

- Henry's law constant

Values of the partition soil adsorption coefficient on the category member substances are shown in Table 11. As no data is available on this endpoint for the category member substances except 3,4-dimethylaniline, Henry's law constant are calculated with vapour pressure divided by water solubility. At the same time, estimation method with HENRYWIN (version 3.20) is used. Estimation result of HENRYWIN with bond estimation method does not distinguish the difference of the structure of the category member substances.

Henry's law constant of 0.18-1.1 Pa.m³/mole at 20-25 °C suggests that volatilization of category member substances from water is slow (Lyman W.J. et al., 1990).

Table 11: Henry's law constant of dimethylanilines

Substance	Value	Reliability	Reference
2,3-Dimethylaniline	0.18 Pa.m ³ /mol at 25 °C ¹⁾	2	-
	0.235 Pa.m ³ /mol at 25 °C by HENRYWIN	2	US EPA, 2008c
2,4-Dimethylaniline	0.26 Pa.m ³ /mol at 25 °C ²⁾	2	-
	0.235 Pa.m ³ /mol at 25 °C by HENRYWIN	2	US EPA, 2008c
2,5-Dimethylaniline	0.43 Pa.m ³ /mol at 20-25 °C ³⁾	2	-
	0.235 Pa.m ³ /mol at 25 °C by HENRYWIN	2	US EPA, 2008c
2,6-Dimethylaniline	1.1 Pa.m ³ /mol at 20-25 °C ⁴⁾	2	-
	0.235 Pa.m ³ /mol at 25 °C by HENRYWIN	2	US EPA, 2008c
3,4-Dimethylaniline	0.188 Pa.m ³ /mol at 25 °C	2	Jayasinghe D.S. et al., 1992
	0.18 Pa.m ³ /mol at 25 °C ⁵⁾	2	-
	0.235 Pa.m ³ /mol at 25 °C by HENRYWIN	2	US EPA, 2008c
3,5-Dimethylaniline	0.45 Pa.m ³ /mol at 25 °C ⁶⁾	2	-
	0.235 Pa.m ³ /mol at 25 °C by HENRYWIN	2	US EPA, 2008c

- 1) Henry's Law Constant is calculated with vapour pressure of 10 Pa 25 °C divided by water solubility of 6.6 g/L at 25 °C.
- 2) Henry's Law Constant is calculated with vapour pressure of 13.1 Pa 25 °C divided by water solubility of 6.1 g/L at 25 °C.
- 3) Henry's Law Constant is calculated with vapour pressure of 20 Pa 20 °C divided by water solubility of 5.6 g/L at 25 °C.
- 4) Henry's Law Constant is calculated with vapour pressure of 63.2 Pa 25 °C divided by water solubility of 6.98 g/L at 20 °C.

- 5) Henry's Law Constant is calculated with vapour pressure of 3.72 Pa 25 °C divided by water solubility of 2.5 g/L at 25 °C.
- 6) Henry's Law Constant is calculated with vapour pressure of 17 Pa 25 °C divided by water solubility of 4.6 g/L at 25 °C.

1.4 Category Justification

The dimethylaniline category consists of six chemicals: 2,3-dimethylaniline (87-59-2), 2,4-dimethylaniline (95-68-1), 2,5-dimethylaniline (95-78-3), 2,6-dimethylaniline (87-62-7), 3,4-dimethylaniline (95-64-7) and 3,5-dimethylaniline (108-69-0).

All category member substances are liquid at standard temperature and pressure except for 3,4-dimethylaniline. Based on the sameness of basic molecular structures, which is direct connection of one methyl functional group (-CH₃) and two amino functional groups (-NH₂) to a benzene-ring, all physical-chemical properties are very close in this category member substances. This sameness of basic molecular structure enables the category assessment.

2 GENERAL INFORMATION ON EXPOSURE

2.1 Production Volumes and Use Pattern

Production Volumes

Total volume of production and/or import of each dimethylaniline in Japan is not available. According to the survey on produced and imported amounts of chemical substances by the Ministry of Economy, Trade and Industry in Japan, total amount of manufacture and import of "dialkyl (C = 1 - 5) aniline" substances in Japan was reported to be 1,000 – 10,000 tones in 2007 [NITE (2011)].

- 2,3-dimethylaniline

Annual volume of production and import on 2,3-dimethylaniline in Japan were 400 tons and 50 tons respectively around 1997 – 1998. Production of this chemical was discontinued in 2004 and after that only import is conducted in Japan. Volume of import into Japan was 30 tons/year – 40 tons/year around 2005 [MoE (2009a)]. Worldwide production volume is not available.

- 2,4-dimethylaniline

Total volume of production and import on 2,4-dimethylaniline in Japan was 512 tons in fiscal year of 2009 according to the notification based on the Chemical Substances Control Law in Japan [NITE (2011)]. Production and/or import volume on 2,4-dimethylaniline in USA was 500,000 pounds – 1 million pounds (227 tones – 454 tones) in 2006 according to IUR information by US-EPA [US EPA (2011)]. Worldwide production volume is not available.

- 2,5-dimethylaniline

No detailed information is obtained on 2,5-dimethylaniline on the production and import volume in Japan. Production and/or import volume on 2,5-dimethylaniline in USA was less than 500,000 pounds (227 tones) in 2006 according to IUR information by US EPA [US EPA (2011)]. Worldwide production volume is not available.

- 2,6-isomer

Annual volume of production and import on 2,6-dimethylaniline in Japan were 30 tons and 150 tons – 200 tons respectively around 1997 – 1998. Production of this chemical was discontinued in 2000 and after that volume of 20 tons/year – 30 tons/year was import into Japan [MoE (2009b)]. According to the notification based on the Chemical Substances Control Law in Japan, total volume of production and import on this chemical in fiscal year 2009 was less than 100 tons [NITE (2011)]. Production and/or import volume of 2,6-dimethylaniline in USA was less than 500,000 pounds (227 tones) in 2006 according to IUR information by US-EPA [US EPA (2011)]. Worldwide production volume is not available. Worldwide production volume is not available.

- 3,4-isomer

Annual volumes of production and import on 3,4-dimethylaniline in Japan were 200 tons around 1997 – 1998 [MoE (2009c)]. According to the notification based on the Chemical Substances Control Law in Japan, the total volume of production and import on this chemical in fiscal year 2009 was less than 100 tons [NITE (2011)]. Worldwide production volume is not available.

- 3,5-isomer

According to the notification based on the Chemical Substances Control Law in Japan, total volume of production and import on 3,5-dimethylaniline in fiscal year 2009 was less than 100 tons [NITE (2011)]. Worldwide production volume is not available.

Production methods

Use Pattern

2.2 Environmental Exposure and Fate

2.2.1 Sources of Environmental Exposure

2.2.2 Photo-degradation

2.2.3 Stability in Water

2.2.4 Transport between Environmental Compartments

2.2.5 Biodegradation

2.2.6 Bioaccumulation

2.3 Human Exposure**2.3.1 Occupational Exposure****2.3.2 Consumer Exposure****3 HUMAN HEALTH HAZARDS****4 HAZARDS TO THE ENVIRONMENT**

5 REFERENCES

CERI (1989a) Measurement of physical-chemical properties on 2,3-dimethylaniline, Report Number: 81024K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (1989b) Measurement of physical-chemical properties on 2,5-dimethylaniline, Report Number: 81025K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (1989c) Measurement of physical-chemical properties on 3,5-dimethylaniline, Report Number: 81026K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (1989d) Measurement of partition coefficient between 1-octanol and water on 2,3-dimethylaniline, Report Number: 81024K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (1989e) Measurement of partition coefficient between 1-octanol and water on 2,5-dimethylaniline, Report Number: 81025K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (1989f) Measurement of partition coefficient between 1-octanol and water on 3,5-dimethylaniline, Report Number: 81026K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (1989g) Measurement of dissociation constant in water on 2,3-dimethylaniline, Report Number: 81024K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (1989h) Measurement of dissociation constant in water on 2,5-dimethylaniline, Report Number: 81025K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (1989i) Measurement of dissociation constant in water on 3,5-dimethylaniline, Report Number: 81026K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (2001a) Measurement of partition coefficient between 1-octanol and water on 2,6-dimethylaniline, Report Number: 81548K (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (2002a) Hazard Data Book for Chemical Substances on 2,6-dimethylaniline, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (2002b) Hazard Data Book for Chemical Substances on 3,4-dimethylaniline, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (2003a) Measurement of melting point on 2,6-dimethylaniline, Report Number: 805130 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (2003b) Measurement of boiling point on 2,6-dimethylaniline, Report Number 805131 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (2003c) Measurement of vapour pressure on 2,6-dimethylaniline, Report Number: 805132 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (2003d) Measurement of water solubility on 2,6-dimethylaniline, Report Number: 805133 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

CERI (2003e) Measurement of dissociation constant in water on 2,6-dimethylaniline, Report Number: 805135 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

Hansch C., Leo A. and Hekman D. (1995) Exploring QSAR – Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. American Chemical Society.

Howard P.H. and Meylan W.M. (ed) (1997) Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals, CRC Press, Inc.

Jayasinghe D.S., Brownawell B.J., Chen H. and Westall J.C. (1992) Determination of Henry's constants of organic compounds of low volatility: methylanilines in methanol-water. Environ. Sci. Technol. 26, 2275-2281.

Lide D.R. (ed) (2008) CRC Handbook of Chemistry and Physics, version 2008. CRC Press Inc.

Lyman W.J. Reehl W.F. and Rosenblatt D.H. (1990) Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Chapter 15 Volatilization from Water. McGraw-Hill Book Company.

MoE (2009a) Initial Environmental Risk Assessment Report on 2,3-dimethylaniline (in Japanese), Ministry of Environment in Japan.

MoE (2009b) Initial Environmental Risk Assessment Report on 2,6-dimethylaniline (in Japanese), Ministry of Environment in Japan.

MoE (2009c) Initial Environmental Risk Assessment Report on 3,4-dimethylaniline (in Japanese), Ministry of Environment in Japan.

NITE (2011) Chemical Risk Information Platform, <http://www.safe.nite.go.jp/english/db.html>, National Institute of Technology and Evaluation.

Seidel A. (ed) (2004) Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, fifth edition, volume 2, Wiley-Interscience.

Speight J.G. (2005) Lange's Handbook of Chemistry, 16th edition, McGraw-Hill.

USEPA (2008a) MPBPWIN. version 1.43. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., USA.

USEPA (2008b) WSKOW. version 1.41a. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., USA.

USEPA (2008c) HENRYWIN. version 3.20. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., USA.

USEPA (2009) KOCWIN. version 2.00. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., USA.

USEPA (2011) Inventory Update Reporting (IUR)
information, <http://www.epa.gov/iur/tools/data/index.htm>. United States Environmental Protection
Agency. Washington D.C., USA.

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）

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

研究分担者 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
研究協力者 鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 研究官
研究協力者 スイロイ ホセ ㈱富士通九州システムエンジニアリング

要旨

昨年度、検討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予測精度向上について検討を行った結果、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ことから、特徴部分構造と構造から計算可能な記述子の両社を組み合わせることで予測精度向上が可能であることが示された。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。

1. ADMEworksによる化学物質部分構造
評価を組み合わせた肝毒性モデル予測精度
向上の検討

目的

本研究においては、これまでに in vivo 反復投与肝毒性に関して、DEREK による毒性アラートの抽出及び MultiCase、ADMEworks によ

る予測モデルの構築を進めてきた。しかし、これまでのところいずれの手法においても、あまり精度の高いモデルは得られていない。昨年度の検討において ADMEworks を用いて最大で 70%を超える一致率のモデルの構築に成功した。しかし、昨年度構築した ADMEworks モデルの構築には化合物記述子のみを予測モデル構築に用いたが、その予測結果では、

明らかに陽性化合物と思われる構造が偽陰性判定されていたことから、本年度は、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。

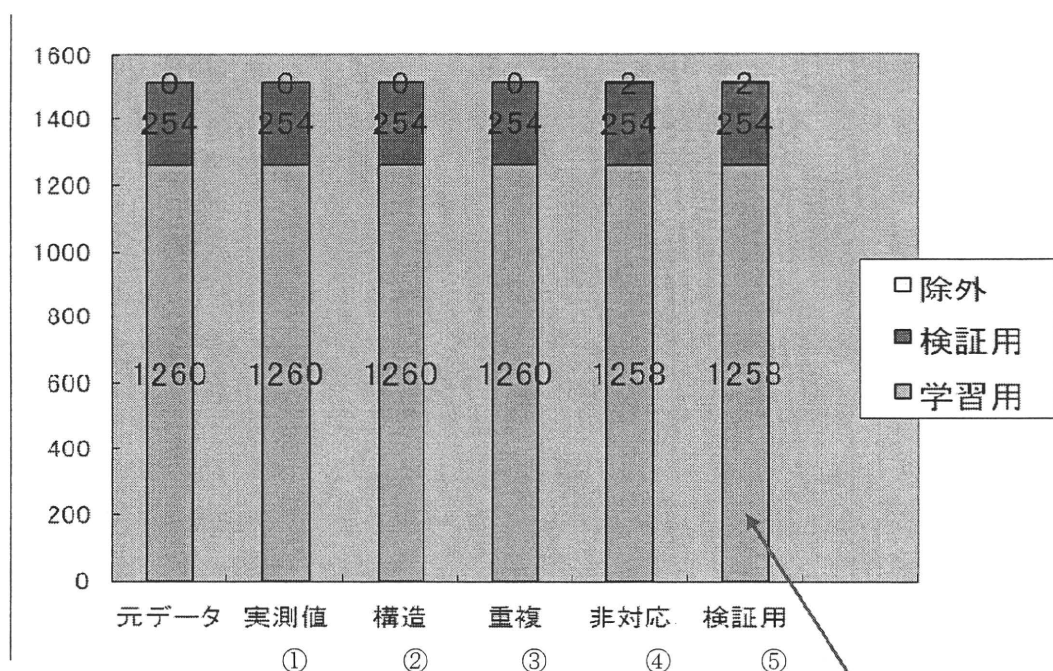
1 方法

2.1 データの整理

国立医薬品食品衛生研究所で整理した、化審法における新規化学物質審査及び既存化学物質点検における化合物構造情報及び毒性試験結果をもとに、投与量 1000mg/kg 未満において病理組織学的検査及び血清生化学的検査において肝毒性を示す所見が認められた化合物を肝毒性陽性化学物質と定義して、新規化学物質セットを学習セット、既存化学物質セットを外部検証用化合物セットとしてモデルの構築・評価に用いた。なお本年度の解析に用いたデータセットは昨年度、モデル構築及び外部検証に用いたデータセットとは独立のデータセットである。

まず初めに化学構造と実測値の中から、解析に相応しくないデータを除外して、データの整理を行った。具体的には元データ（学習用＝1260件、検証用＝254件）に対し、下記の作業を行った。

- ① 実測値がない、あるいは実測値が明らかでないデータのチェックで0件のデータを除外した。
- ② 金属系の原子、イオン、塩、壊れている構造のチェックで0件のデータを除外した。
- ③ 重複しているデータ、特に実測値が矛盾しているデータのチェックで0件のデータを除外した。
- ④ 解析ツールが対応できない構造データのチェックで2件のデータを除外した。（下記を参照）
- ⑤ 学習用＝1258件と検証用＝254件を最終的に利用したデータ。



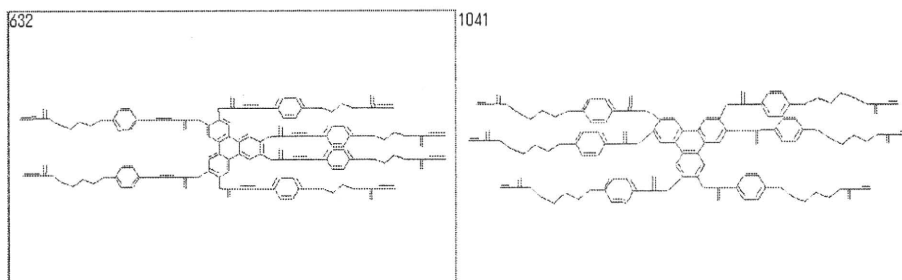
実際の解析に使用した母集団（1258件）

2.2 除外した化合物

解析ツールが対応できない（パラメータ計算ができない）ため、下記陰性化

化合物

（2件）は学習母集団から除外した。



2.3 パラメータ発生

弊社開発PKGであるModelBuilderV6.0(MB)を用いて401化学的パラメータ（トポロジカルや電子的、物理化学的など）を発生した。また、学習用と検証用母集団（計1512件）に共通した部分構造を【陽性】、【陰性】、【両方】という3種類に分けて、計221件の部分構造を抽出した（※ 詳細結果は添付表1参照）。221件の部分構造の各化合物での出現回数を計算して、221件の部分構造パラメータとして発生した。

発生したパラメータ数：

MBパラメータ（401件）＋部分構造（221件）＝622件

2.4 特徴・サンプル抽出

下記3手法を用いて、モデル作成に最適なパラメータの組み合わせを検証して、最終的には肝毒性予測に有効なパラメータに絞り込んだ（※ 詳細結果は添付表1参照）。

① Particle Swarm Optimization(PSO)

: 622件→82件

② Support Vector Machine(SVM)

: 82件→32件 (1回目)

③ AdaBoost(ADA)

: 82件→12件 (2回目)

2.5 モデル作成

上記の絞り込み結果1回目（32パラメータ）と2回目（12パラメータ）に分けて、さらに3つの手法：Support Vector Machine(SVM), K-Nearest Neighbor(KNN), ADABOOST(ADA) に関してモデル作成を行った。モデル構築に用いた1258化合物を用いた内部検証結果は下記の通りとなり、最大の分類率(99.7%)は SVM 手法による32パラメータを利用したモデル(T2class_CL_SVM_36)であった。但し、本モデルの外部検証結果は64.6%の低い予測率であった。

2.5.1) 3 2 パラメータを利用したモデルの内部検証結果：

SVM (T2class_CL_SVM_36)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	512	0	99.2
Predicted Negative	4	742	100.0
Total	516	742	99.7

KNN (T2class_CL_KNN_1)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	389	88	75.4
Predicted Negative	127	654	88.1
Total	516	742	82.9

ADA (T2class_CL_ADA_6)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	382	73	74.0
Predicted Negative	134	669	90.2
Total	516	742	83.5

2.5.2) 1 2 パラメータを利用したモデルの内部検証結果：

SVM (T2class_CL_SVM_56)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	405	109	78.5
Predicted Negative	111	633	85.3
Total	516	742	82.5

KNN (T2class_CL_KNN_3)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	410	100	79.5
Predicted Negative	106	642	86.5
Total	516	742	83.6

ADA (T2class_CL_ADA_2)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	404	75	78.3
Predicted Negative	112	667	89.9
Total	516	742	85.1

2.6 モデルの検証
 学習母集団と重ならない外部検証用母集団
 (254 件) に対する検証結果は下記の通り
 であった。最大の予測率(76.0%)はSVM手法

による32パラメータを利用したモデル
 (T2class_CL_SVM_3)であった。本モデルの
 分類率も83.7%と高い値を示した。

2.6.1) 32パラメータを利用したモデルの外部検証結果：

SVM (T2class_CL_SVM_3)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	110	34	80.3
Predicted Negative	27	83	70.9
Total	137	117	76.0

KNN (T2class_CL_KNN_1)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	96	54	70.1
Predicted Negative	41	63	53.9
Total	137	117	62.6

ADA (T2class_CL_ADA_1)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	382	73	70.8
Predicted Negative	134	669	61.5
Total	137	117	66.5

2.6.2) 12パラメータを利用したモデルの外部検証結果：

SVM (T2class_CL_SVM_45)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	107	35	78.1
Predicted Negative	30	82	70.1
Total	137	117	74.4

KNN (T2class_CL_KNN_3)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	104	41	75.9
Predicted Negative	33	76	65.0
Total	137	117	70.9

ADA (T2class_CL_ADA_14)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	109	44	79.6
Predicted Negative	28	73	62.4
Total	137	117	71.7

2.7 前回モデルとの比較

前回の ADA 手法で作成したモデルによる本年度の外部検証データによる外部検証結果及び昨年度の検証結果を下記に示した。今回の検証に用いたデータセットは昨年度のデータセットとは異なるが、昨年度の検証結果より感度・特異度共に高い値を示したことから、昨年度モデルの判定結果の安定性及び信頼性

を示唆する結果と考察された。一方、今回、改良した SVM モデルは、一致率 (T2class_CL_SVM_3 = 76.0%) と「2.4%」ほど高い予測精度を示したものの、感度は昨年度構築した ADA モデルで 83.2% に対して 80.3% と若干低下しており、擬陽性判定は抑制されるものの偽陰性判定される化合物が多くなること

昨年度構築した ADA モデルの今年度の検証データ (254 化合物) による検証結果

ADA (旧 H21 モデル) (LIVERTOX_CL_ADA_120)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	114	44	83.2
Predicted Negative	23	73	62.4
Total	137	117	73.6

2.8 偽陰性化合物構造を加味したモデル改良

これまでの検討結果で、最高の予測精度(一致率 76%)を示した 32 パラメータを用いた SVM モデルにより、偽陰性判定となった化合物に共通する部分構造を抽出し(結果は添付表2参照)、そのうち毒性判定への寄与が高い 7 種の部分構造を、上記の検討でモデル構築に用いた 32 パラメータもしくは 12 パラメータと

あわせて SVM モデルの再構築を行い、予測精度向上について検討した。検討の結果、32 パラメータに 7 部分構造を追加して構築したモデルにおいて、一致率 76.8%と若干ではあるが精度向上が得られた。このことから、ディスクリプタータイプのモデルにさらに毒性化合物に特異的な部分構造の評価を組み合わせることで予測精度向上が得られることが示された。

SVM (T2class_CL_SVM_148)	Positive	Negative	%Correct
Predicted Positive	112	34	81.8
Predicted Negative	25	83	70.9
Total	137	117	76.8

2. in vivo反復毒性評価へのOECDツールボックスの開発動向調査と検証

目的

経済開発協力機構(OECD)では、加盟各国における化学物質規制の加速化・効率化のため既存情報の活用と *in silico* ツールの利用の推進に向けて、加盟各国から提供されたガイドライン試験結果や *in silico* ツールを統合した、OECD QSAR Application Toolbox (OECD ツールボックス) の構築を進めている。OECD ツールボックスは、加盟各国が無償で利用可能な化学物質リスク評価のための共通プラットフォームとして開発されており、本研究では、OECD QSAR ツールボックスマネージメントグループ会議等においてヒト健康影響のうち特に *in vivo* 毒性評価に関連するツールボックス開発並びに *in silico* ツールの化学物質安全性

評価への適用の国際動向調査及び我が国からの要望や本研究班における研究成果をもとにした開発提案を行うとともに、実際に OECD ツールボックスを利用して実用性及び有用性について検証を行うことを目的としている。

方法

OECDツールボックス開発動向の調査

OECD (Q)SAR アプリケーション・ツールボックス・マネージメント・グループ会議及び関連する国際会議に参加して OECD ツールボックス開発動向について調査を行うとともにリスク評価における(Q)SAR 手法及び OECD ツールボックスの利用などについて討議した。

in vivo反復毒性評価におけるOECDツールボックスの検証

既存化学物質点検において反復投与毒性試験が実施済み化合物について OECD ツールボックスの *in vivo* 反復毒性に関連するプロファイリングツールである Cramer rule による毒性分類を実施して実際の毒性試験結果との比較を行った。

結果と考察

OECD ツールボックス開発動向

OECD ツールボックスは、加盟各国や民間から（無償）提供された毒性試験データや *in silico* ツール及び文献等で既に発表済みで無償で利用可能な安全性評価に有用な *in silico* 手法を 1 つのソフトウェアに統合したものであり、OECD 及びソフトウェア開発委託先では QSAR 手法そのものや毒性アラートの開発は実施していない。現在の最新バージョンの OECD ツールボックスには、ヒト健康影響評価に関連するツールとして変異原性や皮膚刺激性等のプロファイリングツールが搭載されているが、*in vivo* 反復毒性に関しては、発がんや皮膚刺激以外では、米国 EPA で開発された内分泌かく乱性に関するエストロゲン受容体結合性評価のためのエキスパートルール及び 1972 年に Cramer らにより発表された、化学構造に基づき発がん性以外の毒性について毒性の種類によらず毒性の強さを 3 段階に分類する決定木型の Cramer rule の 2 種のみである（Cramer rule は、オリジナルと 1996 年に Munro らにより拡張された拡張ルールの 2 種が登録されている）。一方、OECD ツールボックスには、我が国の既存化学物質点検により得られた数百化合物の 28 日

間反復毒性試験結果やフラウンホーファー社が文献等から収集した毒性試験結果が無償提供され登録されていることから、構造類似化合物のデータが登録されていれば、カテゴリーアプローチによる評価には有用なツールである。

In vivo 反復毒性の *in silico* 評価に関しては、OECD ではこれまでの様々な検討や議論の結果、*in vivo* での毒性は、様々なメカニズムにより引き起こされることから、それらを一括して評価するのは困難であり、信頼性の高い手法の構築は難しいとの意見で一致している。化学構造からある程度の信頼性をもって評価出来るのは、化学構造と生体分子との化学的な相互作用であり、その結果として起こる生物反応を直接、化学構造から評価するのは無理があるとの考え方から、例えば内分泌かく乱性評価のためのエストロゲン受容体結合予測モデルのように予測対象の毒性の分子的なメカニズムに立脚した手法の組み合わせにより生体全体での反応を評価しようとする検討が進められている。すなわち、毒性発現に繋がる分子メカニズムとして定義される AOP (Adverse Outcome Pathway) を明らかにして、それぞれの AOP を評価出来るツールの構築が検討されている。2011 年 4 月には、皮膚感作性の AOP 及び AOP の初期分子反応である化学物質と生体タンパクとの結合性を評価する構造アラートの皮膚感性性プロファイリングにおける有用性が専門家会議で合意された。図 1 に皮膚感性性 AOP のカギとなる反応ステップを示した。

AOP: An example for skin sensitisation

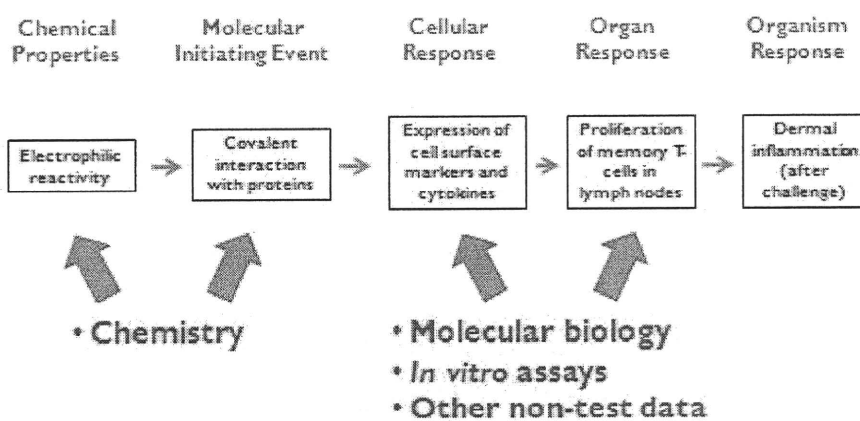


図1 皮膚感作性 AOP の鍵となる反応ステップ

AOP を *in silico* 評価系の構築には、毒性反応のきっかけとなる分子イベントである molecular initiating event (MIE) が明確化されており、さらに MIE を評価可能な *in vitro* 評価系が利用可能で、モデル (アラート) 構築のための化合物スクリーニングデータが得られている必要がある。皮膚感作性 AOP における MIE は、タンパク結合性である。文献等の検索の結果から、Hedgehog、Notch、アンドロゲン受容体、レチノイン酸受容体、ニコチン様アセチルコリン受容体シグナル系が生殖発生毒性の AOP 構築のターゲットとして有用ではないかとの報告がなされ、今後、それらを含めた毒性の分子メカニズムごとに AOP 構築の検討が進められていく予定である。しかし、一方で分子メカニズムが明らかにされている毒性は非常に限られており、また

MIE に関しても特定の分子 (受容体や酵素) 反応のように特異的作用に起因する毒性はむしろまれであり、化学物質の多くは様々な非特異的反応により毒性を惹起しているとも考えられることから、どの程度の毒性について AOP による評価が可能であるのかについては疑問が残る。

in vivo 反復毒性評価における OECD ツールボックスの検証

上述のごとく、現在のツールボックスで *in vivo* における一般毒性に関して利用可能なツールは、Cramer らにより発表された化学構造に基づき毒性の強さを 3 段階に分類する決定木型の Cramer rule のみである。Cramer rule は、JECFA における食品添加物の TTC 決定に用いられており、ある程度の信頼性はあると考えられたことから、我

が国の既存化学物質安全性点検により動物試験実施済み 233 化合物について構造式を整理し OECD ツールボックスを用いて Cramer rule による分類を実施して、動物

試験による NOEL 値により Cramer rule による分類について検証を行った。図 2 に 233 化合物のクラス分布を示す。

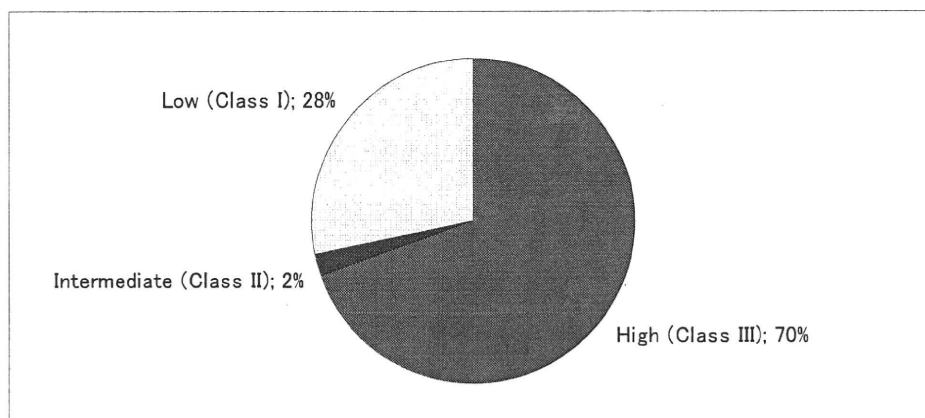


図 2 Cramer rule による既存化学 233 物質の毒性分類

233 化合物の約 7 割が、クラス 3 (毒性 High) に、約 3 割がクラス 1 (毒性 Low) に分類された。中間のクラス 2 は、毒性が中程度というよりむしろ構造からの判断が出来ない化合物と想定されることから、評価対象とした化合物が既存化学物質であることから分類された化合物が数個であることは妥当な結果と考察される。一方、図 3 には各クラスに分類された化合物の NOEL 値の累積密度分布を示したが、クラス 1 に比べクラス 3 の分布は NOEL の低い側にあるものの、両者の分布は非常に近接しており、分離は過去の報告に比べ良くない結果であった。JECFA の TTC 基準となっている Munro らの解析と同様に、それぞれのクラスの 5 パーセント値を求めると、クラス 1 で 4.4mg/kg、クラス 3 で 1.2mg/kg と

Munro らの解析値 (クラス 1 で 3mg/kg、クラス 3 で 0.15mg/kg) に比べ高い値となり用いたデータセットに極端に NOEL の低い化合物が無いことにもよるが、Munro らの解析値をもとにした各クラスの TTC 値は、十分に安全側に寄った値であり、使用実態そのものが微量で毒性試験実施そのものが難しい物質の TTC のような利用であれば信頼性は低いと有用と考察された。AOP 型のアプローチによる評価では、特定の作用について信頼性の高い評価が期待出来るものの、実際の毒性評価による様々な基準値の指標となる毒性の強さ (NOEL や NOAEL) については判断が難しいことから、Cramer rule のような精度は低いものの一般化された手法と組み合わせて利用することで、より効果的な利用が可能になると考えられる。

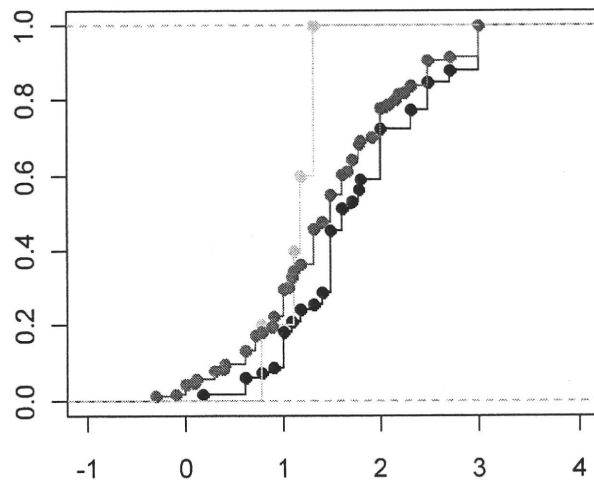


図3 各クラスに分類された化合物のNOEL値の累積密度分布
(黒：クラス1、緑：クラス2、赤：クラス3)

Cramer ruleによる毒性の分離が悪い原因として、図4にはクラス1に分類されたもののNOELの低い化合物を図5にはクラス3に分類されたものの限度用量(1000mg/kg)まで毒性の認められなかった化合物を示した。Cramer ruleのような

エキスパートルールでは、現状のモデルを変更することなくruleの追加による拡張が可能であり、これらの物質について共通構造や物理化学的特性値等によりルールを拡張出来れば分類精度を上げることが可能と考え、今後、各クラスに分類された構造についての検討を行う予定をしている。

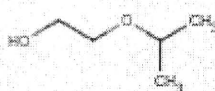
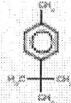
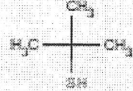
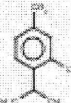
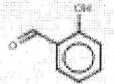

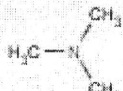

structure	CAS	NOEL(mg/kg)
	109591	30
	98511	1.5
	75661	10
	89838	8
	90028	10
	3452979	12
	75503	40
	7580850	4

図4 Class1に分類されたNOELの低い化合物

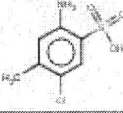

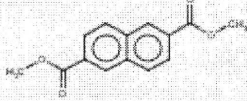

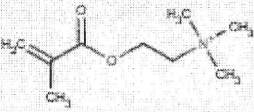
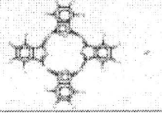
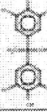
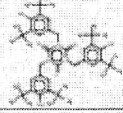

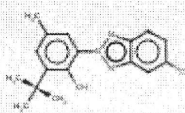
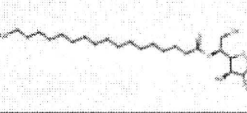
structure	CAS	NOEL(mg/kg)
	88539	1000
	1843056	1000
	840653	1000
	6505288	1000
	5039781	1000
	1328536	1000
	79947	1000
	27676626	1000
	110305	1000
	3898115	1000
	1338416	1000

図5 Class3 に分類された NOEL1000mg/kg 以上の化合物