

201035013A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)
およびカテゴリーアプローチの実用化に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成23(2011)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)

およびカテゴリーアプローチの実用化に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成23(2011)年 5月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添3)	
化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)および カテゴリーアプローチの実用化に関する研究	<u>1</u>
本間 正充	
II. 分担研究報告書 (別添4)	
遺伝毒性の予測に関する研究	<u>9</u>
本間 正充、宮島 敦子、森田 健	
反復投与毒性及び遺伝毒性を指標にした構造活性相関手法構築及び 安全性評価における利用に関する研究	<u>49</u>
広瀬 明彦、林 真、江馬 眞	
構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究	<u>105</u>
小野 敦	
類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究	<u>131</u>
吉田 緑	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5)	<u>153</u>
IV. 研究成果の刊行物・別冊	<u>155</u>

別添3

I. 総括研究報告書

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)および
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究

研究代表者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

本研究では、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)やカテゴリーアプローチの化学物質行政における利用の実用化に向け、(Q) SAR 評価モデルの改良や適用範囲の拡充、カテゴリーアプローチの安全性評価における利用法・有用性の検証を行い、得られた成果をもとに化学物質評価に適用するためのガイドライン作成を目的として研究を進めた。本年度は、*in vitro* 染色体異常試験 (CA) について、医薬品で検討されている試験最高濃度低減化の妥当性について検証を行い、一般化学物質においても適用可能であり、さらに、最高濃度の低減化により CA モデルの予測精度向上が可能であることが明らかとなった。*in silico* 組織代謝シミュレータ TIMES について検討の結果、合理的な反応性代謝物が生成されていることが確認できた。一方、*in vivo* 遺伝毒性の予測の検討では解毒ロジックの追加の必要性が示された。*in vivo* 小核試験データセットを用いて検討を行った結果、*in vitro* 染色体異常予測アラートのうち *in vivo* 染色体異常に適した 7 種のアラートが特定された。反復毒性試験における標的臓器毒性(脾臓、骨髄、および、甲状腺毒性)について、既存化学物質安全性点検データ及び関連する文献情報をもとに各毒性についてそれぞれ 4 種の Rapid Prototype アラートの構築に成功した。ジメチルアニリンの 6 構造異性体についてカテゴリーアプローチ適用の検討を行った結果、カテゴリーとして評価することの妥当性が示され、OECD 高生産量既存化学物質点検プログラム評価書を作成した。昨年度構築した肝毒性予測モデルについて、特徴部分構造と計算記述子を組み合わせることで精度向上が可能であることが示された。OECD QSAR ツールボックスを用いた Cramer の毒性分類の検証結果から、現在 OECD で検討が進められている AOP 型のプロファイラーと組み合わせることで *in silico* レベルでの *in vivo* 毒性スクリーニングの有力な手段となると考えられた。新規化学物質のラット反復投与毒性試験における病理組織学的所見の分類を行い、毒性の類似性について検討を行った結果、最も病理組織学的所見が観察された臓器は肝臓であり、腎、胃であることが明らかとなった。

研究分担者

林 真

: (財)食品農薬品安全性評価センター センター長

江馬 眞

: (独)産業技術総合研究所 安全科学研究部門 招聘研究員

広瀬 明彦

: 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 室長

小野 敦

: 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

吉田 緑

: 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

宮島 敦子

: 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長

森田 健

: 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部 室長

A. 研究目的

我が国では、数万種に及ぶ既存化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、早急な対応が求められている。さらに、現在の化学物質審査規制法では、10t 未満の物質(低生産量物質)については、スクリーニング毒性試験の実施は不要とされ、既存の毒性情報に基づき審査が行われている。しかし、低生産量物質の申請数は、スクリーニング試験結果を行った物質を大きく上回っており、低生産量であっても、その毒性をヒト健康の上からは把握することが望まれている。安全性評価未実施の既存化学物質はもとより低生産量物質については早急な安全性評価の実施が望まれるが、効率性や動物愛護の観点から、動物を使用せずに毒性の強さを把握できる最良な方法としてこれまでに蓄積された毒性情報を活用したカテゴリーアプローチや(定量的)構造活性相関((Q)SAR)の活用が期待されている。現在、カテゴリーアプローチや(Q)SAR の規制への適用については、OECD を始めとして EC 諸国および米国 EPA においても検討されているものの、実際のヒト健康影響の評価への適用例はほとんどない。我々は、これまでにヒト健康影響に関するスクリーニング試験の内、変異原性、染色体異常について 3 種のプログラムを用いた予測システムの開発を、反復毒性については肝毒性と腎毒性をターゲットとしたプロトタイプアラートの開発を進め、それぞれ適用可能な化合物や予測精度に限定はあるものの、(Q)SAR のヒト健康影響の評価への有用性に関する知見を得ている。本研究では、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)やカテゴリーアプローチの化学物質行政における利用の実用化に向け、(Q)SAR 評価モデルの改良や適用範囲の拡充、カテゴリーアプローチの安全性評価への適用による利用法・有用性の検証、得られた成果をもとにこれらの手法を化学物質評価に適用するためのガイダンス作成を目的としてこれに関連した研究を進めている。

B. 研究方法

QSARによる染色体異常試験結果の予測の向上に関する研究: 医薬品の遺伝毒性ガイドラインで検討されている最高濃度の低減化に伴う QSAR 予測率について検討する目的で、249 の既存化学物質の *in vitro* 染色体異常試験データを再解析し、DEREK、Mcase、TIMES の 3 種の QSAR システムにおける予測率の再計算を行った。

QSARによる *in vivo* 遺伝毒性の予測に関する研究: *in vivo* 遺伝毒性試験の一つである *in vivo* 小核試験の予測に必要なアラートや、モデルの開発を目的として、カーランドの 929 化合物の CGX データベースから *in vivo* 小核試験データがある 256 化合物について、結果のレビューを行い、DEREK および TIMES を用いて予測率を計算するとともに *in vitro* 染色体異常予測アラートから *in vivo* 予測に適したアラートの検索を行った。

構造活性相関手法による反復投与肝毒性予測に関する研究: 構造活性相関による反復投与毒性予測のため既存化学物質安全性点検データ及び関連する文献情報をもとに反復毒性試験における標的臓器毒性(脾臓、骨髄、および、甲状腺毒性)について、Derek システムのための Rapid Prototype アラートの構築を行った。肝毒性予測モデルのうち、構造記述子による判別分析型の ADMeworks モデルについて、化合物部分構造を加味した予測精度向上について検討を行った。

ジメチルアニリン異性体におけるカテゴリー評価の研究: ジメチルアニリンの構造異性体 6 物質における物理化学的性状に関し、文献調査を行うとともに、必要に応じて構造活性相関手法を用いて推定を行った。

化学物質安全性評価における構造活性相関利用の海外動向: OECD QSAR Toolbox 管理会議及び OECD 化学物質カテゴリー構築のためのメカニズム情報利用ワークショップ等において、米国 EPA 及び欧州加盟各国代表と各国にお

ける化学物質安全性評価における構造活性相関の実用化について情報交換を行った。OECD ツールボックスのCramerの毒性分類について既存化学物質安全性点検化合物の分類を実施による検証を行った。

反復投与毒性試験病理組織学的所見シソーラスの構築:化審法で申請された新規化学物質の反復投与毒性試験結果における病理組織学的所見を抜粋し、臓器ごとのシソーラスを構築した。さらに、構築したシソーラスを基に、類似構造化合物あるいは毒性評価の類似性について検討を行った。

C. 研究結果

QSARによる染色体異常試験結果の予測の向上に関する研究:哺乳類培養細胞を用いるin vitro染色体異常試験 (CA) について、医薬品で検討されている試験最高濃度の 1 mM上限濃度が、一般化学物質においても適用可能であることが示された。さらに、最高濃度の低減化に伴うDEREK、Multicase、AdomeWorksそれぞれによる染色体異常試験モデルの予測率の向上について検討を行った結果、感受性もしくは一致率の向上が認められ、高濃度でのみで陽性反応を示す化合物に基づく不確定なアラートの削除等により予測精度向上が可能であることが明らかとなった。

QSARによるin vivo遺伝毒性の予測に関する研究:in vivo小核試験データセットを用いて、in vitro染色体異常予測アラートについて検討した結果、in vivo染色体異常をカバーするのに適した7種のin vitro染色体異常予測アラートが特定された。さらに文献情報の調査等により、6種のin vivo染色体異常アラートが構築された。生体内での代謝および生物学的利用率を考慮したin vivo遺伝毒性予測モデルを、ブルガス大学と共同開発した。トレーニングセットでのin vivo小核試験の予測率は感度:74%、特異度:75%であった。またin vivo 肝臓での遺伝毒性 (コメントもしくはUDS) の予測率は感

度:70%、特異度:57%であった。

構造活性相関手法による反復投与肝毒性予測に関する研究:既存化学物質安全性点検データ及び関連する文献情報をもとに反復毒性試験における標的臓器毒性(脾臓、骨髄、および、甲状腺毒性)について、DerekシステムのためのRapid Prototypeアラートの構築を行い、各毒性それぞれについて4種のアラート構築に成功した。肝毒性予測モデルのうち、構造記述子による判別分析型のADMEworksモデルについて、化合物部分構造を加味した改良の結果、若干の精度向上が認められた。さらに、偽陰性判定される化合物から特徴部分構造を抽出してモデルの再構築を行うことで全体の一致率76.8%のモデル構築に成功した。

ジメチルアニリン異性体におけるカテゴリ評価の研究:ジメチルアニリンの構造異性体6物質における物理化学的性状に関し、文献調査を行うとともに、必要に応じて構造活性相関手法を用いて推定を行った結果、これら6異性体をカテゴリとして評価することの妥当性が示され、検討結果をもとに経済協力開発機構の高生産量既存化学物質点検プログラムにおけるSIAP、SIAR及びIUCLID Dossierを作成した。化学物質安全性評価における構造活性相関利用の海外動向:OECDでは、毒性データベースと各種の予測ツールを統合したOECD QSAR ツールボックスの開発を進めており、in vivo反復毒性に関しては、毒性メカニズムごとに構造推定を行うAOP型のアラートやモデルの整備を進めることによる毒性評価の検討が進められている。一方、現在のツールボックスの機能であるCramerの毒性分類により既存化学物質安全性点検化合物の分類を実施した結果、毒性の強さ (NOEL) の分離はあまり良くないものの、結果の矛盾する化合物構造に基づき分類精度を向上できる分類規則の拡張が出来れば、AOP型のプロファイラーと組み合わせて利用することでin silicoレベルでの毒性スクリーニングにおける有力な手段となると考えられた。

反復投与毒性試験病理組織学的所見シソーラスの構築：新規化学物質のラット 28 日間反復投与毒性試験にて認められた毒性および投与に関連した病理組織学的所見を抜粋し、臓器ごとのシソーラスを構築した。各臓器・器官を 12 の系統に分類し、投与に関連して発現した約 1600 の病理組織学的所見は、339 の所見に分類することができた。この臓器毎に分類した病理組織学的所見を基に、毒性評価の類似性について検討を行った。投与による病理組織学的所見が最も観察された臓器は肝臓であり、腎、胃と続いた。肝腎についてはこれらの臓器が代謝排泄の主要臓器であること、胃については投与物質が刺激性を有することを反映している結果と考えられた。

D. 考察

既存化学物質データの解析から、染色体異常予測に対する新規アラート及び Rapid Prototype アラートの構築に成功したが、外部データセットに対する感度は、15%と低く、テストデータセット化合物内のケミカルスペースの被覆率の不足が示唆された。アラートタイプの評価においては、新しい化合物について、常にトレーニングデータセットによりカバーされる構造であるかどうかを考慮する必要があると考察された。染色体異常試験の最高濃度を 1 mM に低減化することにより、QSAR の予測率が向上し、1mM 以上で陽性を示す化学物質のほとんどは、遺伝毒性の実質上の懸念はないものと判断されたことから最高濃度低減化の妥当性が支持された。一方、*in vivo* 小核試験に対する、これまでに構築した *in vitro* 染色体異常モデルの予測率は低いものの、*in vivo* 染色体異常をカバーするのに適した *in vitro* 染色体異常予測アラートの抽出に成功した。今後は、新規アラートの開発による向上が必要であるとともに単にアラートから遺伝毒性を予測するような単純なモデルではなく、代謝や生物学的利用率等を考慮したメカニズムベース

のモデルの構築が必要であると考察された。

反復投与肝毒性予測に関しては、これまでに肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、および甲状腺毒性のアラート構築に成功しており予測精度はあまり高くはないものの、肝毒性に関しては偽陰性化合物の部分構造を加味すること精度向上が可能であることが示された。今後、病理学的変化の種類やメカニズム、化学構造分類ごとにモデル構築することでさらに精度の高い予測が可能になると考察される。病理組織学的所見に関しては、今回の解析の結果、理組織学的用語の統一が、臓器により種々であり、特に精巣、腎臓、骨髄、精巣上体ではさまざまな病理組織学的所見が用語として使用されていた。化学物質のハザード評価には統一した用語を用いることが望ましい。カテゴリーアプローチの検証において、ジメチルアニリン類について構造類似化合物の物理化学的性状についてカテゴリー評価の妥当性が認められた OECD 提出文章の作成を行った。今後は、ヒト健康影響についてもカテゴリー評価の検討を行い、SIAM 会議において評価結果の妥当性や信頼性について議論することにより本手法の信頼性および効果的な適用について検討を進める。

加盟各国における構造活性相関やカテゴリーアプローチの利用状況について情報収集を行った結果、カテゴリーアプローチに関しては、OECD SIAM 等で実際の評価に一部利用されつつあるが、構造活性相関の利用は、物理化学的性状や環境有害性において限定的ではあるが利用されているものの、本研究班で検討しているヒト健康影響分野での利用は、各国とも検討段階であり、特に *in vivo* 毒性に関しては、現時点では利用可能な手法がないとの認識であった。これに対し OECD では、反復投与毒性に関しては、毒性予測のための AOP（毒性パスウェイ）の構築・整備について活発な議論がされており、引き続き情報収集及び検討の必要があると考察された。

E. 結論

これまでの検討により *in vitro* 染色体異常予測については、ある程度の予測精度が検証出来たものの高濃度でのみで陽性反応を示す化合物に基づく不確定なアラートの削除等により予測精度向上が可能であることが明らかとなった。一方、*in vivo* 遺伝毒性や反復投与毒性予測においては、様々な背景メカニズムによって引き起こされる障害であることから、それらを分類したアラートやモデル構築さらには代謝や生物学的利用率等を考慮したメカニズムベースのモデルの構築が必要である。一方、さらに多くの化学物質について信頼出来る予測を実現するには、適用可能なケミカルスペース（アプリカビリティードメイン）を明確化するとともに、ケミカルスペースの拡大が重要である。ヒト健康影響分野における構造活性相関やカテゴリーアプローチの利用に関しては、各国ともまだ検討段階であり、特に反復投与毒性を始めとする *in vivo* 毒性の予測については、アプローチの仕方も含め議論の余地のあるところであり、今後とも国際協調のもとでの研究推進、情報交換が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto M, Hirose A, Ema M. ;Developmental toxicity of nitrophenolic herbicide dinoseb, 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol. *Herbicides and Environment*, Edited by Kortekamp A, InTech (Croatia, Rijeka), ISBN 978-953-307-476-4 ,543-560,(2011)
2. 本間正充 ;構造活性相関による遺伝毒性の予測 国立医薬品食品研究所報告, 128,39-43,(2010)
3. 小野 敦 ;*in vivo* 反復投与毒性の構造活性相関による予測評価の展望 国立医薬品食品研究所報告, 128,44-49,(2010)
4. 広瀬明彦 ;レギュラトリーサイエンスにおけるコンピュータを用いた構造活性予測研究の現状と展望 国立医薬品食品研究所報告, 128,27-28,(2010)
5. "Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Miyajima A, Sunouchi M, Goda Y ;Determination of a new designer drug, N-hydroxy-3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolites in rats using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int*, 198(1-3),62-69,(2010)"
6. Matsumoto M, Fujii S, Hirose A. and Ema M. ;Prenatal developmental toxicity of gavage or feeding doses of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol in rats. *Reprod Toxicol*, 29(3),292-297,(2010)
7. 江馬 眞、小林憲弘、納屋聖人、花井荘輔、中西準子 ;二酸化チタンの発がん性評価 環境毒性学会誌, 13(1),15-26,(2010)
8. Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S. and Nakanishi J. ;Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod Toxicol*, 30(3),343-352,(2010)
9. Kobayashi N, Naya M, Ema M, Endoh S, Maru J, Mizuno K, Nakanishi J. ;Biological response and morphological assessment of individually dispersed multi-wall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats. *Toxicology*, 276(3),143-153,(2010)
10. 高橋美加、松本真理子、宮地繁樹、菅野誠一郎、菅谷芳雄、平田睦子、鎌田栄一、江馬 眞、広瀬明彦 ;OECD 化学物質対策の動向 (第 16 報) -第 27 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2008 年オタワ)

- 化学生物総合管理学会誌, 6(2),180-188,(2010)
11. 江馬 眞、納屋聖人、吉田喜久雄、永翁龍一 ;次世代の冷媒の候補とされている 2,3,3,3-Tetrafluoroprop-1-ene (HFO-1234yf)の毒性評価 環境毒性学会誌, 13(2),73-84,(2010)
 12. 江馬 眞、小林憲弘、納屋聖人、花井荘輔、中西準子 ;種々の暴露経路による二酸化チタンの体内分布及び毒性 環境毒性学会誌, 13(2),85-103,(2010)
 13. Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, Hirose A, Imai T, Ogawa K, Ema M. and Nishikawa A. ;Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats. *Reprod Toxicol*, 31(2),219-230,(2011)
 14. Yahia D, El-Nasser MA, Abedel-Latif M, Tsukuba C, Yoshida M, Sato I, Tsuda S. ;Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure to pregnant mice on reproduction. *J Toxicol Sci.*, 35(4),527-33,(2010)
 15. Kawanoto K, Sato I, Yoshida M, Tsuda S ;Air purifiers that diffuse reactive oxygen species potentially cause DNA damage in the lung. *J Toxicol Sci*, 35(6),929-933,(2010)
 16. Kawanoto K, Sato I, Tsuda S, Yoshida M, Yaegashi K, Saito N, Liu W, Jin Y. ;Ultrasonic-induced tonic convulsion in rats after subchronic exposure to perfluorooctane sulfate (PFOS). *J. Toxicol Sci*, 36(1),55-62,(2011)
2. 学会発表
1. Mekenyan, O., Ptkov, P., Todorov, M., Kotov, S., Stoeva, S., Dimitrov, S., Honma, M., Hayashi, M., Benigni, R.; Modeling in vivo micronucleus test by simulating detoxification pathways. *QSAR2010*, (2010.5)
 2. 本間 正充 ; 遺伝毒性試験とその科学的リレバンス 第11回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会 (2010.6)
 3. 本間 正充 ; リスク評価における in vitro 遺伝毒性試験の役割 第37回日本トキシコロジー学会学術年会(2010.6)
 4. 森田 健、森川 馨 ; GHS 分類における専門家判断の適用、第 37 回日本トキシコロジー学会、沖縄、(2010.6)
 5. 森田 健、本間正充、福島久美子、森川馨; In vitro 染色体異常試験における 1 mM の上限濃度は一般化学物質においても許容できるか? 第39回日本環境変異原学会、つくば、(2010.11)
 6. 森田 健、本間正充、森川 馨 ; 一般化学物質における哺乳類培養細胞を用いる遺伝毒性試験の最高濃度、日本薬学会第131年会、静岡、(2011.03)
 7. 宇佐見誠、宮島敦子、満長克祥、簾内桃子、関野祐子 ラット着床胚におけるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼのチャージバリエーション発現に関する研究 第37回日本トキシコロジー学会学術年会(2010.6)
 8. 松岡厚子、宮島敦子、加藤玲子、酒井恵子、高久彩子、谷口彰良 各種細胞毒性試験のナノ粒子に対する感受性 環境変異原学会第39回大会 (2010.11)
 9. M. Sunouchi, A. Miyajima-Tabata, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda O- and N-demethylation of levomethorphan by human cytochrome P450 enzymes., The 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2011.3)
 10. Ono A, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Matsumoto K, Kawabata M, Yajima K, Matsuyama T, Kamata E, Ema M. ,Gender-related differences of the

- hepatic enzyme activities in relation to the toxicity of benzotriazole ultraviolet absorber in rats. The 12th International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.7)
11. Naya M, Kobayashi N, Ema M, Nakanishi J. ,Pulmonary responses to multi-wall carbon nanotubes after single intratracheal instillation in rats. The 12th International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.3)
12. Ema M, Naya M, Yoshida K, Nagaosa R. ,Developmental toxicity of hydrofluorocarbons used as refrigerants. The 12th International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain (2010.3)
13. Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, Hirose A, Hasegawa R, Imai T, Ogawa K, Ema M, Nishikawa A. , Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate administered via drinking water to rats. The 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. Washington, DC, USA (2011.3)
14. Naya M, Kobayashi N, Endoh S, Mizuno K, Nagaosa R, Ema M, Nakanishi J., Pulmonary toxicity of crystalline silica after a single intratracheal instillation in rats. The 50th Annual Meeting of the Society of Toxicology. ,Washington, DC, USA (2011.3)
15. 小野 敦 "in vitro 内分泌かく乱試験法の OECD ガイドライン受け入れ (パネルディスカッション・In vitro トキシコロジー試験法の行政的な受け入れ)"第 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会 (沖縄) (2010.6)
16. F.Deal, W.Casey, P.Ceger, D.Allen, C.Yang, M.Nakamura, H.Kojima, A.Ono, H.Yoon, S.Han, W.Stokes "International Validation Study of an in vitro Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and Antagonists in MCF - 7 cell" 50th Annual Meeting of Society of Toxicology (Washington DC, USA) 2011.3
17. 吉田緑、河部真弓、古川文夫、井上薫、高橋美和、広瀬明彦、西川秋佳: 酸化チタン曝露ラットの肺の経時的変化とチタンの局在. 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集 S128、(2010.6)
- G. 知的所有権の取得状況
(該当なし)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)およびカテゴリーアプローチ
の実用化に関する研究（H21-化学-一般-002）

－遺伝毒性の予測に関する研究－

研究代表者	本間正充	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第一室長
研究分担者	森田 健	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室室長
研究分担者	宮島敦子	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部第二室長
研究協力者	O. Mekenyan	ブルガス大学数学化学研究室教授
研究協力者	福島久美子	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室
研究協力者	三島 雅之	中外製薬株式会社
研究協力者	若田 明彦	アステラス製薬株式会社
研究協力者	濱田 修一	三菱化学メディエンス株式会社
研究協力者	馬庭 二郎	アストラゼネカ株式会社

要旨

哺乳類培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験（CA）について、医薬品で検討されている試験最高濃度低減化の妥当性について検討するため、既存化学物質 249 物質データセットにおいて陰性判定となる化合物の陰性妥当性について検証を行った結果、35 物質に *in vivo* 遺伝毒性誘発性あるいは発がん誘発性に関する懸念は低く、懸念のある物質は 1 つであったことから、試験最高濃度の 1 mM 上限濃度が、一般化学物質においても適用可能であることが示された。さらに、最高濃度の低減化に伴う DEREK、Multicase、AdomeWorks それぞれによる染色体異常試験モデルの予測率の向上について検討を行った結果、感受性もしくは一致率の向上が認められ、高濃度でのみで陽性反応を示す化合物に基づく不確定なアラートの削除等により予測精度向上が可能であることが明らかとなった。*in silico* における生体内反応の予測性向上のため組織代謝シミュレータ TIMES を用いた検討を行った。S9 代謝シミュレータを構築し、AMES 試験結果予測への適用について検討をした結果、合理的な反応性代謝物が生成されていることが確認できた。また、*in vivo* 遺伝毒性の予測に向けて *in vivo* 小核試験のデータの精査と、*in vitro* CA モデルによる小核試験の予測を行った結果、擬陽性 (FP) となる化学物質が多く *in vivo* における解毒ロジックの追加の必要性及び一部の化合物では評価に用いた試験結果に対する専門家レビューが必要であることが示された。

1. 最高濃度の低減に伴う染色体異常試験陰性化合物の陰性妥当性評価

1.1 既存化学物質 249 物質データセット

哺乳類培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験 (CA) は、発がん物質に対する感受性が高い一方、非発がん物質に対する特異性が低いことが問題となっている。そのため、医薬品では、試験限度濃度を 10 mM から 1 mM に低減することがほぼ合意されている。一般化学物質についてもこの低減を支持する知見が得られつつある。すなわち、1994~2006 年に本邦で実施された 249 の既存化学物質の GLP による *in vitro* CA データを解析した結果、113 物質 (45%) が陽性と評価されていた。最高濃度を 10, 5, 2, 1 mM と低減した場合の陽性率は、それぞれ 43% (108/249), 36% (89/249), 37% (66/249), 24% (59/249) であった。49 物質が 1~10 mM の濃度を必要とし、内 13 物質が Ames 試験で陽性であったことから、1 mM 上限濃度では

36 物質が遺伝毒性検出不可となる (図 1)。そこで、*in vitro* CA においてこれら 36 物質が陰性と評価されることの妥当性を検証した。36 物質中 17 物質は、低 pH や高細胞毒性などによる“irrelevant”な陽性と判断された (図 2、別添 1)。次に残りの 19 物質について、DEREK および TIMES による警告構造解析を行ったところ、8 物質 (#60, #70, #76, #89, #92, #102, #110, #112) には警告構造がなく、11 物質 (#65, #68, #71, #75, #79, #83, #91, #96, #98, #99, #111) にいずれかのシステムで警告構造が認められた (表 1、図 2)。

これら警告構造の認められた 11 物質について、*in vivo* 小核試験 (MN) や発がん性関連知見、化学物質クラス等によりその妥当性を評価した。2 物質 (#71, #79) は *in vitro* CA では S9 mix 存在下のみで陽性を示したものの、*in vivo* MN では陰性知見が得られており、懸念は低いと判断された。警告構造から懸念があるとされる残りの 9 物質 (#65, #68, #75, #83, #91, #96, #98, #99, #111) については、以下のように評価した：

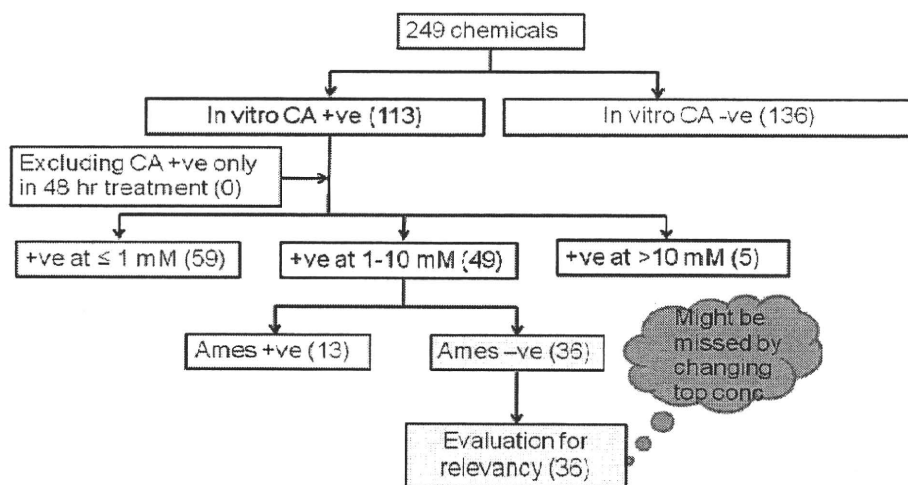


図 1 249 物質のうち 1 mM 最高濃度により遺伝毒性不検出を示す物質数

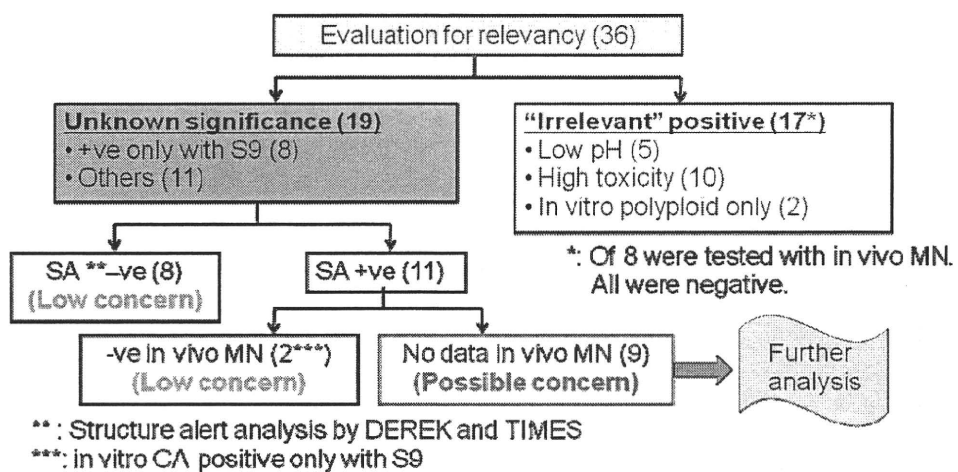



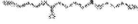

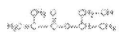
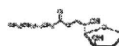

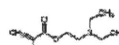





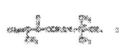

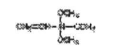
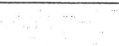


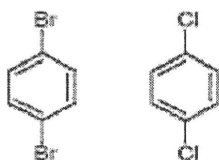
図2 36 遺伝毒性不検出物質 (1-10 mM で CA 陽性かつ Ames 陰性) の *in vitro* CA 誘発の妥当性評価

表1. 1mM以上の濃度で染色体異常性を示し、且つ遺伝毒性が懸念される19物質の警告構造解析

ID No.	Chemical Name	CAS	Mol. Structure	Irrelevance	CA or Mutagenicity Alert by DEREK	CA Alert by TMES	Note
60	2-Hydroxypropanenitrile	78-97-7			No alert	No alert	Low concern
65	1,4-Dibromobenzene	106-37-6			No alert	Metabolite(s): Epoxides aziridines -> Interaction with topoisomerases/proteins -> CA	Only with S9, In vivo MN -ve for 1,4-Dichlorobenzene (106-46-7, non-genotoxic carcinogen), Low concern due to non-DNA reactive
68	N-Methylaniline	100-61-6			No alert	Metabolite(s): Hydronit amines -> Interaction with DNA -> CA	Yield aniline (in vivo MN +ve) in rat or rabbit, Concern
70	Dibutyl adipate	105-98-7			No alert	No alert	Only with S9, Low concern
71	2-Mercaptobenzimidazole	583-39-1			Benzimidazole -> Mutagenicity	Parent & Metabolite(s): Thioles -> Interaction with topoisomerases/proteins -> CA	Only with S9, In vivo MN -ve, Ames -ve, Low concern
75	Methacrylic acid, monoester with propane-1,2-diol	27813-02-1			alpha,beta-Unsaturated ester -> CA	Parent & Metabolite(s): Other unsaturated functional cmpds acrylates -> Interaction with DNA & topoisomerases/proteins -> CA; Unsaturated aldehydes -> Interaction with topoisomerases/proteins -> CA	Low concern as methacrylates
76	Sorbitan monooleate	1338-41-6			No alert	No alert	Only with S9, No evidence of carcinogenicity in mice (limited study), No evidence of carcinogenic potential for sorbitan monooleate in rats and mice, Low concern
79	N,N-Dimethylbenzylamine	103-83-3			No alert	Metabolite(s): Benzylamines-Theoretical -> Interaction with DNA -> CA	Only with S9, In vivo MN -ve, Low concern
83	2-(Diethylamino)ethyl methacrylate	105-16-8			alpha,beta-Unsaturated ester -> CA	Metabolite(s): Unsaturated aldehydes -> Interaction with topoisomerases/proteins -> CA	Only with S9, Low concern as methacrylates
89	Trimethoxyphosphine	121-45-9			No alert	No alert	Low concern
91	2,4-Dinitrophenol	51-28-5			Aromatic nitro -> Carcinogenicity; Polynitrophenol or precursor -> CA	Parent & Metabolite(s): Nitro cmpds -> Interaction with DNA -> CA; Amines, aminophenols and phenyleamines, aminophenols, hydroxylamines -> Interaction with DNA & topoisomerases/proteins -> CA	Metabolic poison (uncouples oxidative phosphorylation), Reduce ATP levels, In vitro CA +ve at cytotoxic levels in CHO or TK cells, Low concern
92	Trimethylamine	75-50-3			No alert	No alert	Low concern
96	2-Chlorophenol	95-57-8			Halophenol -> CA	No alert	In vivo MN -ve, Not found to be carcinogenic in rat, Low concern
98	p-Nitrophenol sodium salt	824-78-2			No alert	Parent & Metabolite(s): Nitro cmpds -> Interaction with DNA; Amines, aminophenols and phenyleamines, aminophenol -> Interaction with DNA & interaction with topoisomerases/proteins -> CA; Hydroxylamines -> Interaction with DNA -> CA	In vivo MN -ve for free base (100-02-7), Low concern
99	(Methacryloyloxyethyl)trimethylammonium chloride	5039-78-1			alpha,beta-Unsaturated ester -> CA	Parent: Other unsaturated functional cmpds, Alkylamido betaines-Theoretical -> Interaction with DNA & topoisomerases/proteins -> CA	Only with S9, Low concern as methacrylates
102	Ferrous sulfate heptahydrate	7782-83-0	FeSO ₄ · 7H ₂ O		No alert	No alert	Iron category substances are not mutagenic in vivo, No increase in tumour incidence for ferric chloride, Low concern
110	2-(Di-n-butylamino)ethanol	102-81-8			No alert	No alert	Low concern
111	Ethenyltrimethoxysilane	2766-02-7			No alert	Metabolite(s): Epoxides aziridines -> Interaction with topoisomerases/proteins -> CA	Only with S9, Class effect in alkoxy silane, but in vivo MN -ve for [3-(Methacryloxy)propyl]trimethoxysilane (2530-85-0), Low concern due to CA induction by non-DNA reactive MOA
112	C.I. Fluorescent brightener 271	41267-43-0			No alert	Not applied due to too large molecule	Low concern

● #65; 1,4-Dibromobenzene (106-37-6)

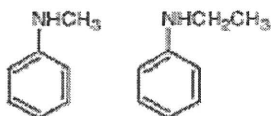
類似ハロゲン化ベンゼンの1,4-Dichlorobenzene (106-46-7) は、non-genotoxic carcinogen とされており、in vivo MN 陰性である。加えて、本物質のTIMESによる alert は、アジリジンエポキシサイド代謝物によるトポイソメラーゼとの相互作用による *in vitro* CA 誘発とされ、DNA reactive なものではなく、懸念のレベルは低いと判断された。



106-37-6 106-46-7

● #68; N-Methylaniline (100-61-8)

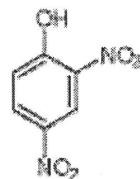
本物質は、ウサギやラットでは代謝され Anilin (62-53-3, *in vivo* MN 陽性)を生成する。類似物質の#69; N-Ethylaniline (103-69-5)は高毒性による irrelevant な陽性と考えられるが、本物質の *in vitro* CA 誘発はそれには該当せず、懸念が残された。



100-61-8 103-69-5

● #91; 2,4-Dinitrophenol (51-28-5)

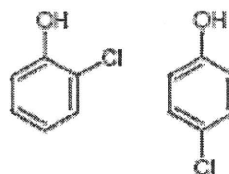
本物質は metabolic poison であり細胞の ATP レベルを下げる。CHO あるいは TK 細胞を用いた検討では、50%を超える細胞毒性で陽性となり、懸念のレベルは低いと判断された。



51-28-5

● #96; 2-Chlorophenol (95-57-8)

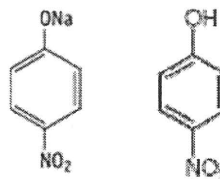
類縁物質の#35; 4-Chlorophenol (106-48-9) は 1 mM 以下で *in vitro* CA 陽性を示す。2-CPについては *in vivo* MN の陰性知見があり (未公表資料)、またラット 2 年間飲水投与試験で発がん性は認められていないことから、懸念のレベルは低いと判断された。



95-57-8 106-48-9

● #98; *p*-Nitrophenol sodium salt (824-78-2)

遊離塩基の *p*-Nitrophenol (100-02-7) は *in vivo* MN 陰性であることから、懸念のレベルは低いと判断された。



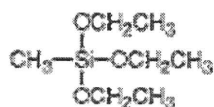
824-78-2 100-02-7

● #111; Ethyltrimethoxysilane (2768-02-7)

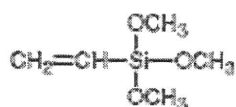
アルコキシシランの Methyltriethoxysilane (2031-67-6) および

3-(Methacryloyloxy)propyltrimethoxysilane (2530-85-0) は、ともに in vitro CA 陽性だが、後者は in vivo MN で陰性であった。本物質の TIMES による alert は、アジリジンエポ

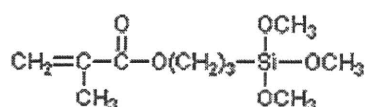
キシド代謝物によるトポイソメラーゼとの相互作用による in vitro CA 誘発とされ、DNA reactive なものではなく、懸念のレベルは低いと判断された。



2768-02-7



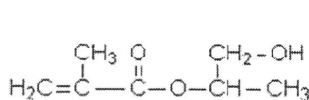
2031-67-6



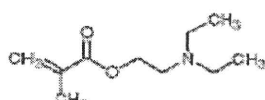
2530-85-0

● #75; Methacrylicacid, monoester with 1,2-propanediol (27813-02-1); #83; 2-(Diethylamino)ethyl Methacrylate (105-16-8); #99; Methacryloethyl trimethyl ammonium chloride (5039-78-1) メタクリル酸化合物である #74; tert-Butyl-methacrylate (585-07-9), #77; 2-Hydroxyethyl methacrylate (868-77-9)は高毒性による irrelevant な陽性と考えられ、また、#181; Butyl methacrylate (97-88-1)および #191; 2-Ethylhexyl methacrylate (688-84-6)は

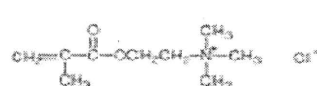
in vitro CA 陰性であった。さらに、#85; 2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate (2867-47-2)は、本邦の検討では Ames, in vitro CA とともに陽性だが、in vivo MN 陰性知見があり、SIDS では in vivo 遺伝毒性陰性としている。以上より、表記 3 物質の懸念のレベルは低いと判断された。なお、メタクリル酸化合物で Ames および in vivo MN で陽性を示したのものには、#20; 2,3-Epoxypropyl methacrylate (106-91-2)がある。



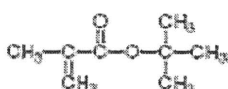
27813-02-1



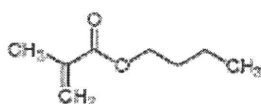
105-16-8



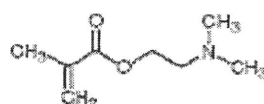
5039-78-1



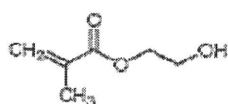
585-07-9



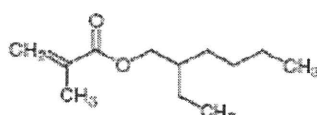
97-88-1



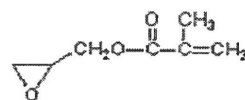
2867-47-2



868-77-9



688-84-6



106-91-2

上記より、警告構造から懸念があるとされる9物質のうち、最終的に懸念のある物質は#68のN-Methylaniline (100-61-8)のみであった。

In vitro CAにおいて最高濃度の低減化に伴い陰性と評価される36物質の陰性妥当性を評価した結果、35物質にin vivo遺伝毒性誘発性あるいは発がん誘発性に関する懸念は低く、懸念のある物質は1つであった。1 mM 上限濃度を本データセットに適用した場合、陽性率は24% (59/249) に半減し、1 mM 超濃度でのみ“relevant”な可能性のあるin vitro CA陽性で、かつ、Ames陰性の物質の割合は、in vitro CA陽性全体の中で極めて低かった(1%, 1/108)。これらの知見は、1 mM 上限濃度が、一般化学物質においても適用可能であることを示唆している。

1.2 追加の既存化学物質データセットでin vitro 染色体異常試験陽性を示した9物質

最近の既存化学物質評価においてin vitro 染色体異常試験(CA)で陽性を示した9物質について、異常誘発の最低有効濃度

(Lowest Effective Concentration, LEC)の解析ならびに誘発性の内容を評価した。その結果、 ≤ 1 mM, 1-2 mM, 2-5 mMのLECがそれぞれ5物質(#2a, 5a, 6a, 8a, 9a), 1物質

(#1a), 3物質(#3a, 4a, 7a)あり、試験最高濃度を10 mMから1 mMに低減すると4物質(#1a, 3a, 4a, 7a)が陰性と評価されることとなる。

また、CA誘発の妥当性を評価したところ、9物質中6物質(#3a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a)はHTCあるいはHTC様作用によると考えられ、また、その他の理由から懸念は低いものと判断された(別添2)。なお、#9aはHTCと考えられたが、Ames試験陽性であることから懸念が残される。これらの結果を表2にまとめた。

- ✓ #1a; Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt (70974-33-3)
- ✓ #2a; alpha,4-Dichlorotoluene (104-83-6)
- ✓ #3a; 1,3-Bis(aminomethyl)cyclohexane (2579-20-6)
- ✓ #4a; 1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5h)-trithione (638-16-4)
- ✓ #5a; 2,3,4,4'-Tetrahydroxybenzophenone (31127-54-5)
- ✓ #6a; 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (4130-42-1)
- ✓ #7a; 2-Nitro-p-crezol (119-33-5)
- ✓ #8a; 4-Chloro-m-cresol (59-50-7)
- ✓ #9a; 4-Chloro-2-nitroaniline (89-63-4)

表2. 追加の既存化学物質評価においてin vitro染色体異常試験で陽性を示した9物質の最低有効濃度および異常誘発の妥当性評価

Code No.	Chemical Name	CAS	MW	in vitro CA	LEC	Note	Note (Ames)
1	Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt	70974-33-3	465.1	+	1-2 mM	1.1-1.6 mM	-
2	alpha,4-Dichlorotoluene	104-83-6	161.0	+	≤1 mM	0.08 mM	-
3	1,3-Bis(aminomethyl)cyclohexane	2579-20-6	142.2	+	2-5 mM	2.8 mM HTC	-
4	1,3,5-Triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trithione	638-16-4	177.3	+	2-5 mM	4.5 mM HTC-like	-
5	2,3,4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	31127-54-5	246.2	+	≤1 mM	0.1 mM Weak effect; Unclear dose-response; In vivo mouse MN -ve (ip x3) in benzophenone (119-61-9)	-
6	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	4130-42-1	234.4	+	≤1 mM	0.19 mM S9 only +ve Weak effect; HTC	-
7	2-Nitro- <i>p</i> -cresol	119-33-5	153.1	+	2-5 mM	2.6-3.3 mM S9 only +ve HTC-like	-
8	4-Chloro- <i>m</i> -cresol	59-50-7	142.6	+	≤1 mM	0.98 mM HTC In vivo mouse MN -ve (ip, 125 mg/kg), in vitro UDS -ve (HSDB/EPA RED)	-
9	4-Chloro-2-nitroaniline	89-63-4	172.6	+	≤1 mM	0.58 mM S9 only +ve HTC	+