は(E)-β-メトキシアクリレート基を共有し、2D類似性よりもカテゴリ-特性をより良く表す類似した3D形状を有するため、類似構造を持つと結論付けられた	in silico ■MIE: ミトコンドリア複合体IIIとのドッキングシミュレーションによる相互作用の評価 ・複合体IIIのモデリングにはヒト由来のクライオ電顕構造データ (5XTE) を使用し、Schrodingerを用いて、アンチマイシンの分子ドッキングシミュレーションを実施 →ウシの複合体III構造で補正した分子ポケットへ分子ドッキングから、ヒトにおいても同様の結合配向が再現された	in vitro ■KE1: 細胞のOCR 測定による複合体III阻害活性の評価 ・神経細胞LUHMESのミトコンドリア呼吸活性を測定 ・2つのソース物質 (ビラクロストロビン及びピコキシストロビン: 終濃度 50 μM) は複合体IIIへの強い阻害活性 (対照の80%以上) を示した ・アゾキシストロビン (終濃度: 50μM) では、対照の50%以上の阻害がみられた →OCR測定による阻害活性: アゾキシストロビン< ソース物質	in vitro ■KE2: 酸素消費量測定によるミトコンドリア機能不全評価 ・神経細胞LUHMES、腎細胞RPTEC/TERT1及び肝細胞HepG2におけるOCRを測定し、ミトコンドリア機能不全を評価した →ミトコンドリア機能に及ぼす影響: アゾキシストロビン < ピコキシストロビン及びビラクロストロビン	in vitro ■KE2: 膜電位測定によるミトコンドリア機能不全評価 ・ハイコンテンツイメージング装置を用いて、HepG2、RPTEC及び神経系細胞 SH-SY5Yにおけるミトコンドリア内に集積する蛍光色素 (Rhodamine123 又は JC-1) を解析 ・蛍光色素の量はミトコンドリア膜電位に依存して変化するため、細胞ごとに蛍光シグナルを可視化し、定量化できる →アゾキシストロビンはソース物質 (ピコキシストロビン及びビラクロストロビン) と同程度の濃度依存的なミトコンドリア膜電位の低下を起こした	in vitro ■KE2: 乳酸量測定によるミトコンドリア機能不全評価 ・電子伝達系の各複合体が阻害されると、酸化的リン酸化が乱され、細胞はエネルギー需要を満たすために解糖系を利用せざるを得なくなる。解糖系の活性化は、その最終産物の1つである乳酸の増加をもたらすため、培養上清中の乳酸濃度の上昇は、解糖速度の増加を示す指標となる ・HepG2細胞、RPTEC細胞、SH-SY5Y細胞において乳酸レベルを測定 →アゾキシストロビン、ピコキシストロビン及びビラクロストロビン: 乳酸産生増加 →複合体III阻害に起因する解糖系への切り替え (glycolytic switch) の程度: クレソキシメチル及びトリフロキシストロビン < アゾキシストロビン < ピコキシストロビン及びビラクロストロビン	in vitro ■KE2: ATP量測定によるミトコンドリア機能不全評価 ・ミトコンドリア機能不全が起こると、細胞はミトコンドリアのF0F1 ATPase (複合体V) を介したATP産生ができなくなる。そのため、細胞内のATPの消失はミトコンドリア機能不全の間接的な測定指標として用いられる ・ドーパミン作動性ニューロンであるSH-SY5Y細胞を用いて、120時間 (反復) ばく後の細胞内ATPレベルをCellTiter-Glo cell viability assayを用いて測定した (結果はin vitro (反復ばく露) の項を参照)	in vitro ■KE3: レザズリン還元法による細胞生存率測定 ・各種細胞 (RPTEC/TERT1、HepG2、LUHMES、SH-SY5Y) において 24 時間ばく露した後、レドックス指示薬であるレザズリンを用いて代謝的還元活性を測定し、細胞生存率を評価した →実施した試験濃度では、HepG2、LUHMES及びSH-SY5Yのいずれの細胞においても細胞毒性なし →アゾキシストロビンの作用は、確認した細胞タイプ全てにおいてソース物質と同程度であり、リードアクロストロビンと同等であり、かつ低いと結論付けられた	in vitro ■KE3: 神経突起伸長測定によるニューロン変性評価 ・生細胞イメージングを用いることで、培養神経細胞をcalcein-AM染色することで、細胞及び細胞から伸長する神経突起を可視化し、画像解析により神経突起伸長を定量化できる。神経突起の喪失はドーパミン作動性ニューロンの変性を示す指標となる ・ドーパミン作動性ニューロンの変性をNeuroTox 試験を用いて評価した。細胞は分化過程 (d2-3) の 24 時間処理後に 神経突起 (neurite) の伸長が評価された。一般的な細胞毒性を引き起こす濃度より 4 倍以上低い濃度で神経突起伸長を特異的に阻害する物質は、特異的神経毒性物質 (specific neurotoxicants) として分類する ・LUHMES及びSH-SY5Y細胞を用いて実施された →試験した全ての物質は、神経突起伸長を特異的に阻害せず、また 50 μM までの濃度では細胞生存率にも大きな影響はなかった →アゾキシストロビン及びソース物質はいずれも、本アッセイで評価された神経毒性ハザードは同程度であり、かつ低いと結論付けられた	in vitro (繰返しばく露) ■in vitro細胞系への繰返しばく露による化学物質の長期ばく露の影響評価 以下の複数の指標が用いられた。 1) LUHMES細胞: 神経突起伸長及び生存率 →<10 μMまで: 神経突起伸長及び生存率に影響なし。>10 μM: ストロピルリン物質間で差異なし 2) SH-SY5Y細胞: ATP量、神経突起の変性及び生存率 (PI染色) →ATP量減少 (膜電位低下に追随)。神経突起変性: アゾキシストロビンは陰性、他のストロピルリン系物質は弱い活性を示した 3) RPTEC/TERT1細胞: 乳酸濃度、生存率 (レザズリン還元法) →アゾキシストロビン及びピコキシストロビン: 急性ばく露と比較して乳酸産生のさらなる増加や生存率の低下なし →ビラクロストロビン: 乳酸産生の増加 (4日目ピーク)	不確実性評価: 有 本ケーススタディ全体の不確実性: 低~中 1) リードアクロスにおける構造的境界: i) トキシコダイナミクスでは低、ii) トキシコキネティクスでは中 2) MOA/AOP: i) 低 (MOA)、ii) 中 (AOP: まだ定義・検証が完了していないため) 3) 仮説: 低 4) リードアクロスのためのソース物質の構造的類似性: i) 低 (選定された類似物質の類似性)、ii) 低 (全体的な構造類似性)、iii) 中 (標的物質とソース物質間のLog P) 5) トキシコキネティクス: i) 低 (in vivo)、ii) パラメータにより不確実性は異なる (in silico) 6) サポートデータの類似性: i) 低 (in vivo)、ii) 中 (in vitro) 7) 類似物質の数: 低/中 8) エンドポイントデータの質: i) 低/中 (アッセイの不確かさ)、ii) 高 (提案されたAOP)、iii) 中 (AOPが中のため。アッセイで反映されるKE) 9) (ソース物質間の) エンドポイントデータの類似性: 低 10) 一貫性と証拠の重みづけ: 低	本ケーススタディはOECDモノグラフとして公表されているが、あくまでOECD加盟国全体で規制目的のために本方法論が直接受け入れられるわけではない。また、執筆した加盟国による公式な規制決定と解釈されるべきではない。

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）

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要（添付資料1の内容を貼ったもの）	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性
										<p><i>in vitro</i>及び<i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>In vitro</i>及び<i>in silico</i>によるバイオアベイラビリティ評価 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ストロピルリン物質の細胞内濃度を適切に評価するために、EU-Toxリスクプロジェクトで開発された手法を用いて、<i>in silico</i>生体動態を予測した</li> <li>・モデルの検証は、アゾキシストロピンの細胞内及び培地中の濃度を測定することによって行った</li> <li>・これらの <i>in vitro</i> バイオアベイラビリティ予測は、KEの活性化測定に関する <i>in vitro</i> データを <i>in vivo</i> に定量的に外挿するために必要となる一全での予測において、アゾキシストロピンはやや低い細胞内濃度を示し、同等の毒性を観察するためにはより高い処理濃度（投与量）が必要となるという点で、物質が同等の効力を有するという仮定を支持した</li> </ul> </li> </ul>			
										<p>PBKモデル</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ PBKモデルを用いたヒトにおける予測 <ul style="list-style-type: none"> <li>・WHO ガイドラインに記載のアプローチに基づいたPBKモデリングを用いて、ヒト組織濃度及びラットの <i>in vivo</i>濃度を予測した</li> <li>脂溶性、ヒトタンパク結合率、膜透過性、吸収、分布容積及び代謝クリアランスについて予測した</li> <li>→アゾキシストロピンはストロピルリン物質の中では最も脂溶性が低く、これは血液脳関門を通過する潜在性が最も低いことを示唆している。パラメータに用いる値には不確実性があるものの、アゾキシストロピンとピコキシストロピンは、他のケーススタディ物質と比較して、ヒトにおける高用量投与時の経口吸収率が高くなる可能性が高い。定常状態の脳/血漿分布比は、脳濃度は血漿濃度の約2倍と予測された。アゾキシストロピンは全物質中で最も短い予測半減期を示した。遊離濃度を考慮した場合、アゾキシストロピンは初期血漿濃度が最も高くなるが、予測半減期が短いため、シミュレーション期間終了時には濃度が最低となった</li> </ul> </li> </ul>			
										<p>PBKモデル</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ PBKモデルを用いたラットのPBKシミュレーション <ul style="list-style-type: none"> <li>・ストロピルリン系物質のラットにおけるクリアランスは、ヒトのクリアランスを短縮するためにアロメトリック法を用いて予測された。</li> <li>・ピラクロストロピンについては、吸収の挙動は<i>in vivo</i>のデータと一致したものの、予測血漿ばく露量が実測の放射標識AUCより高く、モデルがクリアランスを過小評価している可能性が示された。</li> <li>→ラットでは代謝が速い、またはタンパク結合率が低い可能性があるが、データがなく検証不能のため、リードアクロス評価においてピラクロストロピンのシミュレーション結果は慎重に使用すべきである</li> <li>・トリフロキシストロピン、クレソキシムメチル、アゾキシストロピン、ピコキシストロピンは、ラットPBKモデルが既存データと整合した</li> <li>・アゾキシストロピンは総濃度では他の物質と同程度だった。遊離血漿濃度を考慮すると、血漿中遊離最大濃度 (Cmax) が最も高くなるが、短い半減期のため、定常状態濃度はピコキシストロピンと同程度かやや低かった</li> <li>・投与量 2000 mg/kgまでのアゾキシストロピンとピコキシストロピンを比較した場合 <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 平均定常状態の総濃度：アゾキシストロピン &lt; ピコキシストロピン</li> <li>2) 遊離定常状態濃度：アゾキシストロピン ≈ ピコキシストロピン</li> <li>3) Cmax (総濃度・遊離濃度)：アゾキシストロピン &gt; ピコキシストロピン</li> </ol> </li> </ul> </li> </ul>			
11	326	EU ToxRisk project team (BIAC)	Use of IATA for identification and characterisation of parkinsonian hazard liability of deguelin by an AOP-based testing and read across approach	農業	デグエリン	神経毒性 (ミトコンドリア機能障害)	リードアクロスを活用したミトコンドリア複合体I阻害を介した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実施すること	<p>農業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<i>in silico</i>手法で、ミトコンドリアへの影響及び神経毒性影響を<i>in vitro</i>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、<i>in vitro</i>で観察された影響が想定される<i>in vivo</i>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。</p>	<p>&lt;デグエリンの特性&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・天然由来フラボノイドであるロテノイドに属する天然由来の殺虫剤成分</li> <li>・パーキンソン症状誘発モデルに用いられているロテノンと構造が類似している。</li> </ul> <p>&lt;NAMsが活用されたポイント&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・MIE：ミトコンドリア複合体Iとの結合様式の評価→<i>in silico</i>: 分子ドッキング法による解析</li> <li>・KE1：複合体I活性の評価→<i>in vitro</i>: Seahorseによるミトコンドリア呼吸鎖複合体別活性測定</li> <li>・KE2：ミトコンドリア機能障害の評価→<i>in vitro</i>: Seahorseによる酸素消費量測定、ミトコンドリア膜電位の評価、乳酸産生に基づく細胞の解糖系への切り替え能力の評価、細胞内ATPレベルの測定</li> <li>・KE3：タンパク質恒常性 (プロテオスタシス) 障害の評価→プロテアソーム活性測定、小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) の評価</li> <li>・バイオキネティクス： <i>in vivo</i>/<i>in silico</i>: 細胞内濃度の実測とモデル化、PBKモデルを用いた<i>in vivo</i>脳内濃度予測</li> </ul>	<p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ MIE：ドッキングシミュレーションによるミトコンドリア複合体Iとの結合様式の評価 <ul style="list-style-type: none"> <li>・Schrodinger software Maestro2017-4を用いたInduced Fit Dockingによるドッキングシミュレーションを実施</li> <li>・タンパク質構造にはヒトの低温電子顕微鏡構造 (PDB ID: 5XTD) を使用</li> <li>→標的物質であるデグエリンソース物質であるロテノンはミトコンドリア複合体Iの同じ結合部位に結合し、共通のファーマコフォアを有した。構造類似性と結合様式の一致からMIEが共通であることが支持された</li> </ul> </li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ KE1：複合体I活性の評価 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ドーパミン作動性ニューロンを再現する神経細胞株LUHMESを用い、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I-IV別の個別活性をSeahorseにより測定</li> <li>→両物質とも複合体Iを阻害し、濃度依存的に活性が低下し、デグエリンの阻害力はロテノンより弱かった</li> </ul> </li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ KE2：ミトコンドリア機能障害の評価 <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Seahorseによるミトコンドリア呼吸鎖を介した酸素消費量測定 <ul style="list-style-type: none"> <li>・機能的なミトコンドリアを有する3種類の細胞 (神経細胞LUHMES、腎細胞RPTEC、肝細胞HepG2) を用いたアッセイ系で実施</li> </ul> </li> <li>2) ミトコンドリア膜電位の評価 (ミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの阻害性測定) <ul style="list-style-type: none"> <li>・ハイコンテンツイメージング装置を用いて電位依存性色素ロマン123またはJC-1の細胞内レベルを定量化</li> <li>・評価にはHepG2細胞、SH-SY5Yドーパミン作動性神経細胞株及びRPTEC細胞の3つのアッセイ系を使用</li> </ul> </li> <li>3) 乳酸産生に基づく細胞の解糖系への切り替え能力の評価 (ミトコンドリア機能障害の評価) <ul style="list-style-type: none"> <li>・SH-SY5Y細胞、RPTEC細胞及びHepG2細胞の培地上清中の乳酸濃度を測定</li> </ul> </li> <li>4) 細胞内ATPレベルの測定 (ミトコンドリア機能障害の間接的な評価) <ul style="list-style-type: none"> <li>・市販のATP-liteアッセイを用い、HepG2、SH-SY5Y、RPTEC、LUHMES細胞における細胞内ATPレベルを測定</li> <li>→いずれのアッセイ系においてもデグエリンとロテノンの両物質で濃度依存的なミトコンドリア機能低下を示す結果がみられたが、デグエリンの方がその程度は低かった</li> </ul> </li> </ol> </li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ KE3：タンパク質恒常性 (プロテオスタシス) 障害の評価 <ul style="list-style-type: none"> <li>・プロテオスタシスの中でも特に、プロテアソーム系によるタンパク質分解と小胞体ストレス応答 (UPR) を引き起こし得る翻訳後のタンパク質処理の異常を評価した</li> <li>1) プロテアソーム活性測定：LUHMES細胞とRPTEC細胞を用い、蛍光プローブ法で測定</li> <li>2) UPRの評価：HepG2細胞を用い、生細胞イメージングに基づき、小胞体ストレスマーカーであるCHOP誘導を追跡可能な蛍光タンパク質レポーター (蛍光GFP-CHOPレポーター) により小胞体ストレス応答を評価</li> <li>→デグエリンとロテノンの両物質でプロテアソーム阻害及び小胞体ストレス誘導がみられたが、デグエリンの方がその程度は低かった</li> </ul> </li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ KE4：黒質線条体路のドーパミン作動性DAニューロンの変性の評価 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ドーパミン作動性DAニューロンの変性について、LUHMES細胞及びSH-SY5Y神経細胞にNeuriToxアッセイ (DAニューロンの表現型組織化に基づくアッセイ) を適用し、神経突起の喪失に基づき評価</li> <li>・単回ばく露 (24時間) だけでなく、反復ばく露を想定したシナリオについても評価</li> <li>→ロテノンでは神経突起の顕著な退縮がみられ、デグエリンも類似の傾向だがロテノンよりも毒性は弱かった</li> </ul> </li> </ul> <p><i>in vitro</i>/<i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ バイオキネティクス <ul style="list-style-type: none"> <li>・KEの活性化測定に関する<i>in vitro</i> データを定量的に<i>in vivo</i>へ外挿するために<i>in vitro</i>バイオアベイラビリティ予測を実施した</li> <li>1) <i>in vivo</i>/<i>in silico</i>: 細胞内濃度の実測とモデル化：細胞内のデグエリン及びロテノン濃度をモデル化し、さらに細胞内及び培地中の濃度を測定することで検証</li> <li>2) PBKモデルを用いた<i>in vivo</i>脳内濃度予測：OECDガイドランスに基づくPBKモデリングによって予測</li> <li>→デグエリンとロテノンの<i>in vitro</i>/<i>in vivo</i>の動態は類似しており、同用量投与時の脳内濃度はロテノン&gt;デグエリンと予測された</li> </ul> </li> </ul>	<p>不確実性評価：有</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) リードアクロスの構造上の境界の不確実性：低/中</li> <li>2) 作用機序/AOPの不確実性：低</li> <li>3) ミトコンドリア複合体I阻害を介した神経毒性に関するリードアクロスに用いた仮説の不確実性：中</li> <li>4) 化学物質の類似性の不確実性：低</li> <li>5) 物理学/化学的特性に基づく不確実性：低</li> <li>6) トキシコキネティクスの不確実性：低</li> <li>7) サポートデータの類似性に関する不確実性 (<i>in vivo</i>)：低</li> <li>8) サポートデータの類似性に関する不確実性 (<i>in vitro</i>)：中</li> <li>9) エンドポイントデータの質 (アッセイの不確実性)：中 <ul style="list-style-type: none"> <li>・Seahorse酸素消費量：低</li> <li>・ATP測定：低</li> <li>・MMP：低</li> <li>・乳酸アッセイ：低</li> <li>・プロテオスタシス：中</li> <li>・神経細胞の伸長：低</li> </ul> </li> <li>10) エンドポイントデータの質 (AOPの不確実性)：低～中</li> <li>11) エンドポイントデータの質 (アッセイに反映したKEの不確実性)：低～中 <ul style="list-style-type: none"> <li>・MIE：低</li> <li>・KE1：低</li> <li>・KE2：低</li> <li>・KE3：中</li> <li>・KE4：中</li> </ul> </li> <li>12) エンドポイントデータの類似性に関する不確実性：低～中</li> <li>13) 仮説を正当化するための整合性と証拠の重み付けに関する不確実性：低</li> <li>14) 全体の不確実性：低</li> </ol>	<p>本ケーススタディはOECDモノグラフとして公表されているが、あくまで例示であり、OECD加盟国全体で規制目的のために本方法論が直接受け入れられるわけではない。また、執筆した加盟国による公式な規制決定と解釈されるべきではない。</p>	

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)

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要 (添付資料1の内容を貼ったもの)	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性
12	325	EU ToxRisk project	Case study on the use of integrated approaches to testing and assessment for lead-across based filling of developmental toxicity data gap for methyl hexanoic acid	環境化学物質	2-メチルヘキサノ酸	発生毒性	リードアクロスを活用し、欧州REACH規則における発生毒性試験に関するデータギャップを保管するための評価を実施すること	本ケーススタディでは、2-メチルヘキサノ酸 (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 <i>in vivo</i> 生殖発生毒性 (DART) バッテリーの他、 <i>in vitro</i> 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 <i>in vitro-in vivo</i> 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。	<MHAの特徴> MHAは脂肪族カルボン酸で生殖発生毒性データギャップがある。バルブロン酸 (VPA)、等の一部脂肪族カルボン酸では発生毒性 (特に神経管閉鎖障害: NTD) にHDAC阻害が関与する可能性が高い。  <NAMsが活用されたポイント> ・ヒト及びマウスの経口等価用量 (OED) の算出: ZET/ZETレポーター、mEST、UKN1、CALUX、HDAC阻害等の <i>in vitro</i> DARTバッテリーで得られたEC <sub>10</sub> について、バイオキネティック補正とPBKモデルを組み合わせたIVIVEを実施 ・MHAの生物活性プロファイルのソース物質群との比較・位置づけ: 得られたEC <sub>10</sub> 及びOEDを利用し、HDAC-QPRF/QSARやDempster-Shafer理論 (DST) 及びBayesianにより統合分類	<in vitro> ・ゼブラフィッシュ胚試験 (ZET) (OECD TG236、DB-ALM Fish Embryo Test 2013 (ばく露期間は120時間まで延長)) →EC <sub>10</sub> に基づく評価では、MHAはいずれのエンドポイントも陰性群に近い結果であった。マウスOEDに基づく評価ではMHAは中〜高用量、ヒトOEDに基づく評価では高用量側に位置した。MHAは総合的に高用量側に位置し、陽性群とは明確に区別された <in vitro> ・ZETレポーターアッセイ (OECD TG236、DB-ALM Fish Embryo Test 2013に従い実施 (ばく露期間は120時間まで延長)) ・頭蓋顔面の形態学的発生への影響を定量評価し、EC <sub>10</sub> に基づき物質をランク付け →EC <sub>10</sub> に基づく評価では、MHAは低活性側に分類された。マウス及びヒトOEDに基づく評価でもMHAは低活性側に位置した。但し、MHAは最高用量でも影響が見られなかったため、他の物質との近接度は特定できなかった <in vitro> ・MHAは総合的に低活性側に位置した (DB-ALMプロトコルに従い実施) ・3T3線維芽細胞の増殖阻害 (細胞毒性)、マウス胚性幹細胞 (ESC) 株D3の分化阻害及び胚毒性について、IC <sub>10</sub> (細胞毒性及び胚毒性) またはID <sub>10</sub> (分化阻害) に基づき評価 ・D3細胞のHDAC阻害も評価 →MHAは分化阻害及び細胞毒性についてはIC <sub>10</sub> に基づき低活性物質と高活性物質の中間に位置し、HDAC阻害では低活性側に位置した <in vitro> ・UKN1 (AOP #275 「HDAC阻害は神経管欠損を引き起こす」に関連) ・KE1 (遺伝子発現の変化) の評価: PAX6、OTX2及びAP2の遺伝子発現スコア ・KE2 (分化異常) の評価: ロゼット形成率を1〜20でスケールリングしたスコア ・両スコアに基づきUKN1スコアを算出し、各物質を陰性/陽性に分類 ・D3細胞のHDAC阻害も評価 →UKN1スコアに基づきMHAは弱陽性側に分類された。OEDの結果も踏まえてMHAは総合的に弱陽性であり、陽性群とは明確に区別された。HDAC阻害については、MHAは比較的高いEC <sub>10</sub> を示した <in vitro> ・CALUXレポーター (OECDガイドライン文書No. 211/DB-ALM template (Annex I) に記載のDB-ALM Protocol No.197に従い実施) ・CALUXレポーターパネルは、主要な標的となるMIEや初期のKEに焦点を当て、核内ホルモン受容体及び発生・生殖毒性に関連する経路の活性化/阻害を評価する高選択的な細胞ベースレポーター遺伝子アッセイで構成 ・最小影響濃度 (LE) をLog(M)で示した値で評価 →MHAは総合的に低活性側で陽性群とは明確に区別された <in silico> ・HDAC-QSAR ・外脳症誘発に関連する既知の構造活性特徴に基づき構築された定性予測モデルとHDAC阻害活性及び関連する物理化学的パラメータを組み合わせた、QSAR-線形判別分析 (LDA) に基づいて評価対象物質の外脳症誘発に関する確率予測モデルを構築 →陽性群は外脳症の誘導物質と予測され、MHAを含む、2-メチルペンタン酸 (MPA)、4-ペンテン酸 (PA)、2-ジメチルペンタン酸 (DMPA) は外脳症を誘導しないと予測された。陰性群の2-エチル酪酸 (EBA) は弱い外脳症誘導物質と予測された。外脳症を誘導しない物質は外脳症に関する既報の <i>in vivo</i> 結果と一致した (試験データがないMPAを除く) <in silico> ・バイオキネティックモデル ・mEST、UKN1、CALUXレポーターアッセイ: CALUX向けのモデルとmEST及びUKN1向けのモデルに基づき、それぞれ <i>in vitro</i> 濃度を算出 ・ゼブラフィッシュ胚モデル: 既存のモデルを改変し、発生過程における臓器体積の変化と肝代謝を統合したゼブラフィッシュ胚のPBKモデルを構築し、 <i>in vitro</i> 濃度を算出 →算出された値は各 <i>in vitro</i> 試験の結果の評価に組み込まれた <in silico> ・PBK モデル (マウス/ヒト) ・バイオキネティックモデルから導出された <i>in vitro</i> 用量記述子をOEDに変換するため、5物質 (EBA、MPA、MHA、2-エチルヘキサノ酸 (EHA)、VPA) についてマウスとヒトのOEDを計算するモデルをそれぞれ開発 →予測されたOED値から、ヒトのOED値は一般的にマウスよりも低いと結論付けられ、ヒトがマウスと比較して同用量でより高い標的濃度を示すことを示唆。標的部位への送達率に関する物質間の差はマウスのほうがヒトよりも大きいと予測 <in silico> ・DSTアプローチ ・DSTは一般化ベイズ統計推論を拡張した厳密な意思決定理論の手法であり、予測を生成し、各予測に伴う不確実性を推定し、複数の証拠を統合して、個々の証拠の信頼性を定量的に考慮した証拠の重み付け (WoE) 予測を導出するフレームワークを提供する ・本ケーススタディでは、DSTを用いてソース物質の <i>in vitro</i> 試験から得られた証拠を統合し、 <i>in vivo</i> 神経発達毒性に対するWoE推定値を提供 ・トレーニングセット (本例ではソース物質) のみに基づいて情報源 (本ケーススタディ) のセットを選択する標準的手法であるleave-one-out (LOO) クロスバリデーションにより、最適な検証結果を得る試験法のサブセットを特定 →DST解析により、 <i>in vitro</i> アッセイ結果から発生毒性及び神経発生毒性が100%の確度で予測されることが示された。7つのソース物質の <i>in vivo/in vitro</i> 試験の結果間の相関関係に基づくDSTを用いると、MHAが発生毒性物質及び/又は神経発生毒性物質ではないことが示され、MPAについても同様の結論が得られた <in silico> ・ベイズ自動分類 (Bayesian Automatic Classification) アプローチ ・個々の試験結果について、専門家判断に加え、自動分類法を用いて、全ての証拠を考慮し、5段階カテゴリー (データ欠損、陰性、弱陽性、陽性、強陽性) のいずれに属する可能性が高いかを決定 → <i>in vitro</i> 影響濃度を入力値とした場合、MHAが神経発生毒性の誘導ならびに発生毒性+神経発生毒性の誘導に対して、それぞれ93%及び90%の確率で陰性と予測された。ヒトOEDを入力値とした場合、神経発生毒性に対する陰性予測確率は69%、発生毒性+神経発生毒性に対する陰性予測確率は50%に低下した。マウスOEDを入力値とした場合、神経発生毒性に関する予測は、陰性39%、弱陽性37%、陽性22%、強陽性1%、発生毒性+神経発生毒性に関する予測は、陰性20%、弱陽性44%、陽性30%、強陽性4%であった <in silico> ・生物学的フィンガープリント分類アプローチ ・ <i>In vitro</i> 結果 (連続変数) を二値 (活性/非活性) に変換して物質ごとのフィンガープリントを取得し、それに基づいて化学物質間の距離 (Tanimoto係数) を算出し、物質間の <i>in vitro</i> 応答プロファイルの類似性を算出し、これをもとにデンドログラムを作成してクラスタリングを実施 →CALUXの応答に基づく、MHAは <i>in vivo</i> 陰性物質群によく属した。CALUX応答を単一応答に変換し、他の <i>in vitro</i> アッセイで見られた反応と組み合わせると、MHAは陰性物質群から離れ、独立したクラスターに移動した	不確実性評価: 有 IATA全体としての不確実性: 低〜中 1) リードアクロスで使用した仮説の不確実性: 低〜中 2) 構造類似性に関する不確実性: 低 3) 物理化学的性質の類似性に関する不確実性: 低 4) トキシコキネティクスデータの類似性に関する不確実性: ・バイオキネティックモデリングの不確実性: 低〜中 ・代謝に関する不確実性: 低〜中 ・PKモデリングの不確実性: 低〜中 5) その他のサポートデータ (KEに関連するデータ等) の類似性に関する不確実性: 低 6) リードアクロスに用いたアナログ数に関する不確実性: 低 7) リードアクロスに用いたエンドポイントの質に関する不確実性: 低〜中 8) ソース物質間のエンドポイントデータの類似性に関する不確実性: 低	本ケーススタディはOECDモグラフィとして公表されているが、あくまで例示であり、OECD加盟国全体で規制目的のために本方法論が直接受け入れられるわけではない。また、執筆した加盟国による公式な規制決定と解釈されるべきではない。	

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)

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要 (添付資料1の内容を貼ったもの)	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性	
13	324	EU-ToxRiskプロジェクト	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	環境化学物質	2-エチル酪酸 (2-EBA)	反復投与毒性	リードアクリスを活用し、肝臓の脂肪変性に基づき90日間反復投与毒性 (OECD TG408) における評価を実施すること	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リスと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) 及びバルブロン酸 (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リス仮説が導かれた。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 <i>in silico</i> 及び <i>in vitro</i> 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 <i>in vitro</i> 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 <i>in vitro</i> エンドポイントの10パーセント値を用いて定量的 <i>in vitro-in vivo</i> 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、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。	<2-EBAの特性> ・2位に分岐した脂肪族側鎖をもつ脂肪族カルボン酸 ・2つの類似物質の <i>in vivo</i> 毒性試験の結果から、肝毒性、特に肝臓における脂肪変性が懸念されるとするリードアクリス仮説が導かれた  <NAMsが活用されたポイント> ・脂肪変性のAOPネットワークのMIEの活性化指標 (Nrf2, PXR, PPAR- $\alpha$ / $\gamma$ , AhR, LXR) をハイスループットアッセイにより測定し、酸化ストレスや脂質代謝等の初期異常を評価 ・AOPネットワークのKey event (KE) を異なる細胞系で評価 ・全アッセイの細胞毒性値 (細胞毒性) を評価 ・物質が細胞に与える広範な影響を評価するため、AOPと直接関連しない項目 (p21等) をハイスループットアッセイ (HTS) により測定し、受容体活性やシグナル伝達を評価 ・一般的な細胞メカニズムの評価 (GSH 枯渇、リン脂質蓄積、ミトコンドリアスーパーオキシド産生、ミトコンドリア膜電位) ・PBKモデルによる、ヒト及びラットの経口相当用量の導出 (PBKモデル構築はWHOのPBKガイダンス (WHO publication Harmonisation Project Document No. 9. CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC MODELS IN RISK ASSESSMENT) に基づき実施)	<2-EBAの特性> ・2位に分岐した脂肪族側鎖をもつ脂肪族カルボン酸 ・2つの類似物質の <i>in vivo</i> 毒性試験の結果から、肝毒性、特に肝臓における脂肪変性が懸念されるとするリードアクリス仮説が導かれた  <NAMsが活用されたポイント> ・脂肪変性のAOPネットワークのMIEの活性化指標 (Nrf2, PXR, PPAR- $\alpha$ / $\gamma$ , AhR, LXR) をハイスループットアッセイにより測定し、酸化ストレスや脂質代謝等の初期異常を評価 ・AOPネットワークのKey event (KE) を異なる細胞系で評価 ・全アッセイの細胞毒性値 (細胞毒性) を評価 ・物質が細胞に与える広範な影響を評価するため、AOPと直接関連しない項目 (p21等) をハイスループットアッセイ (HTS) により測定し、受容体活性やシグナル伝達を評価 ・一般的な細胞メカニズムの評価 (GSH 枯渇、リン脂質蓄積、ミトコンドリアスーパーオキシド産生、ミトコンドリア膜電位) ・PBKモデルによる、ヒト及びラットの経口相当用量の導出 (PBKモデル構築はWHOのPBKガイダンス (WHO publication Harmonisation Project Document No. 9. CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC MODELS IN RISK ASSESSMENT) に基づき実施)	<2-EBAの特性> ・2位に分岐した脂肪族側鎖をもつ脂肪族カルボン酸 ・2つの類似物質の <i>in vivo</i> 毒性試験の結果から、肝毒性、特に肝臓における脂肪変性が懸念されるとするリードアクリス仮説が導かれた  <NAMsが活用されたポイント> ・脂肪変性のAOPネットワークのMIEの活性化指標 (Nrf2, PXR, PPAR- $\alpha$ / $\gamma$ , AhR, LXR) をハイスループットアッセイにより測定し、酸化ストレスや脂質代謝等の初期異常を評価 ・AOPネットワークのKey event (KE) を異なる細胞系で評価 ・全アッセイの細胞毒性値 (細胞毒性) を評価 ・物質が細胞に与える広範な影響を評価するため、AOPと直接関連しない項目 (p21等) をハイスループットアッセイ (HTS) により測定し、受容体活性やシグナル伝達を評価 ・一般的な細胞メカニズムの評価 (GSH 枯渇、リン脂質蓄積、ミトコンドリアスーパーオキシド産生、ミトコンドリア膜電位) ・PBKモデルによる、ヒト及びラットの経口相当用量の導出 (PBKモデル構築はWHOのPBKガイダンス (WHO publication Harmonisation Project Document No. 9. CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF PHYSIOLOGICALLY BASED PHARMACOKINETIC MODELS IN RISK ASSESSMENT) に基づき実施)	<p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 構造類似性の評価</li> <li>標的物質に対する類似物質の構造類似性スコアは、RDKitのMACCSフィンガープリントとDICEアルゴリズムを用いて算出された。</li> <li>→</li> <li>・スコアは73% (バルブロン酸: VPA) ~92% (2-メチル酪酸: 2-MBA) の範囲</li> <li>・標的物質 (2-EBA) にもっとも類似する物質: 2-MBA (92%)、2-エチルペンタン酸 (2-EPA) (80%)</li> <li>・2-MBA及び2-EPAはどちらも反復投与による <i>in vivo</i> データはないため、反復投与による <i>in vivo</i> データのある2-エチルヘキサン酸 (2-EHA) (77%) 及び VPA (73%) まで選定範囲を拡張</li> <li>・最終的に9つのソース物質と1つ参照物質 (陰性対象) が選択された</li> </ul> <p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 物理化学的性質</li> <li>・標的物質、ソース物質及び参照物質 (全11物質) について、実測値及び予測値による物理化学的データを収集</li> <li>→</li> <li>・2-EBA: 水への溶解度 (20<math>^{\circ}</math> C, 18 g/L) が高く、log Pが1.68であることから、生体内脂肪組織に蓄積する可能性は低く、沸点、融点、蒸気圧、ヘンリー定数より揮発性物質であることが示された</li> <li>・類似物質: 全て水溶性かつ揮発性であることが示された</li> </ul> <p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ DNA及びタンパク質結合、皮膚及び眼刺激性に関するプロファイリング</li> <li>・DNA結合、タンパク質結合、皮膚及び眼刺激性について、OECD QSAR Toolboxを用いてプロファイリングを実施</li> <li>→</li> <li>・DNA及びタンパク質結合: 全ての物質において「最小限の反応性または反応性なし」が予想された</li> <li>・皮膚及び眼刺激性: 脂肪酸を含むため、全ての物質において皮膚刺激性がフラグ付けされた</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ MIE: レポーターアッセイを用いた脂肪変性のAOPネットワークに属するPPAR-<math>\alpha</math>、PPAR-<math>\gamma</math>、PXR、AhR、LXR、Nrf2の活性化評価</li> <li>・2つのレポーター遺伝子アッセイ (CALUXレポーターアッセイバッテリー及びHepG2細胞におけるストレス経路応答) を使用</li> <li>→</li> <li>・2-EBAはPPAR-<math>\alpha</math> のみを活性化し、PPAR-<math>\alpha</math> を介したAOPが活性化する可能性を示したが、その他のストレス応答/核内受容体については最高試験濃度100 <math>\mu</math>Mまで活性化しなかった</li> <li>・全体として、炭素鎖長が長いほど活性化される受容体・細胞ストレス経路の数が増える傾向が確認された</li> <li>・利用可能な <i>in vivo</i> 試験において肝毒性が認められなかったピバリン酸 (PVA) は <i>in vitro</i> で試験した最高用量までいかなる活性も示さなかった</li> </ul> <p><i>in silico</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ MIE: QSARモデルによる予測</li> <li>・MIEを予測するため4つの <i>in silico</i> QSARモデルを適用した。全モデルはToxCastのデータを用いて開発・検証された</li> <li>→</li> <li>・予測された全てのMIEにおいて、全物質の活性に差異は認められなかった</li> <li>・多くの結果がモデルの適用範囲外であったため、本ケーススタディの評価ではこれらのデータは使用しなかった</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 脂肪蓄積の評価</li> <li>・HepG2細胞において24時間及び72時間後の単回ばく露後、HepRG細胞において反復ばく露後 (10日間ばく露; 5回処理)、並びに3人の異なるドナーから新規分離した初代ヒト肝細胞 (PHH) において単回及び反復ばく露を実施した</li> <li>→</li> <li>・2-EBA: 3つのPHH系全てで不活性</li> <li>・その他の物質は、鎖長に依存した傾向を示し、2-EBAと比較して側鎖が長い化合物 (2-MHA以降) は脂質蓄積を誘導したが、最も類似した2-MPA及び2-MBAはいずれの <i>in vitro</i> 試験においても脂質蓄積を誘導しなかった</li> <li>・2-MHAはモデル間で不一致のため明確な結果は得られなかった</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ 細胞毒性評価</li> <li>PHH、3D HepaRG細胞、HepG2細胞、RPTEC細胞を使用して、細胞の生存率を測定</li> <li>→</li> <li>・2-EBAは、HepaRG細胞におけるATP測定を除き、全てのアッセイにおいて最高用量までほぼ無毒性であった</li> <li>・全体として、側鎖長が短くなるにつれて細胞毒性がやや低下する傾向にあった</li> <li>・VPA及び2-EHAは常にPVAと比較して毒性が高かった</li> </ul> <p><i>in vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ <i>In vitro</i> 試験による生物学的プロセスの全般的な攪乱の評価</li> <li>HepG2細胞において、グルタチオン (GSH) 枯渇、リン脂質蓄積、ミトコンドリアスーパーオキシド産生、ミトコンドリア膜電位 (MMP) といった4つの重要な細胞メカニズムを評価</li> <li>→</li> <li>・試験した物質のいずれもリン脂質蓄積を誘導しなかった</li> <li>・2-EBAはこれらの細胞メカニズムのうち、ミトコンドリア膜電位 (MMP) 変化のみを活性化した</li> <li>・2-EBAはPVAを除く他の物質より活性が低かった</li> <li>・VPAはGSH枯渇、MMP低下、ミトコンドリアスーパーオキシド生成を誘導した</li> <li>・2-EHAはミトコンドリアスーパーオキシド生成の誘導のみを示した</li> <li>・24時間後には、鎖長が増加するにつれて活性と効力が上昇する傾向が認められたが、この傾向は72時間ばく露後には明瞭でなくなった</li> </ul> <p>PBKモデル</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ ヒトIVIVE-PBKモデルの構築のための内因性肝クリアランス測定</li> <li><i>In vitro</i> で肝細胞によって代謝される能力を評価するため、プライマリーヒト肝細胞を用いたHurel低クリアランスアッセイを利用した。化合物を肝細胞とインキュベートし、時間経過に伴う化合物濃度の減少をLC/MS/MSで測定し、CLint (肝内在クリアランス) を算出した</li> <li>→</li> <li>・炭素鎖長が長い化合物ほどCLintが低かった</li> <li>・一部測定不可の化合物があり (2-PHP/2-EHP/2-PHA/Pivalic acid/2-MBA)、これらの化合物はVPAのCLintの半分であると仮定した</li> </ul>	不確実性評価: 有  本ケーススタディ全体の不確実性: 低  各評価ステップの不確実性 1) リードアクリス仮説: 低 2) 構造類似度の不確実性: 低 3) 物理化学的記述子の傾向: 低 4) トキシコキネティクス: 低 5) AOPの不確実性: 低 6) AOPに関連するMIEデータの傾向: 低 7) AOPに関連するKEの傾向: 低 8) その他の補足的な <i>in vitro</i> データ: 低 9) 類似物質の数: 低 (overall) 10) リードアクリスに用いられるエンドポイントデータの品質: 低 11) エンドポイントでエータの類似性 (ソース化合物間): 低 12) <i>In vitro</i> データと <i>in vivo</i> データの整合性 13) 仮説を正当化するために使用された全データの整合性と証拠の重み  Dempster Shafer理論 (DST) によれば、本ケーススタディで用いた <i>in vitro</i> アッセイから、2-EBAの脂質蓄積の欠如を100%の確実性で予測できることが示された。また、DSTにより、HepG2細胞及びCaluxレポーター遺伝子パネルによる脂質蓄積と細胞毒性の結果が、この結論を得るのに十分な情報を既に提供していることを明らかにした。	本ケーススタディはOECDモグラフィとして公表されているが、あくまで例示であり、OECD加盟国全体で規制目的のために本方法論が直接受け入れられるわけではない。また、執筆した加盟国による公式な規制決定と解釈されるべきではない。

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）

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要（添付資料1の内容を貼ったもの）	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性
										<p><i>in silico</i></p> <p>■ ヒトIVIVE-PBKモデル構築のための血漿タンパク結合率の予測 PBKモデル構築に使用するため、リードアクリル群の全11化合物について、血漿タンパク質結合を予測するため4種類の異なる <i>in silico</i> QSARモデルを適用した 1) Dragon software (v7.0.3, Kode s.r.l.) 2) CORAL software 3) 酸性化学物質を予測するためのローカルモデル 4) Lhasa 社が開発した商用モデル → ・全ての予測値は、それぞれのモデルの適用領域内に収まっていた。 ・予測された遊離分率は側炭素鎖長が短くなるにつれて増加したが、全モデル間で個々の値に差があったため、<i>in vitro</i>から<i>in vivo</i>への外挿には、4モデルすべてから得られた最小値と最大値を用いた</p>			
										<p>PBKモデル</p> <p>■ ヒトIVIVE-PBKモデル構築のためのヒトにおける経口等価線量を確立するためのリバースドシメトリー 生体動態モデリングを用いて、<i>in vitro</i>試験で使用する公称処理濃度に基づき実験的に決定された有効濃度に対応する細胞内濃度を予測した。定常状態の仮定を満たす試験システムでは、細胞構成と物理化学的特性を考慮した生体動態モデルを用いて、<i>in vitro</i>における細胞内濃度を予測した → これらのデータは、脂肪肝AOPとのエンドポイント関連性に基づき6つのカテゴリーに分類された。その後、ヒトIVIVE-PBKモデルを用いて、各カテゴリーにおける10パーセンタイル値及び90パーセンタイル値に対応する経口等価量 (OED) を算出した。VPAの場合と同様に最小予測値と最大予測値を使用し、その結果としてヒト等価量の範囲が得られた</p>			
										<p>PBKモデル</p> <p>■ ヒトIVIVE-PBKモデル構築のための <i>in vivo</i>における生物蓄積のモデリング <i>In vitro</i>試験で使用した単回/反復ばく露プロトコルが、90日間のばく露を伴う <i>in vivo</i>研究における反復ばく露シナリオを模倣できることを確認するため、2-EBAが反復ばく露後に <i>in vivo</i>での生物蓄積の可能性を有するか否かについてモデリングを実施 → ・シミュレーション結果では、この反復経口ばく露後、肝臓や血漿中に2-EBAが蓄積しないことが示された</p>			
										<p><i>in silico</i></p> <p>■ ヒトIVIVE-PBKモデル構築のための <i>in silico</i>による代謝物予測 知識ベースの代謝予測システム Meteor Nexusを用いて代謝物を予測し、既知情報が得られた4物質では予測結果との比較も行った。また、代謝経路の有無に基づきTanimoto 係数で類似度を評価し、代謝経路と鎖長の関係を解析した。 → ・既知情報の多いVPAを基準とすると、Meteor Nexusの予測は文献で確認された代謝物のほとんどが予測可能であった ・β-酸化は全てで予測されたが信頼度は低かった。これは最終代謝物が実際に観察されないことが理由であると考えられた ・2-EBAは生体内代謝は、短鎖類似物質である2-MBAと最も類似していることが示され、2-EHA及び2-EHPとも比較的類似していたが、鎖長と代謝変換数には一貫した傾向はなかった</p>			
										<p>PBKモデル</p> <p>■ ラットPBKモデルの構築 <i>In vitro</i>試験の濃度設定を行うために、VPAの既存データデータに基づき、<i>in vivo</i>ラット試験におけるLOELを遊離血漿中濃度に変換することでラットPBKモデルを構築した → ・構築された腸肝循環を有するモデルは、実験値と比較して、血漿濃度をかなり良く再現した ・腸肝循環を持たないモデルでは、投与後4時間の血漿中濃度をモデル化できなかった</p>			
										<p>PBKモデル</p> <p>■ ラットにおけるOEDの算出 慢性毒性のデータギャップを埋めるため、ラットPBKモデルを用いたQIVIVEが実施された。ラットにおける2-EBAのOED予測のためのPBKモデルを確立するため、PBKモデルでシミュレートされたヒト <i>in vivo</i>クリアランスをアロメトリ的にスケールアップ (指数=0.75を使用) し、ラットモデルに適用した。2-EBAはVPAと同程度の腸肝循環を受けると仮定し、ラットにおける2-EBAのPBKシミュレーションでは同じ腸肝循環パラメータを使用した →ラットにおける2-EBAのOED: 730~948.6 mg/kg/日と算出された ラットにおける反復投与のシミュレーションでは、VPA相当の腸肝循環を考慮しても、肝臓における2-EBAの蓄積は認められなかった</p>			
										<p>PBKモデル</p> <p>■ ヒトにおけるOEDの算出 ヒトPBKモデルを適用し、このカテゴリーに属する全物質の <i>in vitro</i>結果に基づきヒトOEDを導出した →2-EBAのヒトOED: 243~245.7 mg/kg/日。VPA及び2-EHAの予測値よりも100倍以上高かった</p>			

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)

No.	IATA Assessment No.	実施者	タイトル	評価目的 対象物質 の区分	対象物質	毒性エンドポイント	詳細な評価目的	概要 (添付資料1の内容を貼ったもの)	評価方法等	NAMsの種類	使用されたNAMsの種類及びNAMsの結果	不確実性評価	規制当局の受入性						
14	323	Kao Corporation	Case study on the use of integrated approaches for testing and assessment to inform read-across of p-alkylphenols: repeated-dose toxicity	環境化学物質	p-アルキルフェノール類	反復投与毒性	リードアクロスを活用してp-アルキルフェノール類の反復投与毒性評価におけるデータギャップを補完すること	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、 <i>in silico</i> 及び <i>in vitro</i> を組み合わせた方法が採用された。 <i>In silico</i> 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、 <i>in vitro</i> 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。 <i>In vitro</i> 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、 <i>in silico</i> ・ <i>in vitro</i> ・ <i>in vivo</i> 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 <i>in vitro</i> 試験やNAMsを組み合わせる必要がある。	<p-アルキルフェノール類の特性> ・p-アルキルフェノール類の肝臓における病理組織学的変化として、肝細胞肥大、腫脹、過形成、変性、壊死等が報告されている。 ・p-アルキルフェノール類の作用機序として、体内に吸収されたp-アルキルフェノール類が肝臓のシトクロムP450によって酸化され、反応性代謝物キノキシメチド (QM) を形成する。この反応性代謝物はグルタチオン (GSH) やタンパク質のチオール基と結合することで細胞内のGSH枯渇や酸化ストレスといった一連のkey event (KE) を誘発し、最終的に肝細胞の肥大、変性、壊死といった肝毒性の発現に至るとされている。 ・アルキルフェノール類の肝臓以外の臓器への毒性作用は、最大投与量のような高い濃度で発現することが多い。  <NAMsが活用されたポイント> ・類似物質のグループ化と優先順位付けのため、警告構造の有無確認、ADMEの予測を実施 ・MIE評価として、QMとGSHとの結合能の評価 ・ <i>In vivo</i> 肝障害とdGSH付加体生成量との相関評価 ・カテゴリーメンバー [QM生成群] 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) 2,4-Dimethyl-6-tert-butylphenol (BDMP) 2,4,6-Trimethylphenol (TMP) 2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol (E-BHT) 2,6-Di-tert-butyl-4-propylphenol 2,6-Dimethyl-4-propylphenol 2,6-Di-tert-butyl-4-butylphenol 2,6-Di-tert-butyl-4-pentylphenol 2,6-Di-tert-butyl-4-hexylphenol 2,6-Di-tert-butyl-4-octylphenol 2,6-Di-tert-butyl-4-isopropylphenol (I-BHT) 2,6-Di-tert-butyl-4-sec-butylphenol 2,6-Di-tert-butyl-4-(2-ethylhexyl)phenol 4-(Butan-2-yl)-2-tert-butyl-6-methylphenol [QM非生成群] 2,4,6-Tri-tert-butylphenol 2,4-Di-tert-butyl-6-methylphenol 2,6-Dimethyl-4-tert-butylphenol 2,6-Dimethyl-4-(2-methylbutan-2-yl)phenol 2,6-Di-tert-butyl-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-2-(1,1-dimethylethyl)-6-methylphenol	<p-アルキルフェノール類の特性> ・HESS (Hazard Evaluation Support System) により、p-アルキルフェノール類は肝毒性カテゴリー (Rank A) と予測された ・Derek Nexus v.6.0.1による予測で、過半数のカテゴリーメンバーにおいて肝毒性の警告構造がProbable (可能性が高い) またはPlausible (妥当である) と予測された。その他、ミトコンドリア毒性に関して多くのカテゴリーメンバーでEquivocal (疑わしい) という判定結果が得られた ・OECD QSAR Toolboxによる肝毒性に関する予測で、陰性または適用範囲外 (out of rules) と判定された ・CASE Ultra v.1.7.0.5による予測で、肝機能検査 (LIVER_FTTEST) はほとんどのメンバーにおいて、血中の肝酵素放出を示す項目で陽性であった。その他の肝疾患: 胆管障害、胆汁うっ滞、急性肝損傷等の項目については、多くが陰性またはInconclusive (結論できない) と判定された	<i>in silico</i> ■肝毒性やその他の毒性に関する警告構造の有無確認 ・HESS (Hazard Evaluation Support System) により、p-アルキルフェノール類は肝毒性カテゴリー (Rank A) と予測された ・Derek Nexus v.6.0.1による予測で、過半数のカテゴリーメンバーにおいて肝毒性の警告構造がProbable (可能性が高い) またはPlausible (妥当である) と予測された。その他、ミトコンドリア毒性に関して多くのカテゴリーメンバーでEquivocal (疑わしい) という判定結果が得られた ・OECD QSAR Toolboxによる肝毒性に関する予測で、陰性または適用範囲外 (out of rules) と判定された ・CASE Ultra v.1.7.0.5による予測で、肝機能検査 (LIVER_FTTEST) はほとんどのメンバーにおいて、血中の肝酵素放出を示す項目で陽性であった。その他の肝疾患: 胆管障害、胆汁うっ滞、急性肝損傷等の項目については、多くが陰性またはInconclusive (結論できない) と判定された	<i>in silico</i> ■代謝シミュレーション ・OECD QSAR Toolboxによる予測で、第4位に直鎖アルキル基を持つ化合物についてはキノキシメチド (QM) の形成が予測されたが、分岐構造を持つ場合は一部の例外を除きQMが形成されないことが示された ・HESSでも QSAR Toolboxと同様に代謝経路を予測し、各メンバーにおけるQM形成の可能性が確認された	<i>in silico</i> ■サブグループの定義 (リードアクロス) QM生成の有無に加え、2,6位の置換基の類似性に基づき、カテゴリーメンバーを以下の3つのサブグループに分類して評価した Sub-group 1: 2,6-ジ-tert-ブチルフェノール類 Sub-group 2: 2-メチル-6-tert-ブチルフェノール類 Sub-group 3: 2,6-ジメチルフェノール類	<i>in silico</i> ■経口吸収率 ・OECD QSAR Toolbox及びCASE Ultra CASE Ultra v.1.6.2.1によるバイオアベイラビリティ又は腸管吸収率に関する予測を実施し、全カテゴリーメンバー間で吸収性に大きな差異がないことが示された	<i>in chemico</i> ■dGSHトラッピングアッセイ ・QMを生成する物質群 (BHT, BDMP、2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol及び2,6-Di-tert-butyl-4-sec-butylphenol) は、非生成群 (2,4,6-Tri-tert-butylphenol及び2,4-Di-tert-butyl-6-methylphenol) より有意にdGSH付加体を生成した ・4位のアルキル鎖長の増加や分岐による立体障害は付加体生成を減少させる (反応性が低下) 傾向が確認された	<i>in vitro</i> ■ラット初代培養肝細胞を用いた細胞生存試験 ・高濃度で低下する傾向はあったが、BDMPを除いて、試験した化合物間に明確な差は認められなかった ・BDMPが最も強い細胞毒性を示した	リードア クロス ■既存の <i>in vivo</i> 反復投与毒性データの統合 ソース物質 (BHT, BDMP, TMP、2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenol、2,6-Di-tert-butyl-4-sec-butylphenol、2,4,6-Tri-tert-butylphenol) の動物試験結果 (NOAEL) を統合して、標的物質のNOAEL値を導出した →[QM生成群] サブグループ1 (2,6-ジ-tert-ブチルフェノール類) では、最も低い値である2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenolのNOAEL 15 mg/kg/dayが適用された サブグループ2 (2-メチル-6-tert-ブチルフェノール類) では、BDMPが重篤な肝細胞壊死を引き起こした用量に基づき、NOAEL 6 mg/kg/dayが適用された サブグループ3 (2,6-ジメチルフェノール類) では、TMPが動物試験において肝毒性を示さなかったため、NOAELは適用されなかった [QM非生成群]では、作用機序が十分に解明されていないため、今回のリードアクロスではNOAELを算出しないと結論された 最終的に、最も保守的なシナリオとしてワーストケースを採用し、2,6-Di-tert-butyl-4-ethylphenolのNOAEL (15 mg/kg/day) を標的物質の予測値として適用すると結論された	不確実性評価: 有 リードアクロスの不確実性: 中 第4位の構造が毒性に影響することは <i>in vitro</i> や既存データから予測可能であったが、最終的には不確実性を考慮し、ソース物質の中で最も厳しい値を適用している。	OECD加盟国全体で規制目的の直接的な方法論の採用を意味するものではない。さらに、本ケーススタディは、執筆加盟国による公式な規制決定として解釈されるべきではない。