

原文 2016年12月19日公開

仮訳 2023年6月12日公開

化学品委員会と化学品農薬及びバイオテクノロジーに関する作業部会の合同会合

Integrated Approach to Testing and Assessment(IATA)の開発における有害性発現経路
(Adverse Outcome Pathway(AOP))の利用に関するガイダンス文書

試験と評価に関するシリーズ

No. 260

仮訳：正確には原文をあたってください。

原著は、OECD より英語版で公開された *Guidance Document for the Use of Adverse Outcome Pathways in Developing Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)*, OECD Series on Testing and Assessment, No. 260 © OECD 2017

(<https://doi.org/10.1787/44bb06c1-en>) です。

本翻訳は、OECD により作成されたものではなく、OECD の公式な翻訳ではありません。翻訳の品質及び原著との整合性については NITE が単独で責任を負うものです。原文と本翻訳に相違がある場合は、原文を優先してください。

日本語訳

© 2022 National Institute of Technology and Evaluation (NITE)

OECD 保健安全に関する出版物
試験と評価に関するシリーズ
No. 260

Integrated Approach to Testing and Assessment(IATA)の開発における有害性発現経路
(Adverse Outcome Pathway(AOP))の利用に関するガイダンス文書

経済協力開発機構 環境局
パリ、2016

OECD について

経済協力開発機構（OECD）は、南北アメリカ、ヨーロッパ、アジア太平洋地域の 35 か国の先進国と欧州委員会の代表が調整と会合を行う政府間組織で、政策の調整と調和のために、相互の懸念事項について議論し、国際問題に対応するために協力しています。OECD の活動のほとんどは、加盟国の代表から構成される 200 以上の専門委員会とワーキンググループで実施されています。OECD で特別な地位にある国々や、関心のある国際機関からのオブザーバーが、OECD のワークショップやその他の会議の多くに参加しています。委員会とワーキンググループは、フランスのパリにある局と課で構成される OECD 事務局によって運営されています。

環境安全保健課は、以下の 11 分野において無料の文書を公開しています。

Testing and Assessment（試験と評価）；

Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring（優良試験所基準とコンプライアンスのモニタリング）； Pesticides（農薬）； Biocides（殺生物剤）； Risk Management（リスク管理）； Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology（バイオテクノロジーにおける規制監視の調和）； Safety of Novel Foods and Feeds（新規の食品及び飼料の安全性）； Chemical Accidents（化学事故）； Pollutant Release and Transfer Registers（汚染物質放出及び移動登録）； Emission Scenario Documents（排出シナリオ文書）； Safety of Manufactured Nanomaterials（工業用ナノ材料の安全性）

環境保健安全プログラム及び EHS の出版物に関する詳細情報は、OECD のワールドワイドウェブサイト（www.oecd.org/chemicalsafety/）で入手できます。

この出版物は IOMC のコンテキストで開発されました。内容は必ずしも個々の IOMC 参加組織の見解や方針を反映しているわけではありません。

化学物質の健全な管理のための組織間プログラム（Inter-Organisation Programme for the Sound Management of Chemicals : IOMC）は、化学安全の分野における協力を強化し、国際協調を強化するための 1992 年の環境と開発に関する国連会議によってなされた勧告に従って、1995 年に設立されました。

参加組織は、FAO、ILO、UNDP、UNEP、UNIDO、UNITAR、WHO、世界銀行、OECD です。IOMC の目的は、参加組織が共同又は個別に、続行している政策と活動の調整を促進すること、人間の健康と環境に関連する化学物質の健全な管理を実現することです。

この資料は、電子的に無料で入手できます。

この資料やその他多くの環境保健安全に関する出版物については、OECD の World Wide Web サイト (www.oecd.org/chemicalsafety/) から公開しています。

又は以下にご連絡ください：

OECD 環境局、

環境保健安全課

2 rue André-Pascal

75775 Paris Cedex 16

フランス

ファックス：(33-1) 44 30 61 80

メール：ehscont@oecd.org

序文

OECD 加盟国は、化学物質の評価における代替法の利用を拡大するために検討を続けてきました。OECD は、Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA) の一部として、(Q) SAR、ケミカルカテゴリー、有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathways: AOP) などの代替法を利用するためのガイダンス文書とツールを開発しています。しかしながら、毒性学的エンドポイントの予測における化学物質の評価においては、代替法の個々の生物学的及び毒性学的関連性を特徴づけるための体系的なフレームワークが必要です。このフレームワークは、メカニズムの知識と理解を適用することによって統合されたアプローチの有益性から、他のツールや方法とともにそれらの潜在的な使用を組み合わせて情報が得られます。

この文書では、IATA の開発において AOP コンセプトを使用するためのアプローチの概要を説明します。IATA の開発と利用のためのフレームワークは、2014 年に開催されたワークショップ (ENV / JM / MONO (2015) 22) 及びこれまでの IATA 開発の経験に基づいて作成しています。

この文書は事務局によって作成され、Task Force on Hazard Assessment (ハザード評価タスクフォース) によって承認され、Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology (化学品委員会と化学品、農薬及びバイオテクノロジーに関する作業部会の合同会合) の責任の下で公開されました。

目次

OECD について	4
序文	6
1. はじめに	8
2. IATA を開発及び使用するためのフレームワーク	9
2.1. 有害性発現経路 (Adverse Outcome Pathway(AOP)) の概念	10
2.2. AOP コンセプトに基づく IATA.....	12
3. IATA の開発で AOP を使用する方法の例	15
3.1 (Q) SAR の開発.....	15
3.2. 化学物質カテゴリー中の化学物質のグルーピング	16
3.3 試験戦略の開発.....	16
3.4 非標準試験結果の解釈.....	18
3.5. テストガイドラインの開発/改良の方法の選択.....	18
4. AOP に基づく IATA の開発における不確実性の領域	20
5. 今後の方向性.....	22
参考文献	23

1. はじめに

現在の規制における毒性試験と評価のアプローチは、OECD テストガイドラインなどの標準化された試験ガイドライン又はプロトコルに従って実施された *in vivo*（生体内での）試験による評価が大部分を占めています。このアプローチは過去半世紀にわたって発展してきましたが、動物と資源の使用を増加させることなく、化学物質の評価数を増やさなければならないという法規上の義務を、このアプローチで効率的に実施することはほぼ不可能です。

市場に出ている化学物質数と評価に必要なデータ数のギャップを埋めるには、新しいアプローチの開発が必要です。ハイスループット（high throughput : HT）及びハイコンテンツ（high content : HC）手法の大幅な進歩により、化学物質に対する分子及び細胞の応答を定量化及び特徴付けるための関連情報を収集することが新たに可能となりました。一部のエンドポイントについては、*in vitro*（試験管内での）試験方法の開発が進んでいます。*In vitro* 技術を使用した OECD テストガイドラインは、皮膚/眼の腐食性・刺激性、皮膚感作性、遺伝毒性及び内分泌攪乱物質について利用できます。近年、これらの代替試験法は、特に *in silico*（コンピュータを用いた有害性予測）アプローチと化学物質をカテゴリー化するグルーピングが伴う際に、規制上の意思決定に影響を及ぼしてきました。したがって、毒性評価を主に *in vivo* 試験結果に基づくスキームから、代替法アプローチ（例えば、*in silico*、*in chemico*、HT / HC を含む *in vitro* 試験方法）を利用した結果を組み込んだスキームへの移行が既に行われています。

現在のところ、採用されている方法に関係なく、多くの試験アプローチでは誘発された毒性のメカニズムの理解に繋がることはありません。これは特に、動物を使わない試験アプローチ及び試験対象と予測される *in vivo* 試験での全般的な毒性との関係を理解する場合についてです。これが、新しいアプローチの結果が未だに規制上の意思決定に広範囲かつ一貫して使用されていない理由の 1 つです。したがって、有害作用の予測における新規方手法の個々の生物学的及び毒物学的関連性を特徴付ける客観的かつ体系的なフレームワークが必要です。同フレームワークは、統合アプローチの利点を享受するため、ツールや手法を組み合わせた使用の可能性についても、情報を供与することができます。

2. IATA を開発及び使用するためのフレームワーク

IATA は、試験戦略を使った新たな情報の生成を伴いつつ、Weight of Evidence (WoE) 評価において、既存情報の統合的な分析によって、化学物質の有害性及びリスクを特徴付けるのための実用的で科学的根拠に基づいたアプローチです。IATA は、意思決定に関連する不確実性の許容レベルを考慮して、特定の規制状況下において定められた問いに答えるため、反復的なアプローチにより対応します。

IATA には、より柔軟で、形式化されていない判断に基づくアプローチ（グループピングやリードアクロスなど）から、より構造的で規範的なルールベースのアプローチ（例：Integrated Testing Strategy (ITS)）まで幅があります。IATA は手法の組み合わせを含めることができ、ひとつ又は多くの方法論的アプローチ[(Q)SAR、リードアクロス、*in chemico*, *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*]あるいはオミクス技術（例：トキシコゲノミクス）からの結果を統合することで情報を得ることができます。生物学的組織のより低いレベルでの影響の可能性（たとえば、構造活性相関（SAR）と*in vitro* モデルに基づく毒性経路の開始）の把握は、IATA の他のタイプの情報（たとえば、暴露）と組み合わせることで、よりリソースの集約的な試験が保証されるかどうかについての情報を供与します。これは、毒性試験の量と種類に関する効率の向上に役立ちます。これは、IATA の適用には潜在的に多くの異なる方法があることを意味します。IATA のワークフロー又は決定論理が文書化（例：ガイダンス文書）されていたとしても、最終的なアプローチは、既存の情報の性質とレベル、WoE アプローチ（判断ベースのアプローチ）に一般的に依存し、意思決定プロセスは完全に調和しない可能性があります。

IATA にはある程度の専門家の判断（たとえば、情報源の選択とその重み付け）が必要ですが、IATA の一部の要素は標準化（つまり、ルールベース）することが可能です。特に毒性学の特定の分野（皮膚感作性、皮膚腐食性、刺激性など）では、試験と評価について DA (Defined approaches) の開発（動物を用いない試験により得られたデータを固定化したデータの解釈手順により評価する）が進んでいます（OECD、2014d; OECD、2016b）。DA は、データギャップのある物質に方法論を適用する前に、対象の毒性エンドポイントについて動物又は人間の利用できるデータがある一連の化学物質を用いて標準化することもできます。ただし、この分野では、さらに経験を積む必要があります。このようなアプローチが明確に定義されている場合、規制上の意思決定における情報の利用方法の一貫性を確保するために、それらを国同士で調和させることもできます。この目的のために、DA のこれらの構成部分に対するテストガイドライン（*in vitro* 試験など）あるいはガイダンス文書（*in silico* モデルの適用など）の作成が非常に望まれます。規制上の意思決定における IATA の評価を標準化するために、試験と評価に対する DA を記述及び評価するための原則を提供するガイダンスが作成されています（OECD、2016a）。さらに、IATA とその要素の記述と評価に対し同じ文書フォーマットが使用されるように、リードアクロスなど IATA の要素ごとに報告テンプレートが作成されています（OECD、2016c）。

IATA の構築には柔軟性が見込まれますが、規制の必要性和評価のコンテキストによっては、IATA にメカ

ニズムに関する情報を供与することが理想的です（Tollefsen et al., 2014）。言い換えれば、化学物質がその毒性を発揮するメカニズムの知識に基づいている必要があります。メカニズムの理解は、様々なレベルの生物学的組織を対象とする方法からの情報を整理及び分析するための枠組みを提供し、対象の有害事象（Adverse Outcome (AO)）を起こす可能性を見極める上でこれらの試験結果の貢献を可能にします（Tollefsen et al.,2014; OECD, 2015; Patlewicz et al.,2015; Perkins et al.,2015）。このようなメカニズムの理解は、以下に概説するように、有害性発現経路によって提供することができます。

2.1. 有害性発現経路（Adverse Outcome Pathway(AOP)）の概念

AOPは、化学物質への曝露によって引き起こされ、分子、細胞、臓器、生物全体又は個体群レベルで発生する一連のキーイベント（Key Events :KEs）のことです（図1）。これらのKEは、有害事象（AO）に因果的に結びついています。また、これらは測定可能です。AOPの一端は、分子開始事象（Molecular Initiating Event : MIE）です。これは、化学物質と生体の標的との直接的な相互作用を表しています（図2）。AOPのもう一方の末端は、生体又は個体群レベルでのAOです。AOは、多くの場合、標準の*in vivo* OECDテストガイドラインを使用して実施された試験から報告されたエンドポイントですが、他の毒物学的又は疫学的調査の観察結果もありえます。

AOPの上流のKEと下流のKEの間のリンクは、KEの関係（Key Event Relationship : KER）と呼ばれます。KERには、KEのペア間の因果関係を支持する利用可能な証拠が含まれます（Villeneuve et al.,2014b; Edwards et al.,2016）。KERには、KE間の定量的な関係の記述（つまり、上流のKEの変化が予測又は測定された場合に期待される下流KEの変化のレベル）と、その関係を調節することがわかっている要因も含めることができます。KERには、上流KEと下流KEの接続に参与した生物学的プロセスの詳細なメカニズム情報（生物学的妥当性と呼ばれる）も含まれます。

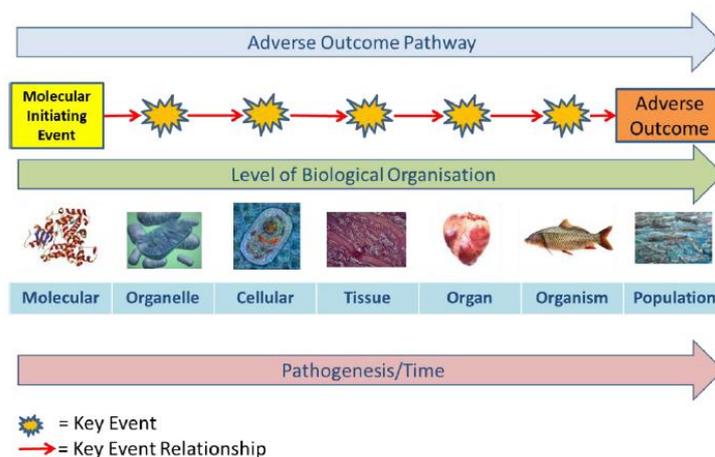


図1：AOPは、分子開始事象（MIE）を様々なレベルの生物学的組織を通じて有害事象（AO）にリンクする一連のキーイベント（KE）。

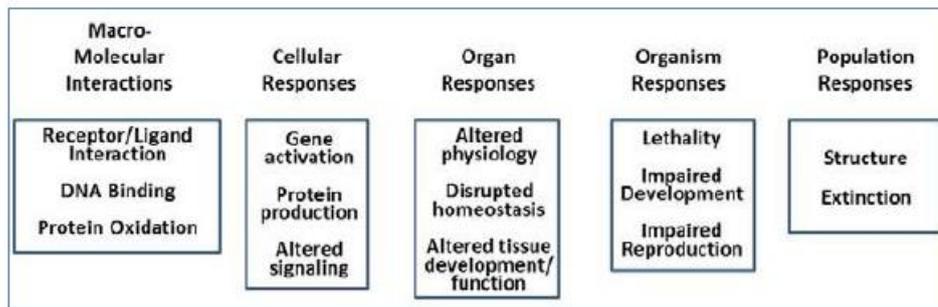


図2. AOPにおける生物学的組織の様々なレベルで識別できる事象のタイプの例
(ENV/JM/MONO(2013)6から引用)

AOPをMIEで始まり、AOで終わる単純な線形経路として記述すると、メカニズム情報の構造化された明確な整理と評価を容易にします。これは、単純な線形モデルが*in vivo*で発生する重要な現象を十分に表現するため、生物系の摂動の重要な要素を捉えることができることを仮定します。ただし、KEとKERを共有するAOPは、AOをもたらす経路の複雑さをより適切に表すより大きなAOPネットワークを形成できません (Knapen et al.,2015; Edwards et al.,2016)。

AOP開発において、KEを相互にリンクする根底にある証拠の評価は、作用様式 (Mode of Action : MoA) コンテキストでのWoE分析に既に使用されている、発展したBradford Hillの考察に基づいて行うことができます (Meek et al.,2014a; Meek et al.,2014b)。ただし、これらは化学物質に依存しない (つまり、化学物質に特異的ではない) AOPに適用できるように修正されています (OECD,2014a, Becker et al.,2015)。主要な3つの考察は次のとおりです。

- KERの生物学的妥当性
 - 上流KEと下流KEの間に、確立された生物学的知識と一致するメカニズム (つまり、構造的又は機能的) な関係があるか?
- KEの不可欠性
 - 上流KEがブロックされている場合、下流KEやAOは抑制されるか?
- KERの実証的支持
 - 実証的証拠は、上流KEの変更が下流KEの適切な変更につながる仮説を支持しているか?
 - 上流KEは、下流KEよりも低用量で、より早い時点で発生しますか? 上流KEの発生率は、下流KEよりも顕著か?

各KERのWoE (生物学的妥当性と実証的支持で構成される) と各KEの不可欠性に基づいて、AOPは運用上、定義された3つの開発段階に分けることができます。これらは、Villeneuveら2014 (表1を参照) によって詳細に説明されています。

表1. AOP開発の運用上定義された3つの段階又はフェーズ
(Villeneuve et al.2014aから改作)

運用上定義された開発段階/フェーズ	特徴
推定AOP	主に生物学的妥当性及び/又は統計的推論を通じて支持される KE と KER の仮説のセットの組み立て。 既知のギャップと不確実性の結果として、MIEとAOの間の不完全なリンクがある部分的なAOPの組み立て。
定性的AOP	AOPを支持する全体的なWoEの定性的評価を伴いつつ、どのように測定できるのかについての記述により支持されているKEと、妥当性や統計的推論に加えて、実証的証拠によって支持されているKERとの組み立て。
定量的AOP	どのように測定できるのか、及び、その測定がなされることに伴う正確性と精度についての記述により支持されているKEと、ある大きさの下流KEの変化を引き起こすために必要な、上流KEの変化の大きさ及び/又は期間の定量的な理解により支持されているKERとの組み立て。

2.2. AOP コンセプトに基づく IATA

AOPコンセプトは、以下を可能とし、IATAを開発するためのフレームワークとして適用できます。

- (a) 対象の化学物質について利用可能な既存情報を構造化された方法で評価し（図3を参照）、場合により既存情報に基づいてハザードを結論づける。
- (b) 特定の有害性の証拠に関する信頼度を高めるために必要となる情報の種類を特定・生成する。
- (c) 規制上の決定を行うために必要な情報を反復的に提示する（図4を参照）。

AOPは、既存の情報を評価することにより、MIE、KE及びAOを中心に、*in silico*及び*in chemico*データからフィールド調査まで、様々なタイプの情報のマッピング、整理、統合を可能にします（図3を参照）。

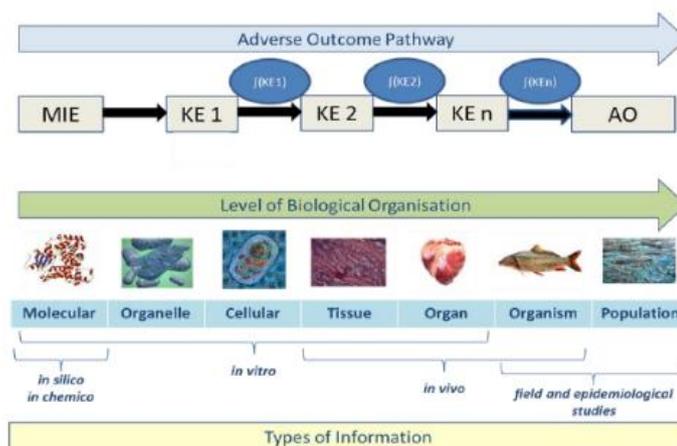


図3：AOPは、MIE、KE、AOを中心に、*in silico*及び*in chemico*データからフィールド調査に至るまで、様々なタイプの情報のマッピング、整理、統合を可能にする。

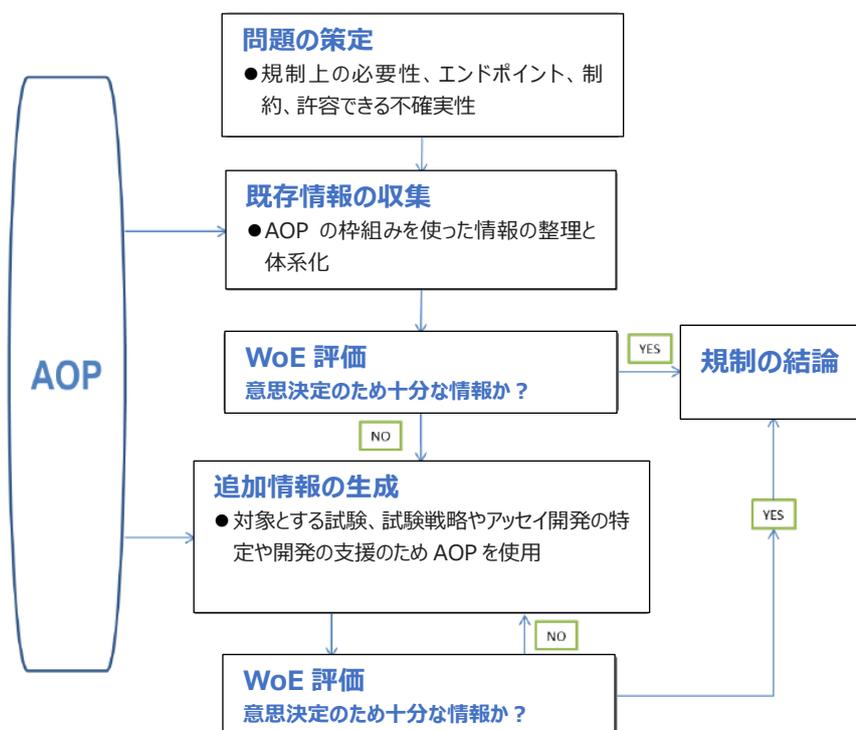


図4：意思決定のコンテキストにおけるIATAの情報収集・体系化にAOPをどのように適用するかについてのフレームワーク

AOPの高いレベルの信頼性と特異性は、規制のコンテキストで適用される試験方法とDefined Approachを導き出すために重要です。場合によっては、定量的なAOPが必要になります。AOP開発中にKE又はKERを支持する証拠のレベルを分類する方法（OECD 2014a）をさらに定義すると、様々な状況下におけるAOPの信頼性と適用性の信頼レベルに関する情報を供与します。場合によっては、IATAコンテキストで使用するAOPは、より低い信頼レベルで十分かも知れません。これは規制目的によって決定されます。たとえば、さらなる評価や試験を行う物質の有意義な方法による優先順位を付けにおける、非標準試験法の結果の解釈のためには、推定上のAOPからの構造的及びメカニズム的な理解で十分な場合があります。1つ以上の化学物質の実証的証拠が利用できることを記述した定性的AOPは、構造活性相関（SAR）の開発に情報を供与し、KE間の応答関係が既知である場合には、これは定量的（QSAR）にも可能です（section3.1及び3.2参照）。推定上のAOPは、ハイスループット（HT）及びハイコンテンツ（HC）手法又はオミクス技術から導出されたデータの解釈にも役立ちます（section3.5を参照）。

規制上の決定のために必要な情報のタイプの標的を決めるため、AOPは、試験戦略の設計に情報を供与することができます（section 3.3を参照）。試験戦略内においてKEの対象範囲は、個々のKEのために開発されたアッセイとAOPから得られたメカニズムの理解に大きく依存します。試験戦略の開発に情報を供与するため、少なくともAOP内の初期及び後期のKEを知る必要があり、KERの定性的な把握が必要です。原則として、AOPの信頼度が高いほど、試験戦略でカバーする必要があるKEの数は少なくなります。

AOPが形成する可能性のある経路のネットワークのために、AOPにおいて既知で記述された以外のKEも、実際には同じ最終AOに繋がる可能性は排除できないことに留意が必要です。したがって、IATA中のAOPは、AOの可能性が高い物質を特定するためにのみ使用でき、通常、影響のない物質を特定することには使用できません。どのAOPがAOに繋がっているか、また相互作用する（ネットワーク）AOPがあるかどうかを判断できるようにするために、KEとAOの間の明確でもっともらしい関係を導き出すことが重要です。

AOPはMIEのみで始まり、ADME（つまり、吸収、分布、代謝、及び排泄）データを含まないため、IATAでは、トキシコキネティクス（TK）を考慮することも重要です。ただし、化学物質及び/又はその代謝物が対象種の標的臓器に到達する可能性を判断するためには、TKを考慮しなければなりません。TKは、関連する構造部位（すなわち、親化合物及び/又は代謝物及び毒性作用のMIEの部位）を判定します。物理化学的特性及び構造的な特徴、潜在的な活性化又は解毒プロセスの調査並びに利用可能なTKデータの検討又はIATA内でのそのようなデータの作成は、予測の有効性を支持するために重要です。

AOPsを規制上の利用に役立てるための重要なステップは、KEの信頼できるアッセイの開発です。section 3.5では、AOPを使用して、さらなるアッセイ及びテストガイドラインを開発するために最も重要なKEを選択する方法について説明します。

以下のセクションの目的は、AOPが様々な目的で様々なIATAの開発にどのように情報を与え得るかを説明することです。セクション3で提供される情報の多くは、IATAの開発と使用のためのフレームワークに関する2014年のワークショップのレポート（OECD、2015）に基づいています。

3. IATA の開発で AOP を使用する方法の例

3.1 (Q) SAR の開発

各AOPにおけるMIEは化学物質と生物系のかなり特異な相互作用を伴うため、化学物質がAOPのトリガーとなるかどうかを予測するために使用できるメカニズムベースの構造活性相関 (SARs) の作成に使用できる可能性があります。SARは、関連するリードアクトス又は試験戦略を容易にするための化学物質のグルーピングにも利用できます (OECD, 2014c)。*In vitro*, *ex vivo* 又は *in vivo* アッセイが、AOPに沿ったMIE及び/又は1つ以上のKEについて作成されており、いくらかの数の化学物質について試験されている場合、これらの結果は予測に使用可能なSAR又はQSAR (カテゴリー化又は定量化可能な場合は連続値) の開発や化学物質のグルーピングを確認又は調整することに使用できます。この概念は、OECD QSAR Toolboxに皮膚感受性予測のため実装されています (Dimitrov et al., 2016)。SAR (OECD QSAR Toolboxではプロファイラーと呼ばれる) は、MIEを引き起こす化学物質 (すなわち皮膚タンパク質との共有結合する化学物質) を特定するために開発されました。連続的な値を予測する又は異なるカテゴリー (例えば、無、弱、中、強) を予測する(Q) SARは、様々なMIE / KEを特徴付けるアッセイで実測試験されている化学物質を基にも開発されています。従って、構造アラート (SAR) 又はQSARにより、MIE / KEを誘発することが予測されるある物質が、MIE / KEを測定するアッセイの結果から導出された別のSAR / QSARに基づいて、中程度の反応性がある物質として分類されることもあります。

特定の (有害) 影響に繋がるKEのシーケンスが十分に詳細なレベルで知られており、MIE、KE及びAO間の応答関係が、*in chemico*、*in vitro*、*ex vivo*、*in vivo*のアッセイの結果に基づいてよく特徴付けられている場合は、同じAOPを通じて作用する他の多くの化学物質の毒性は、図5に示すように、MIE又は任意のKEを予測することで実質的に決定できるかも知れません。前述のように、問題とする化学物質の動態と代謝の比較を知ることは重要です (つまり、ソースとターゲット両方の物質について)。

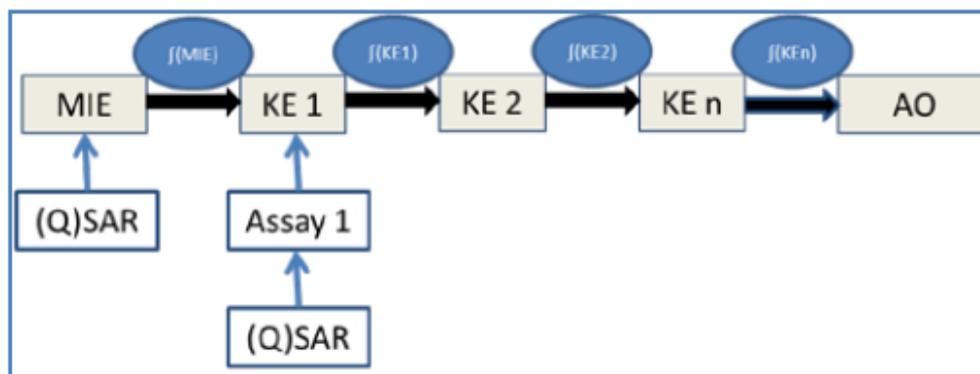


図5. AOPを使用したQSARの開発

3.2. 化学物質カテゴリー中の化学物質のグルーピング

AOPは、化学物質のグルーピング及びそれに基づく（リードアクロス又はトレンドアナリシスによるデータギャップ補完に情報供与することが可能です。アッセイの結果やMIE又はKEの予測を基に同じAOPを活性化することを示す複数の化学物質は、同じグループにすることができ、これにより、構造類似性のみに基づいて化学物質をグルーピングする場合と比較し、AOのデータギャップ補完の頑健性が向上します。したがって、AOPは、固有の化学的性質及び生物組織の様々なレベルでの生物活性に基づいて化学物質をグループ化する機会を提供します。

MIEから最終的なAOまでのAOPの完全な知見は、一般的なMIE又はKEの周りの物質をグルーピングするために重要とはみなされませんが、MIE又はKEとAO間のリンクを確立することは、実行されたデータギャップ補完（リードアクロスなど）を正当化するために必要になります。図6は、同じAOPを引き起こすと推定される化学物質のカテゴリーが、リードアクロスにどのように使用できるかを示しています。

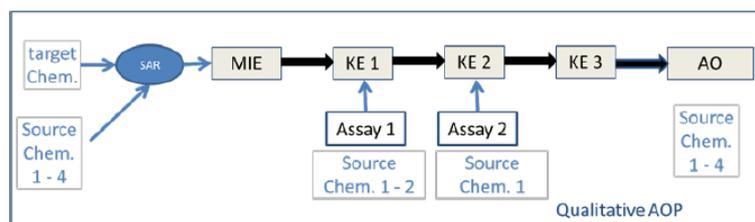


図6. 特定のエンドポイントに対し化学物質を分類するためのAOPコンセプトの利用

図6に概説されている例では、4つのソースケミカル（1～4）への暴露が、同じAOに帰結すること予測しています。構造的に類似しているターゲットケミカルでは、同様の情報が欠けています。3つのKEが特定されたAOPが作成されています。さらに、MIE（例えば、タンパク結合など）を予測するSARが作成されています。2つの特定のKEについては、特定の*in vitro*アッセイも利用できます。SARを基に、ソースケミカルとターゲットケミカルの両方がMIEのトリガーとなることを示すことができます。MIEの共通性に基づき、ターゲットケミカルの暴露が類似のAOに帰結するという仮説を立てることができます。2つのソースケミカルについて、*in vitro*試験の結果、それらはKE1を導き、2つの物質のうち1つはKE2のトリガーにもなることを示しています。これらの結果に基づいて、4つのソースケミカル全てがこの共通のAOPを通じて影響を及ぼす可能性があります。これは、ターゲット物質も、同様のAOに帰結する同様の経路をたどることを示唆しており、AOPに由来するこの構造化されたメカニズム情報を使用することによって、ソースケミカルとターゲットケミカル間のリードアクロスが補強されます。このリードアクロス予測の潜在的な使用により、KE1又はKE2を測定するアッセイでのターゲットケミカルを試験することにより、信頼性を補強できます。追加データ及び毒物動態学的側面の考察を加えることにより、さらに強固な結論に到達でき、物質間の相対的な可能性の順位付けさえ可能になります。

3.3 試験戦略の開発

AOPコンセプトは、特定のAOPに沿った特定のKEを評価するアッセイ又は予測モデルを組み合わせること

により、関心のあるエンドポイントについての試験戦略の開発に使用できます。ただし、結論の独立した検証を可能にするため、アッセイ又は予測モデルとそれらの組み合わせは、適用領域、パフォーマンスの特性及び組合せの観点から、透明性のある方法で、よく特徴付けられるべきです。試験戦略の開発におけるAOPの使用では、試験戦略の開発におけるAOPの使用に対する信頼を確保するための品質基準（強固なKE、強固なKER、関連する化学物質の十分な例、関連する毒性学的エンドポイント）が主として重要になります。

ある化学物質に関して利用できる有害性情報が特定され検討されたら、AOPに沿った異なるKEに対応する試験の組み合わせから、段階的アプローチで情報を収集することが試験戦略の狙いになります。各段階からの情報は、次の段階ですべき判定において、最も関連性の高い情報を作り出すのは、どんなシステムであるかを定めるために使用されます。

試験戦略を開発するとき、AOPの信頼のレベルは、試験戦略に含める必要がある特定のKEを対象に開発されたアッセイ又は予測モデルの数量や種類を決定する際に使用できます。

図7は、AOPがどのように、判別エンドポイント（ポジティブ又はネガティブ）を識別するための一連の試験戦略への情報供与のため、どのように使用できる可能性があるかについて例を示しています。この例では、MIEと2つのKEが十分に特徴付けられており、*in silico*、*in chemico*、*in vitro*のアプローチが利用可能です。さらに、動物を使用しない試験の個々のパフォーマンスは、標準的な*in vivo*試験と比較されています。

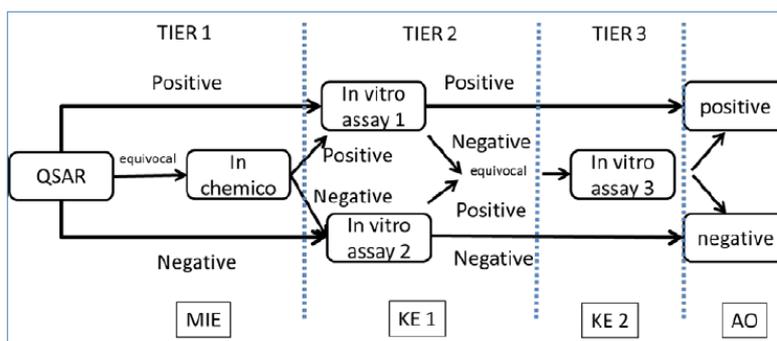


図7.テスト戦略でのAOPの使用

図7では、MIEは知られており、QSARアプローチを使用して特徴付けることができます。この予測は、どのような後続の試験が保証されるかを決定します。QSAR（Tier 1）からの陽性の予測は、KE 1に関与し高い陽性予測能（低い偽陽性）を持つアッセイで試験（Tier 2）へ繋がります。一方、QSARからの陰性の予測は、KE 1に関与し、高い陰性予測能（低い偽陰性）を持つアッセイで試験（Tier 2）へ繋がります。Tier 1の分析で明確に陽性又は陰性予測された物質に対する最終決定については、Tier 1と2の結果が一致した場合、Tier 2で行うことができます。

QSARが明確な予測を生成できない物質は、Tier 1でMIEに関与するアッセイで試験することにより解決できます。このアッセイからの陽性又は陰性の結果は、どのタイプのKE 1 アッセイがTier 2で使用されるべきか、つまり、高い陽性予測能を持つものか又は高い陰性予測能をもつものかを決定します。Tier 1と2の結果が矛盾する物質は、KE 2に関与するアッセイによってTier 3で試験され、WoEアプローチを使用して最終決定が行われます。

3.4 非標準試験結果の解釈

AOPにおけるKEと非標準試験をリンクさせることは、これらのタイプの結果をどのように解釈してAOにリンクするかについて理解するための環境を提供します。オミクスデータ（トキシコゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスを含む）により、作用メカニズムのより詳細な視点を与え、また、特定の物質によって誘発される分子/細胞の影響（*in vivo*又は*in vitro*）の範囲をより効率的に調べることに応用できます。オミクスデータは、生物全体に有害影響をもたらすAOPに沿って、特定のKEを引き起こす直接的なマーカー又は間接的な証拠として役立つこともできます。データを生成するために使用された実験の実際の設計に依存して、いかなるオミクスデータセットでもKEに関連付けられる可能性があります。

*In chemico*手法、受容体結合又は受容体トランス活性化アッセイ、細胞レポーターアッセイより生成されたHT及びHCデータは、特定のKEに関連するケミカルスペースの同定の強化に役立つ可能性があります。HTアプローチは、コスト効率の高い方法で多数の化学物質に関するデータを提供する可能性があります（Judson et al., 2013）。数千の化学物質をスクリーニングすることを目的とした優先順位付けアプローチにおいて、特定の分子標的又はAOP内の細胞応答経路を起こすことが予測される新しい化学物質を識別することに、HTSを位置付けることも可能です。よく特徴付けられたAOP内のKEに密接に関連するHTS又は*in vitro*手法は、AOの予測において高い価値を持っています。ただし、そのようなスクリーニングは、可能性のある（有害性）影響を有する物質を特定するためにのみ使用でき、通常、影響のない物質を特定できないことに留意すべきです。なぜならば、AOPにて既知で記述されているもの以外のKEが、実際に同じ最終AOに繋がる可能性を排除できないからです。これは定性的又は定量的AOPの開発と後続の上位層のテストを最終的に削減できるAOPネットワークの作成の動機付けになる可能性があります。AOPが明確で定量的にリンクされた一連のイベント（つまり、因果関係のあるKEの連鎖）から構成されている場合、HTSアッセイが、標的とすることが必要となるのは、これらのイベントのうち予測できるものただ1つだけになるかも知れません。

3.5. テストガイドラインの開発/改良の方法の選択

*In vitro*試験方法とAOPにおけるKEを関連付ける、関係する場合は動態/ ADME情報（又は統合された動態情報を伴う精密な*in vivo*手法）とも関連付けることによって、有害性エンドポイントに対する、各手法による結果の間の関連性が確立できます。実際には、AOが化学物質の曝露後に起きると十分に推察できるKE又は一連のKEの試験方法を開発することが最も理にかなっています。原則として、

AOPに沿ってすべてのKEを引き起こすことは、最終的なAOが起こるために必要ですが、どれも単独では不十分です。実際には、予測の目的に対して、すべてのKEがAOの予測モデルで表される必要はありません。AOの誘発に不可欠で、AOとの関係が確立されているKEの特定は、代替方法の開発者が、これらの特定の有益なKEを対象としたテスト手法の開発にリソースを割り当てることを可能にします。これにより、毒性の特定に必要なアッセイの総数も減少します。図8は、（準）定量的AOPを参照して、テストガイドラインの作成に最適なアッセイを選択する方法を示しています。

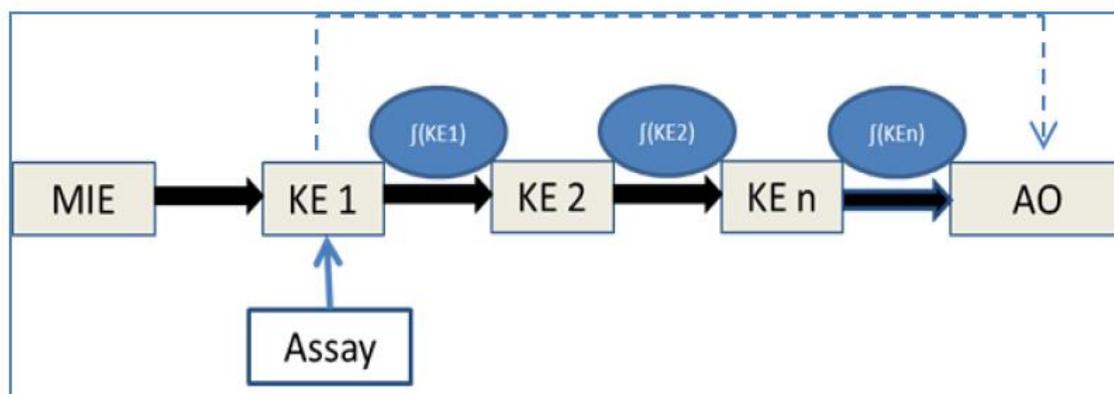


図8.（準）定量的AOPが標的とするKEを選択する際にどのように使用できるかを示す例。これによりAOを予測するためのテストガイドラインの開発あるいは改良が可能。

4. AOP に基づく IATA の開発における不確実性の領域

AOPから情報供与されたIATAにおいて、不確実性のレベルは、一部はAOPの限定的な開発に関連しており、一部はMIE又はKEの測定若しくは予測に使用されている手法の信頼性と範囲に関連しています。以下の段落では、IATAの開発で使用されるAOPとアッセイに関連する不確実性の情報源について考察します。

KERの生物学的妥当性と実証的支持を確認するデータの量と質、同じくAOP又はAOPのネットワークにおけるKEの不可欠性は、IATAの結論の信頼性に影響します。上記のように、開発の様々な段階（表1）でのAOPの分類は、AOPを特徴付けるのに役立つ一方で、それぞれのAOPは、得られた証拠に基づいてIATAの適用を決定するために個別に評価される必要があります。この評価では、AOPにおける利用可能な証拠と関連する信頼性が、どのKE又はKERをIATAに含めるか決定するために使用されます。AOPの信頼が高まるにつれ、選ばれた数のKEにのみ基づいて、より多くの決定を行えるようになります。しかしながら、対象のエンドポイントに応じて、最終的なAOに影響を与える可能性のある生物学的プロセスを全て考慮するためには、相互接続されたネットワーク内において1つ以上のAOPが必要です。この場合、IATA開発中に考慮すべき共通のKEが明確になる可能性があります。ただし、多くの一共通のKEはAOに近い距離にありますが、IATAの中でより上位にあり（MIEに近い）、AOPネットワークでより基本的な役割を果たす可能性があるKEを含めることにも特別な注意を払う必要があります。

KERを支持するWoEやAOP全体に対する因果関係の支持をIATAにおいてどのように適用するかについて決めることは、依然として課題があります。生物学的妥当性は一般に、経験的支持よりも重要視されていますが、生物学的妥当性がきちんと確立されていない場合、経験的証拠が非常に強い場合があります（Edwards et al.,2016）。ネクローシスと肝細胞増殖の両方のAOPは、本質的な原因となるKEの特定において不完全ですが、AOには強力な経験的証拠があります（Perkins et al.,2015）。したがって、IATAの組み立てと報告には、KER又はAOP全体に関連した生物学的妥当性と経験的支持を結合した考察が必要です。また、AOPは、明確に定義されていないものから詳細に文書化されたものまで、連続的な段階があることを強調する必要があります。そしてこれにより、WoEの評価は、IATAで役割を果たすためのKER又はAOPの選択に対する正当性を促進することが可能となります。

AOPベースの試験戦略が開発された場合、KEの測定に必要なアッセイの特定又は開発の可能性に特別な注意を払う必要があります。場合によって、選択したKEのアッセイの検証が必要になることがある一方、ガイドライン化されていない*in vitro*手法ガイダンス（OECD、2014b）にしたがった報告で十分であると考えられることもあるかも知れません。試験戦略で使用される個々の情報源の報告において、アッセイの開発や標準化又は検証の状況は、把握されていることが必要であり、情報源が、a) 公式に採用された（標準的な）試験方法（例：OECDテストガイドライン）； b) 検証済みだが非標準的な試

験方法； c) 正式な評価を受けている段階の試験方法（例：事前検証、検証、その他）； d) 広く使用されている検証されていない試験方法； e) 少数のユーザーによって実施された検証されていないテスト方法（OECD,2016a）のどれに該当するかを示す必要があります。このプロセスの先進的な例は、皮膚感作性AOPからのKEを測定するアッセイの評価です（Reisinger et al.,2015）。皮膚感作性に関するケーススタディ(ENV/JM/MONO(2016)29/ANN1)は、単一な手法を種々のキーイベントに対して開発し検証することは可能であるけれども、それらを規制に適用するために標準化し、調和させることが難しいことを示唆しています。したがって、試験戦略あるいはDAにおけるそれらの有効性と有用性はまだ解明されていません。

AOPに基づくIATAで使用される場合、同じ考察が(Q)SARに対して有効です。(Q)SARモデル及びその予測性に関連する限界並びに不確実性は、それらの根拠となっている情報及びアッセイと同様に、考慮する必要があります。さらに、(Q)SARとその予測の有効性は、「規制目的での(Q)SARに対するOECDバリデーション原則」（OECD 2007）を参照して評価する必要があります。

5. 今後の方向性

文書化された AOP の数が増加するにつれて、様々な開発段階での AOP の例（つまり、推定的なもの、定量的なものなど）が、より多く利用可能となり、IATA におけるそれらの適用及び様々な規制状況でのそれらの利用に関するさらなるデモンストレーションの実施やガイダンス文書の作成が可能となります。OECD の現在の焦点は、AOP 開発の継続と、IATA の実用的な適用に関するケーススタディをレビューすることです。経験の増加に伴い、IATA の開発のためのガイダンス文書及び調和された IATA が開発されることが期待されます。

参考文献

- Becker, R.A., Ankley, G.T., Edwards, S.W., Kennedy, S., Linkov, I., Meek, B., Sachana, M., Segner, H., Van Der Burg, B., Villeneuve, D.L., Watanabe, H., Barton-Maclaren, T.S. (2015) Increasing Scientific Confidence in Adverse Outcome Pathways: Application of Tailored Bradford-Hill Considerations for Evaluating Weight of Evidence. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72: 514-537.
- Dimitrov, S.D., Diderich, R., Sobanski, T., Pavlov, T.S., Chankov, G.V., Chapkanov, A.S., Karakolev, Y.H., Temelkov, S.G., Vasilev, R.A., Gerova, K.D., Kuseva, C.D., Todorova, N.D., Mehmed, A.M., Rasenberg, M., Mekenyan, O.G. (2016) QSAR Toolbox - workflow and major functionalities. *SAR QSAR Environ Res.* 19: 1-17.
- Edwards, S.W., Tan, Y.M., Villeneuve, D.L., Meek, M.E., McQueen, C.A. (2016). Adverse Outcome Pathways- Organizing Toxicological Information to Improve Decision Making. *J Pharmacol Exp Ther.* 356: 170-181.
- Judson, R.J., Kavlock, R., Martin, M., Reif, D., Houck, K., Knudsen, T., Richard, A., Tice, R.R., Whelan, M., Xia, M., Huang, R., Austin, C., Daston, G., Hartung, T., Fowle III, J.R., Wooge, W., Tong, W. Dix, D. (2013) Perspectives on validation of high-throughput assays supporting 21st Century Toxicity Testing. *ALTEX* 30(1): 51-56.
- Knapen, D., Vergauwen, L., Villeneuve, D. L., Ankley, G.T. (2015). The potential of AOP networks for reproductive and developmental toxicity assay development. *Reprod. Toxicol.* 56: 52-55.
- Meek, M. E., Boobis, A., Cote, I., Dellarco, V., Fotakis, G., Munn, S., Seed, J. and Vickers, C. (2014a). New developments in the evolution and application of the WHO/IPCS framework on mode of action/species concordance analysis. *J. Appl. Toxicol.* 34: 1-18.
- Meek, M. E., Palermo, C. M., Bachman, A. N., North, C. M., Jeffrey Lewis, R. (2014b). Mode of action human relevance (species concordance) framework: Evolution of the Bradford Hill considerations and comparative analysis of weight of evidence. *J. Appl. Toxicol.* 34: 595-606.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2007). Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationships [(Q)SAR] models. ENV/JM/MONO(2007)2.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2013). Guidance document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways, (Series on Testing and Assessment No. 184) ENV/JM/MONO(2013)6.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2014a). Users' handbook supplement to the guidance document for developing and assessing AOPs

https://aopkb.org/common/AOP_Handbook.pdf

- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2014b) Guidance document for describing non-guideline in vitro test methods (Series on Testing and Assessment No. 211) ENV/JM/MONO(2014)
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2014c). Guidance on grouping of chemicals, second edition (Series on Testing & Assessment No. 194). ENV/JM/MONO(2014)4.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2014d). Guidance Document on an Integrated Approach on Testing and Assessment (IATA) for Skin Corrosion and Irritation, (Series on Testing and Assessment No. 203) ENV/JM/MONO(2014)19.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2015). Report of the workshop on a framework for the development and use of integrated approaches to testing and assessment, (Series on Testing and Assessment No. 215) ENV/JM/MONO(2015)22.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2016a). Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be used within Integrated Approaches to Testing and Assessment. ENV/JM/MONO(2016)28.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2016b). Guidance Document on the reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be used within Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Sensitisation. ENV/JM/MONO(2016)29, ENV/JM/MONO(2016)29/ANN1 and ENV/JM/MONO(2016)29/ANN2.
- Organisation for Economic Co-operation and Development. (2016c). Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA) - First Review Cycle (2015) - Case Studies on Grouping Methods as a Part of IATA.
- Patlewicz, G., Simon, T.W., Rowlands, J.C., Budinsky, R.A., and Becker, R.A. (2015). Proposing a scientific confidence framework to help support the application of adverse outcome pathways for regulatory purposes. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71: 463-477.
- Perkins, E.J., Antczak, P., Burgoon, L. D., Falciani, F., Garcia-Reyero, N., Gutsell, S., Hodges, G., Kienzler, A., Knapen, D., McBride, M. and Willett, C. (2015). Adverse outcome pathways for regulatory applications: examination of four case studies with different degrees of completeness and scientific confidence. *Toxicol. Sci.* 148: 14-25.
- Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C.,

- Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2015) Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro.* 29: 259-270.
- Tollefsen, K.E., Scholz, S., Cronin, M.T., Edwards, S.W., de Knecht, J., Crofton, K., Garcia-Reyero, N., Hartung, T., Worth, A., Patlewicz, G. (2014). Applying adverse outcome pathways (AOPs) to support integrated approaches to testing and assessment (IATA). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70: 629-640.
- Villeneuve, D., Crump, D., Garcia-Reyero, N., Hecker, M., Hutchinson, T.H., LaLone, C.A., Landersmann, B., Lettieri, T., Munn, S., Nepelska, M., Ottinger, M.A., Vergauwen, L., Whelan, M. (2014a) Adverse outcome pathway (AOP) development I: Strategies and principles *Toxicol. Sci.* 142: 312– 320.
- Villeneuve, D., Crump, D., Garcia-Reyero, N., Hecker, M., Hutchinson, T.H., LaLone, C.A., Landersmann, B., Lettieri, T., Munn, S., Nepelska, M., Ottinger, M.A., Vergauwen, L., Whelan, M. (2014b). Adverse outcome pathway development II: best practices. *Toxicol. Sci.* 142: 321-330.