

NAMsに関する国際動向

NAMs: New approach methods / New approach methodologies

一般財団法人化学物質評価研究機構
赤堀 有美

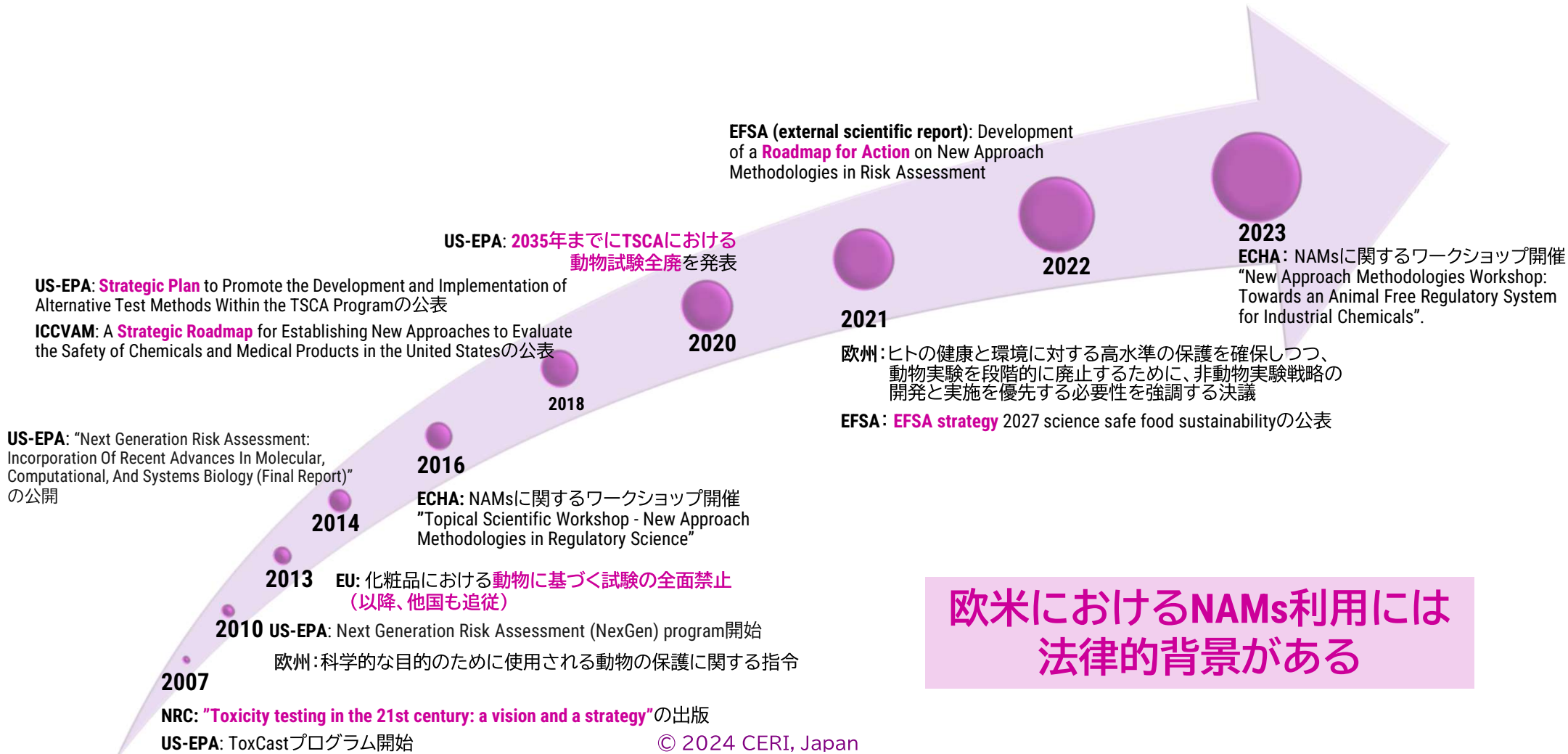
概要

[1] はじめに

- **NAMsの背景**
- **NAMsの定義**
- **NAMsに含まれ得る技術**

[2] NAMsを活用した評価について

NAMsの背景



欧米におけるNAMs利用には
法的背景がある

NAMsの定義(意識)

英語表現は参考資料を参照

IATA: Integrated Approach to Testing and Assessment

NAMsについて国際的に合意された定義はない (ECHA, 2023)

ECHA (2023) Report on the European Chemicals Agency's "New Approach Methodologies Workshop: Towards an Animal Free Regulatory System for Industrial Chemicals" 31 May - 1 June 2023, Helsinki, Finland

NAMsは、大雑把に言えば、「動物試験を回避し、従来の動物試験による評価より良い評価をするためのあらゆる方法」

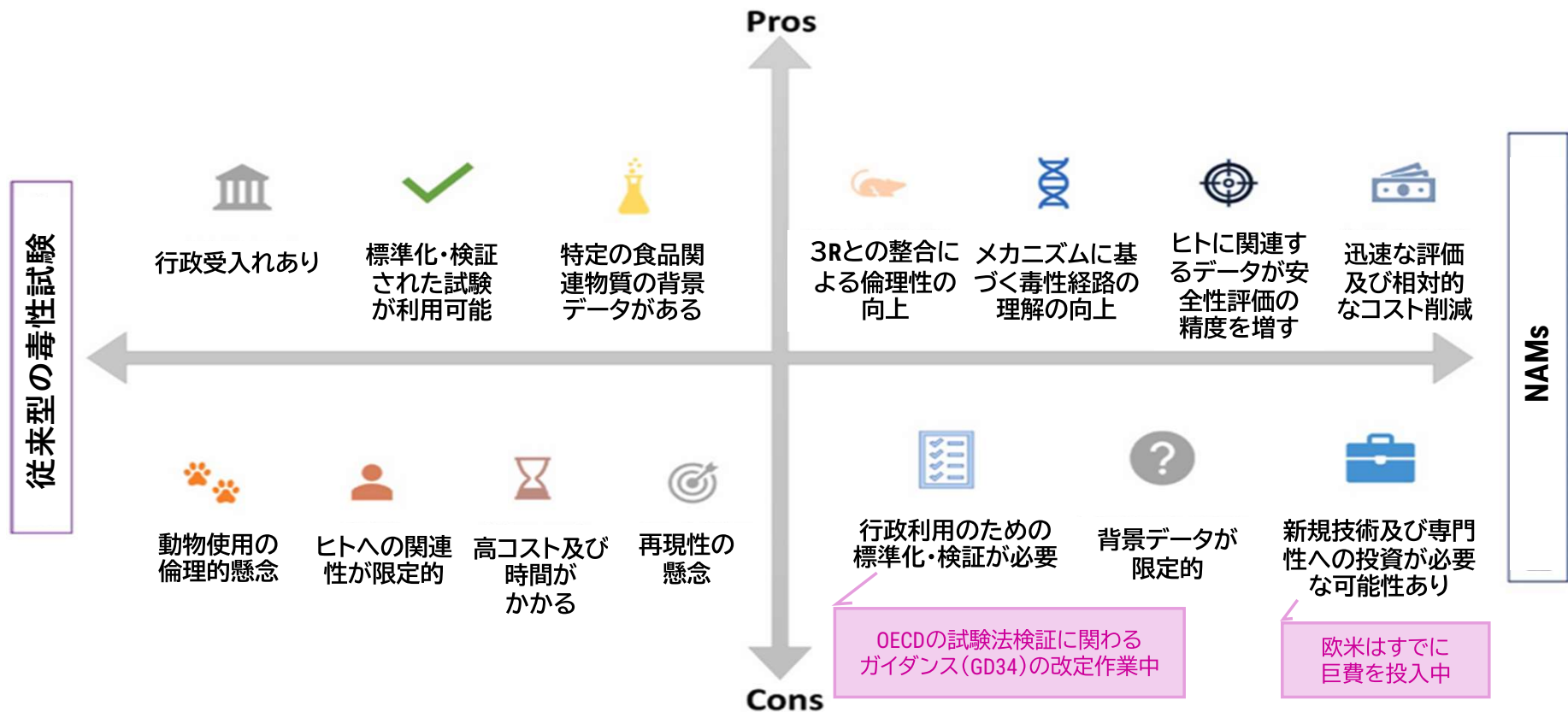
<p>ECHA 2016, Topical Scientific Workshop</p>	<p>NAMは、動物実験の代替(代替、削減、改良)となる毒性学的手法や、ばく露データなどの他の情報源を含むすべての手法を包括する用語であり、<i>in silico</i>アプローチ、<i>in chemico</i>、<i>in vitro</i>アッセイが含まれる。</p>
<p>US EPA 2018, TSCA Strategic Plan</p>	<p>NAMは、試験動物の使用を回避し、化学物質の有害性及びリスクの評価に関する情報提供のために使用できる、あらゆる技術、方法論、アプローチ(計算/<i>in silico</i>モデル(すなわち、QSAR)を含む)、またはそれらの組み合わせに対する広範な記述的参照として受け入れられている。TSCAの文脈では、NAMは、脊椎動物試験を削減、改良、代替するための代替試験方法および戦略を包含する。</p>
<p>ICCVAM 2018, Strategic roadmap</p>	<p>NAMは、化学物質の有害性及びリスクの評価に関する情報提供のために使用できる代替試験法又は手法の広範な記述的参照として受け入れられている。このような新しい手法には、IATA、データ解釈のための定義された手法、試験法の性能に基づく評価などが含まれる。この文脈では、代替試験法には、動物を用いない試験系や系統的に下位の生物種、特定の試験に必要な動物数削減方法、あるいは痛みや苦痛を軽減または回避するために動物使用を改良する方法などが含まれる。</p>
<p>US EPA 2021, New approach methods workplan</p>	<p>NAMsとは、動物実験の使用を回避し、化学物質の有害性とリスク評価に関する情報を提供できる技術、方法論、アプローチ、またはその組み合わせと定義される。</p>
<p>EFSA 2022, Development of a Roadmap for Action on NAMs in Risk Assessment</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 新しいアプローチ方法論(NAM)とは、ヒトの有害性評価およびリスク評価において、<u>毒性学的情報を提供するために使用できるあらゆる新しいアプローチ</u>を指す。これらの新しいアプローチには、試験と評価の統合的アプローチ(IATA)、データ解釈のための定義されたアプローチ、試験法の性能に基づく評価などが含まれる。 ● 用語集での説明: 新たなアプローチ方法論とは、ハザードやリスクの構成要素を予測するための、<u>動物を用いないアプローチ(<i>in silico</i>または<i>in vitro</i>)</u>である。
<p>ECHA 2023, New Approach Methodologies Workshop: Towards an Animal Free Regulatory System for Industrial Chemicals</p>	<p>NAMは、一般的に動物実験を伴う従来の毒性試験法の代替法である。これらの代替法は、生物学的に複雑なエンドポイントに対する機序情報を提供することにより、化学物質のリスクや有害性の予測や評価に有用である。これには、<i>in vitro</i>、<i>in chemico</i>法、<i>in silico</i>計算モデルなどが含まれ、これらは単独で、あるいは他の方法と組み合わせて用いることができ、より迅速で、より安価で、より少ない動物数で実施できる可能性がある。</p>

欧州委員会からの求めに対応して、

NAMSの定義について、Horizon 2020の3つの研究プロジェクトのコンソーシアムであるASPISが検討をしている

© 2024 CERi, Japan

従来型評価とNAMs利用評価のPros/Cons



Manful et al (2023) のFig. 3. Pros and cons of the traditional toxicology and New Approach Methodologiesより抜粋・改変

Manful et al. (2023) New Approach Methodologies (NAMs) for safety testing of complex food matrices: A review of status, considerations, and regulatory adoption. Trends in Food Science & Technology, 142: 104191

NAMsに含まれる技術の例

NAMs { データ生成に関するもの
 「生成されたデータ」のみでは 評価に利用できないため データ利用のための方法論等

Toxicodynamics

化学物質により与えられる影響

- *in vitro*ガイドライン試験
- Omics, including genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics...
- TTC
- Quantitative AOP (model)

- Mode of action
- Mechanism of action
- AOP

- QSAR/SAR
- Machine learning and AI
- Read across
- Cell-based assay
- Reporter gene assays
- High throughput Screening (HTS)
- High content Imaging/Screening (HCI/HCS)
- 3D-Organoids
- Micro-physiological systems (MPS)
- Organ-on-a-chip / Human-on-a-Chip
- 代替生物を用いた試験

Toxicokinetics

化学物質が生体から受ける影響

- High Throughput Toxicokinetics (HTTK)
- ADME model
- Physiologically-based kinetic (PBK) model
- Reverse Toxicokinetics (RTK)
- (Quantitative) *In vitro* to *in vivo* extrapolation ((Q)IVIVE)

Weight of Evidence (WoE) / Uncertainty analysis /

Integrated Testing Strategy (ITS) / Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) / Defined approach (DA)

有害性評価 / リスク評価

© 2024 CERi, Japan

Magurany *et al.* (2023) A pragmatic framework for the application of new approach methodologies in one health toxicological risk assessment. *Toxicological Sciences*, 192(2), 155-177.
 Schmeisser *et al.* (2023) New approach methodologies in human regulatory toxicology - Not if, but how and when! *Environment International*, 178, 108082.
 OECD(2020) GD329. Overview of Concepts and Available Guidance related to Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA).

OECDにおけるDefined approach(DA)の例

■ Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation (2021)

*in silico*や*in vitro*等の結果を組合わせて皮膚感作性を予測, 組合せの種類によってはGHSにおける細区分1A/1Bも可能

■ Test Guideline No. 467: Defined Approaches for Serious Eye Damage and Eye Irritation (2022)

■ Guidance Document No. 377: Initial Recommendations on Evaluation of Data from the Developmental Neurotoxicity (DNT) *In-Vitro* Testing Battery (2023) …DNT *in vitro* testing batteryはまだガイドライン化されていない

様々な*in vitro*(及び*in silico*)の結果を、IVIVEやPBKモデルを適用して評価

上記以外にも、甲状腺機能阻害や非遺伝毒性型発がん性に関するDAがOECDの枠組みで検討されている。

OECDガイドラインになると、Mutual Acceptance of Data (MAD) (データの相互受理)の対象になる
⇒データが提出された場合、食品安全委員会でも評価が必要になる可能性がある

APCRA*における活動

*Accelerating the Pace of Chemical Risk Assessment

<https://apcra.net/#/>

■ APCRAの目標:

- NAMsの科学的利用の現状に関する共通理解の形成
- NAMsの性能の現実的な基準に対する理解の深化
- 情報共有を強化する仕組みの決定
- 相互に関心のあるケーススタディの実施と共有
- 規制におけるNAMsの利用に対する障壁、限界に戦略的に対処するための機関間の連携強化

■ 2016年から活動

■ **参加国等:** 米国、欧州(ECHA/EFSA)、カナダ

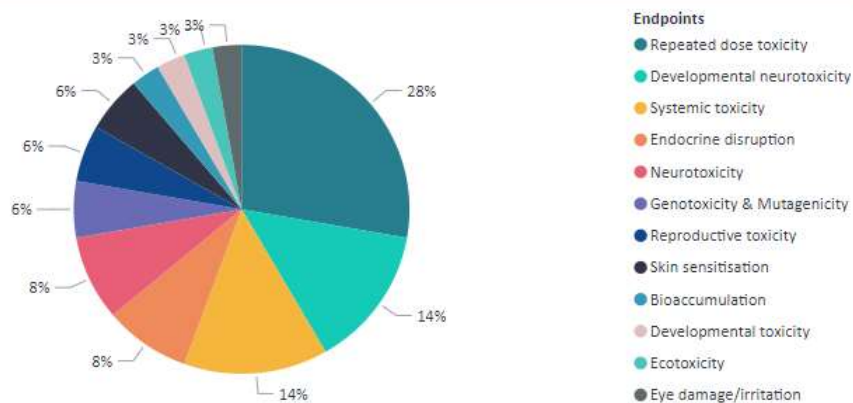
■ **13のケーススタディを公開**

OECDにおける活動

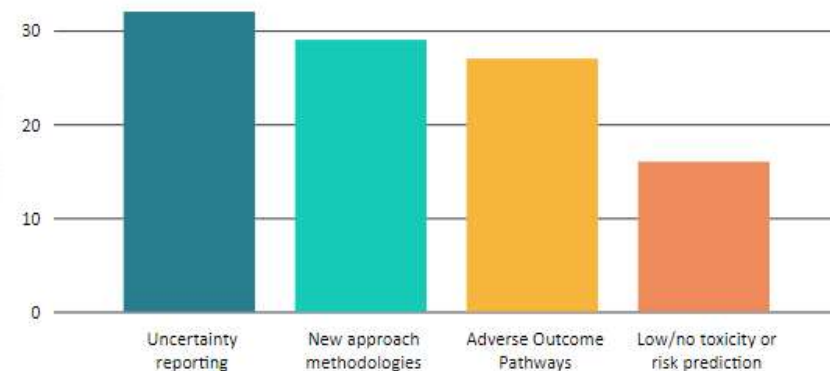
■ OECD IATA Case Studies Project (2014年から)

OECD IATA Case Studies Projectにおけるケーススタディ

Percentage of case studies by endpoints



Number of case studies by IATA topics



<https://www.oecd.org/en/topics/sub-issues/assessment-of-chemicals/integrated-approaches-to-testing-and-assessment.html>

ケーススタディ及びそのレビュー結果を踏まえ、
ガイダンスが必要な項目の抽出や各種報告様式の検討等が進められている

APCRAやOECD IATA Case Studies Projectの活動を通じて

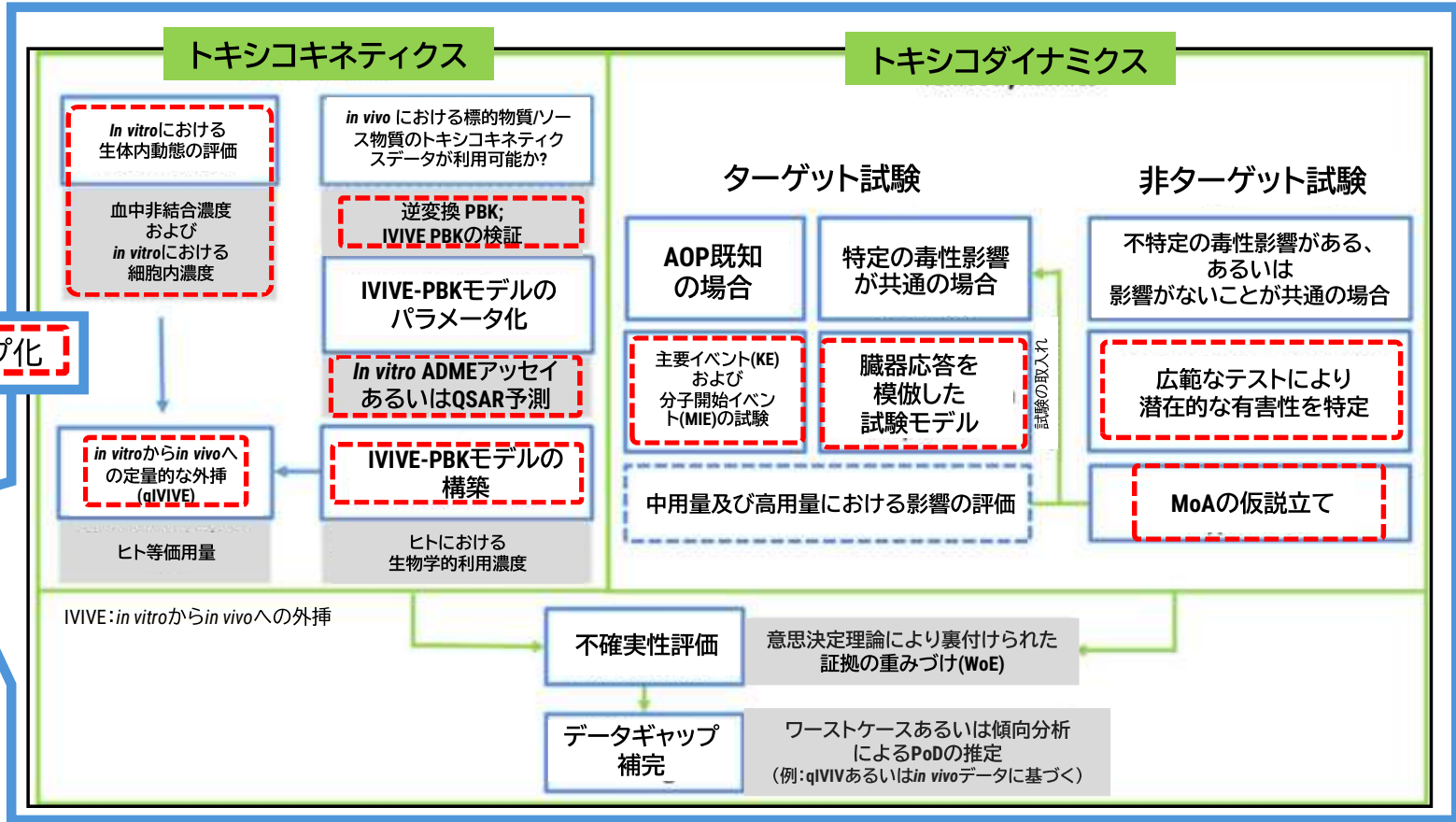
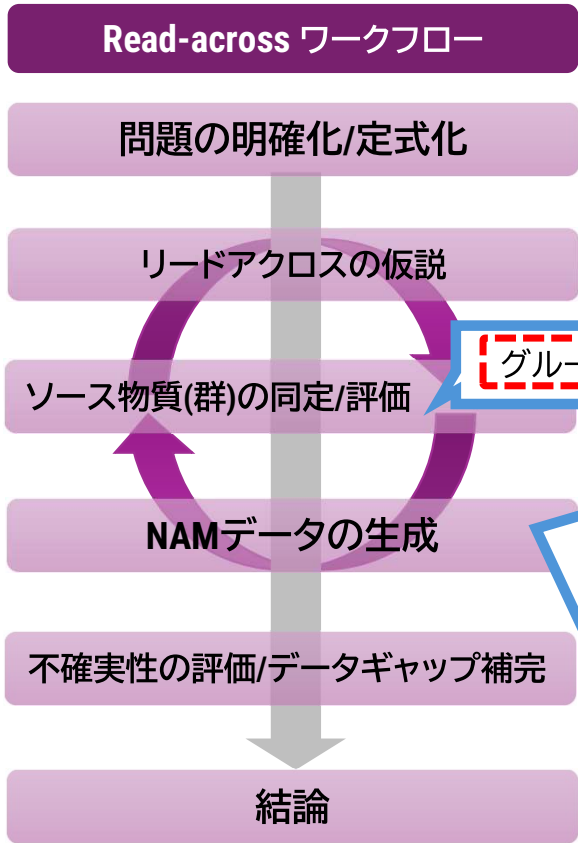
NAMsを用いた評価について、何ができるか、どうすればよいか等
経験を蓄積し、課題特定や知見整理が行われているところ

IATA Case StudiesにおけるNAMsの活用例

Read-acrossにおけるNAMsの活用

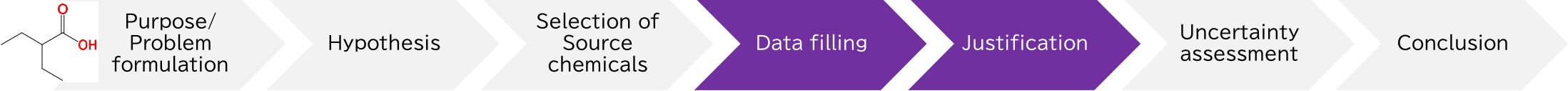
(Read-acrossに含まれるNAMsの活用は他の目的にも利用できる)

NAMsの活用場面の例

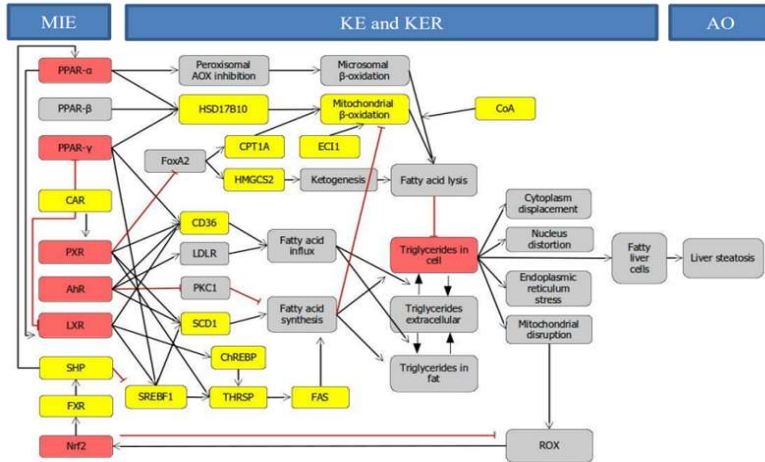


Escher et al. (2019) Towards grouping concepts based on new approach methodologies in chemical hazard assessment: the read-across approach of the EU-ToxRisk project. Archives of Toxicology (2019) 93:3643–3667.

2-Ethylbutyric acid (EBA)の肝毒性評価 read-across事例



NAMsによるHazard Characterization



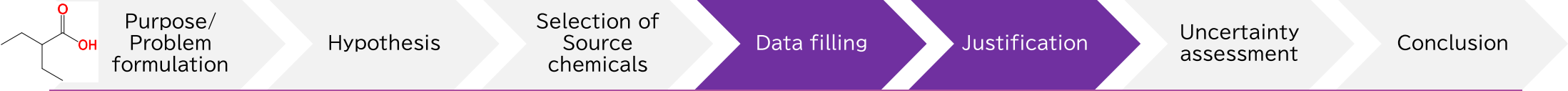
- *In vivo*で脂肪変性を示したSource-4&5は、MIEだけでなく、HepaRG及びHepG2で脂肪蓄積を示す。
 - Target (EBA) はMIEのひとつであるPPARαを活性化したが、HepaRGやHepG2において脂肪蓄積はなかった。
- ⇒Targetのヒト経口相当用量の導出は細胞毒性の濃度に基づき実施された

既存の*in vivo*データあり

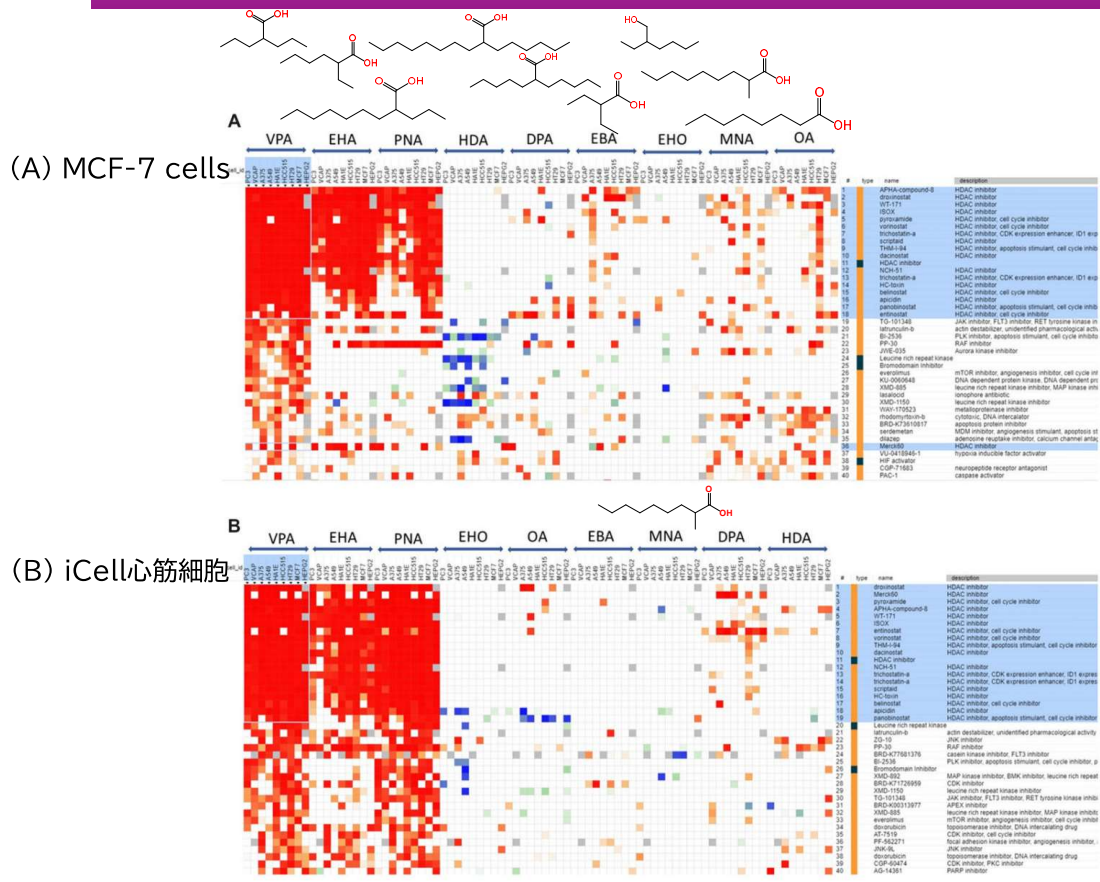
OECD (2020) GD324
一部のデータを抜粋、加工

細胞系の例	Source-1 2-Propylheptanoic acid PHP	Source-2 2-Ethylheptanoic Acid EHP	Source-3 2-Propylhexanoic acid PHA	Source-4 2-Ethylhexanoic Acid EHA	Source-5 Valproic Acid VPA	Source-6 2-Ethylpentanoic Acid EPA	Source-7 2-Methylhexanoic Acid MHA	Source-8 2-Methylpentanoic Acid MPA	target 2-Ethylbutyric acid EBA	Source-9 2-Methylbutyric Acid MBA	negative Pivalic Acid PVA
Resazurin reduction POD	4000	4000	8000	8000	>8000	4000	8000	>8000	>8000	8000	>8000
supernatant lactate POD	8000	8000	>8000	>8000	>8000	>8000	>8000	>8000	8000	>8000	>8000
anti-PR CALUX	-3.6	-3.5	-3.9	-3	-3.1	>-3	>-3	>-3	>-3	>-3	>-3
PXR CALUX	-4.3	-4	-4	-3.6	-4.1	-3.5	>-3	>-3	>-3	>-3	>-3
PPARα CALUX	-4.5	-4.5	-4	-4	-4	-3.9	-4.5	-3.5	-3.5	>-3	>-3
PPARδ CALUX	-3	-3.1	>-3	>-3	>-3	>-3	>-3	>-3	>-3	>-3	>-3
Nrf2 CALUX	-4	-3.7	-3	-3	>-3	-3.4	>-3	>-3	>-3	-3.1	>-3
Steatosis 3D HepaRG	834	2330	2350	1270	1570	5290	3820	>8000	>8000	>8000	>8000(665(NS))
ATP 3D HepaRG	109	601	320	409	209	558	568	1600	579	3000	4720
GSH MEC/IC20 HepG2	7383	1311	>8000	>8000	218	6235	>8000	>8000	>8000	>8000	>8000
MMP IC50 HepG2	150	803	>8000	>8000	no data available	>8000	>8000	>8000	>8000	>8000	>8000
Lipid accumulation MEC/EC20 HepG2	83	1598	810	1203	69	>8000	>8000	>8000	>8000	>8000	>8000

2-Ethylbutyric acid (EBA)の肝毒性評価 read-across事例



Omicsデータを用いたグルーピング



Wu *et al.* (2023) Structure-activity relationship read-across and transcriptomics for branched carboxylic acids. *Toxicological Sciences*, 2023, 191(2), 343–356

- L1000プラットフォームを用いて、3つの濃度の化合物へのばく露6時間後に4細胞系 (MCF7、iCell心筋細胞、HepG2及びA549)で評価。

Fig. 2の注釈を一部抜粋(意訳)
500 μMのVPAをばく露した際のCMap分析のヒートマップ。上位50のUp/down遺伝子を表示。(左図の他、HepG2及びA549細胞でも評価)

Red indicates strong positive correlation with the treatment or mode of action listed in the column at right, blue indicates a negative correlation, with different color shades indicating the strength of correlation. The top 40 ranked connections are shown

- 4細胞系においてEHA(2-ethylhexanoic acid)およびPNA(2-propylnonanoic acid)が、VPA(Valproic acid= 2-Propylpentanoic acid)と同様の遺伝子発現プロファイル。
- EHA、PNA及びVPAとは異なる遺伝子プロファイルの分岐カルボン酸は、read acrossグループが異なる。

EFSAにおけるNAMs活用関連プロジェクト等の例

Cattaneo et al. (2023) Implementing New Approach Methodologies (NAMs) in food safety assessments: Strategic objectives and actions taken by the European Food Safety Authority. Trends in Food Science & Technology. 133, 277-290.

研究領域

1. Toxicodynamics(TD) : *in silico*ツール、*in vitro*メカニズムデータ、マルチオミクスデータ、HTS、HCSを活用し、Mode of Actionを同定し、AOPに情報を提供する
2. Toxicokinetics(TK) : 既存の化学データや内部用量のモデルを使用し、*in silico*ツール、TKTDモデリング、QIVIVEなどを適用して、例えば、TK-plateに実装する；
3. 代謝やバイオモニタリングにおけるヒトの個体間差を含む、疫学情報、職業または環境でのヒトばく露を用いたばく露評価に情報を提供するためにエクスポソームデータを活用する；
4. 影響を受けやすいヒト集団を特定する、メカニズムに基づくリスク評価において、有害性評価とばく露促進因子を統合することによるリスク評価のパラダイムシフト；
5. NAMデータの導入とリスク評価文書作成を容易にするためのテンプレート、ツール

プロジェクト

- NAMsの使用に関するEFSAパイロット・プロジェクト
 - 農薬テブフェンピラドの神経毒性の可能性の評価 (Alimohammadi et al., 2023; Henri et al., 2023)
 - ナノファイバーの有害性評価(GP/EFSA/SCER/2020/04)
 - 汚染物質PFASの免疫毒性調査(OC/EFSA/SCER/2021/13)
 - 飼料添加物としてのエッセンシャルオイルに関する種間代謝差異の調査(OC/EFSA/SCER/2021/14)
- AI4NAMs : 化学物質リスク評価のためにNAMsを通じて得られたデータの抽出と統合のための人工知能(AI)の利用探求に関するプロジェクト
- AOP開発/トランスクリプトミクスプロジェクト

最後に

- 欧米におけるNAMs利用には、法的背景あり！
⇒ 日本と対応すべき背景が異なっていることは、認識すべき
- 欧米と日本では評価に割ける人員・人材・規模(Capacity)が異なる
- 一方、NAMsはOECD(テスト)ガイドラインに取り込まれつつあり、
今後もその流れは続く(例:DNT、非変異発がん)
- NAMsデータが評価のために提出される可能性がある？(例:汚染物質)
⇒ NAMsを活用した評価は不可避？

現在、欧米でもCase Studiesを積み重ねながら、
行政側におけるNAMs利用経験を蓄積し、
NAMsを活用する環境整備(方法論、評価項目、報告様式等の整備)が行われている段階

参考資料: NAMsの定義 (英語)

ECHA 2016,
Topical Scientific Workshop

NAM as an overarching term for all methods including toxicological methods that serve as (replacement, reduction or refinement) alternatives to animal testing, as well other sources of information such as exposure data. Thus, NAMs may include in silico approaches, in chemico and in vitro assays.

US EPA 2018,
TSCA Strategic Plan

NAM has been adopted as a broadly descriptive reference to any technology, methodology, approach (including computational/in silico models (i.e., QSARs)), or combination thereof that can be used to provide information on chemical hazard and risk assessment that avoids the use of intact animals. In the context of TSCA, NAM encompasses any alternative test methods and strategies to reduce, refine or replace vertebrate animal testing.

ICCVAM 2018,
Strategic roadmap

NAM has been adopted as a broadly descriptive reference to any alternative test method or methodology that can be used to provide information on chemical hazard and risk assessment. These new approaches include IATAs, defined approaches for data interpretation, and performance-based evaluation of test methods. In this context, alternative test methods include non-animal test systems and phylogenetically lower species, methods that reduce the number of animals required for a specific test or refine animal use to lessen or avoid pain and distress.

US EPA 2021,
New approach methods workplan

NAMs are defined as any technology, methodology, approach, or combination that can provide information on chemical hazard and risk assessment to avoid the use of animal testing.

EFSA 2022,
Development of a Roadmap for Action
on NAMs in Risk Assessment

- the term new approach methodologies (NAM) refers to any new approach which can be used to provide toxicological information in the context of human hazard and risk assessments. These new approaches include integrated approaches to testing and assessment (IATAs), defined approaches for data interpretation, and performance-based evaluation of test methods.
- From glossary: New approach methodologies are any non-animal-based approaches (in silico or in vitro) to predict components of hazard or risk.

ECHA 2023,
New Approach Methodologies Workshop:
Towards an Animal Free Regulatory System for
Industrial Chemicals

NAMs denote alternatives to traditional toxicity methods that typically involve animal testing. These alternatives are useful for predicting and assessing chemical risks and hazards, by providing mechanistic information for biologically complex endpoints. They include, e.g. in vitro, in chemico methods and in silico computational models, which may be used alone or in combination with other methods and have the potential to be quicker, cheaper and use less animals.