

67-68-5	Dimethyl sulfoxide	0	0	0
68-12-2	Dimethylformamide	0	0	0
70-25-7	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine	1	1	1
71-43-2	Benzene	1	1	1
75-07-0	Acetaldehyde	1	1	1
75-09-2	Methylene Chloride	1	1	0
75-25-2	Bromoform	1	0	0
75-56-9	Propylene oxide	1	0	1
79-06-1	Acrylamide	1	1	1
79-34-5	1,1,2,2-tetrachloroethane	1	1	1
81-07-2	Saccharin	0	0	0
84-16-2	Hexestrol	1	0	0
89-65-6	Erythorbic acid	0	0	0
90-43-7	2-Phenylphenol	1	1	0
91-20-3	Naphthalene	1	0	0
91-59-8	2-Naphthalenamine	1	1	1
91-64-5	Coumarin	1	0	0
91-94-1	3,3'-Dichlorobenzidine	1	1	1
92-52-4	Biphenyl	1	1	0
92-67-1	4-Biphenylamine	1	1	1
92-87-5	Benzidine	1	1	1
95-50-1	1,2-Dichlorobenzene	1	0	0
95-53-4	o-Toluidine	1	1	0
95-80-7	2,4-Diaminotoluene	1	1	0
95-83-0	4-Chloro-1,2-diaminobenzene	1	1	1
96-09-3	Styrene oxide	1	1	0
96-12-8	1,2-Dibromo-3-chloropropane	1	1	1
96-45-7	Ethylenethiourea	1	1	0
97-53-0	Eugenol	1	0	0
97-56-3	o-Aminoazotoluene	1	1	0
99-56-9	1,2-Diamino-4-nitrobenzene	1	0	0
100-41-4	Ethylbenzene	1	0	0
100-42-5	Styrene	1	1	0
100-51-6	Benzyl alcohol	1	0	0
100-75-4	1-nitrosopiperidine	1	1	0

101-14-4	4,4'-Methylenebis(2-Chlorobenzeneamine)	1	1	1
101-77-9	4,4'-methylenebis(aniline)	1	1	1
103-33-3	Aminoazobenzene	1	1	1
103-90-2	Acetaminophen	1	1	1
104-55-2	Cinnamaldehyde	1	0	0
105-11-3	p-Quinone dioxime	1	0	0
105-60-2	hexahydro-2h-azepin-2-one	0	0	0
106-46-7	1,4-Dichlorobenzene	0	1	1
106-93-4	Ethylene dibromide	1	1	0
106-99-0	Butadiene	1	0	0
107-06-2	Ethylene dichloride	no conclusion	1	0
107-13-1	Acrylonitrile	1	0	0
108-88-3	Toluene	0	0	0
108-95-2	Phenol	1	1	0
110-00-9	Furan	1	1	0
110-44-1	Sorbic acid	0	0	0
110-86-1	Pyridine	0	0	0
117-39-5	Quercetin	1	0	0
117-81-7	Bis(2-ethylhexyl)phthalate	0	0	0
118-96-7	2,4,6-Trinitrotoluene	1	0	0
119-53-9	Benzoin	1	0	0
119-93-7	Tolidine	1	1	1
120-47-8	Ethylparaben	1	0	0
120-71-8	p-Cresidine	1	0	0
121-79-9	Propyl gallate	1	0	0
123-91-1	1,4-dioxane	0	0	0
124-48-1	Chlorodibromomethane	1	1	0
126-72-7	Tris(2,3-Dibromopropyl)Phosphate	1	1	1
128-37-0	Butylated hydroxytoluene	1	0	0
128-44-9	Saccharin, sodium	0	0	0
134-32-7	1-Naphthylamine	1	1	1
136-40-3	Phenazopyridine hydrochloride [USAN]	1	1	1
139-13-9	Triglycollamic acid	1	1	0

140-11-4	Benzyl Acetate	0	0	0
140-88-5	Ethyl Acrylate	1	1	0
142-04-1	Aniline HCl	1	1	1
147-94-4	Cytosine Arabinoside	1	0	1
148-79-8	Thiabendazole	no conclusion	1	1
148-82-3	Melphalan	1	1	1
301-04-2	Lead Acetate	1	0	0
305-03-3	Chlorambucil	1	1	1
309-00-2	Aldrin	1	0	0
366-70-1	Procarbazine hydrochloride	1	1	1
427-51-0	Cyproterone acetate	0	1	0
446-86-6	Azathioprine	1	1	1
492-80-8	Auramine	1	1	0
501-30-4	Kojic acid	1	0	0
532-32-1	Sodium benzoate	1	0	0
542-75-6	1,3-Dichloropropene [BSI:ISO]	1	1	0
602-87-9	5-Nitroacenaphthene	1	1	1
604-75-1	Oxazepam	1	1	0
609-20-1	2,6-Dichloro-para-phenylenediamine	1	1	1
621-64-7	N-Nitroso(di-n-propyl)amine	1	1	0
624-18-0	p-Phenylenediamine.2HCl	1	0	0
637-07-0	Clofibrate	1	0	0
684-93-5	Methylnitrosourea	1	1	1
759-73-9	N-Ethyl-N-Nitrosourea	1	1	1
816-57-9	Propylnitrosourea	1	1	1
842-07-9	1-Phenylazo-2-naphthol	1	1	1
924-16-3	Dibutylnitrosamine	no conclusion	1	0
930-55-2	1-nitrosopyrrolidine	1	1	0
1116-54-7	2,2'-(nitrosoimino)bisethanol	1	1	0
1120-71-4	1,3-Propane sultone	1	1	1
1162-65-8	Aflatoxin B1	1	1	1
1634-04-4	Methyl tert-butyl ether	1	0	0
1746-01-6	Tetrachlorodibenzodioxin	0	0	0

		no		
1937-37-7	C.I. Direct black 38	conclusion	1	1
2353-45-9	Fast Green FCF	0	0	0
2611-82-7	New cocchine	0	0	0
2650-18-2	C.I. Acid Blue 9	1	1	0
2783-94-0	FD & C Yellow	1	0	0
2784-94-3	HC Blue No. 1	1	0	0
2835-95-2	5-Amino-o-cresol	1	1	0
2921-88-2	Chlorpyrifos	1	1	0
3564-09-8	Ponceau 3R	1	1	0
3688-53-7	Furylfuramide	1	1	1
4418-26-2	Sodium Dehydroacetate	1	0	1
5064-31-3	Nitrilotriacetic acid, trisodium salt	0	0	0
5307-14-2	2-Nitro-4-phenylenediamine	1	1	0
6369-59-1	2,5-Diaminotoluene sulfate	1	0	0
6441-77-6	Phloxine	0	0	0
6923-22-4	Monocrotophos	1	1	1
10595-95-6	N-Nitrosomethylethylamine	1	1	0
11121-48-5	Rose bengal	0	0	0
13552-44-8	4,4'-methylenedianiline 2HCl	1	1	1
15972-60-8	Alachlor	1	1	1
16423-68-0	C.I. Acid Red 51	1	1	0
18883-66-4	Streptozotocin	1	1	1
20830-81-3	Daunamycin	1	1	1
33229-34-4	HC blue no. 2 [AKA ethanol, 2,2'((4-(2-hydroxyethylamino)-3-nitrophenyl)imino)di-]	0	0	0
33419-42-0	Etoposide	1	1	1
62450-07-1	1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol-3-amine	1	1	1
67774-32-7	Polybrominated biphenyl mixture	0	0	0
77439-76-0	3-Chloro-4-Dichloromethyl-5-Hydroxy-2-Furanone	1	1	0
93957-54-1	Fluvastatin	0	0	0
93957-55-2	Fluvastatin sodium	0	0	0

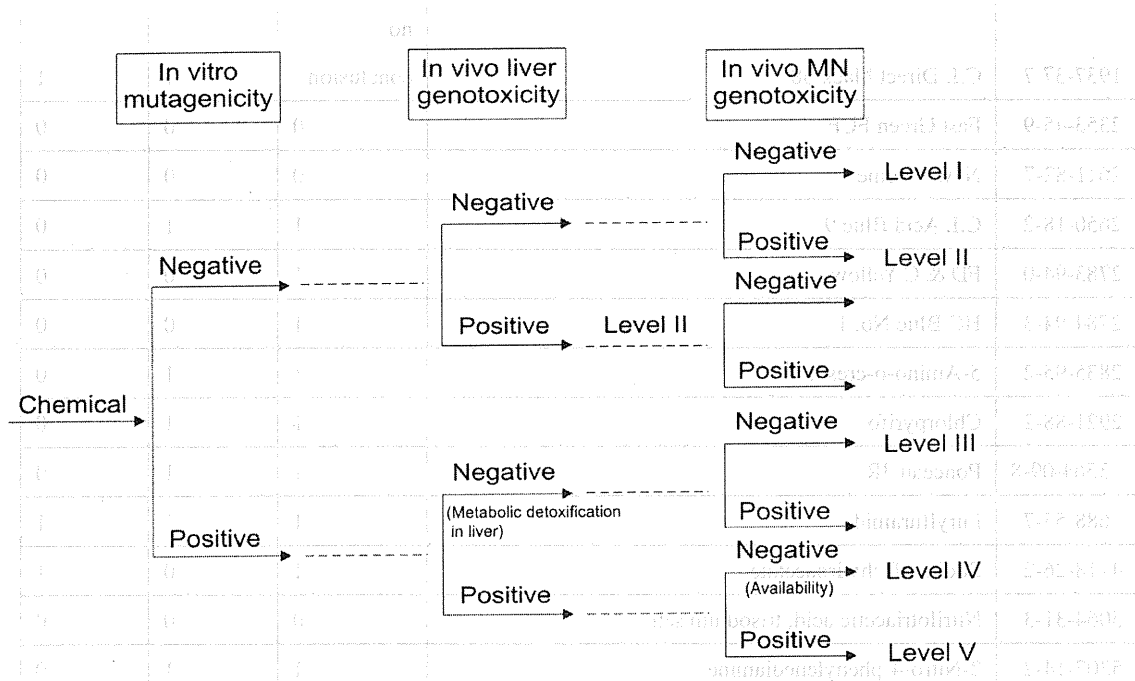


図1 遺伝毒性段階的評価のワークフロー

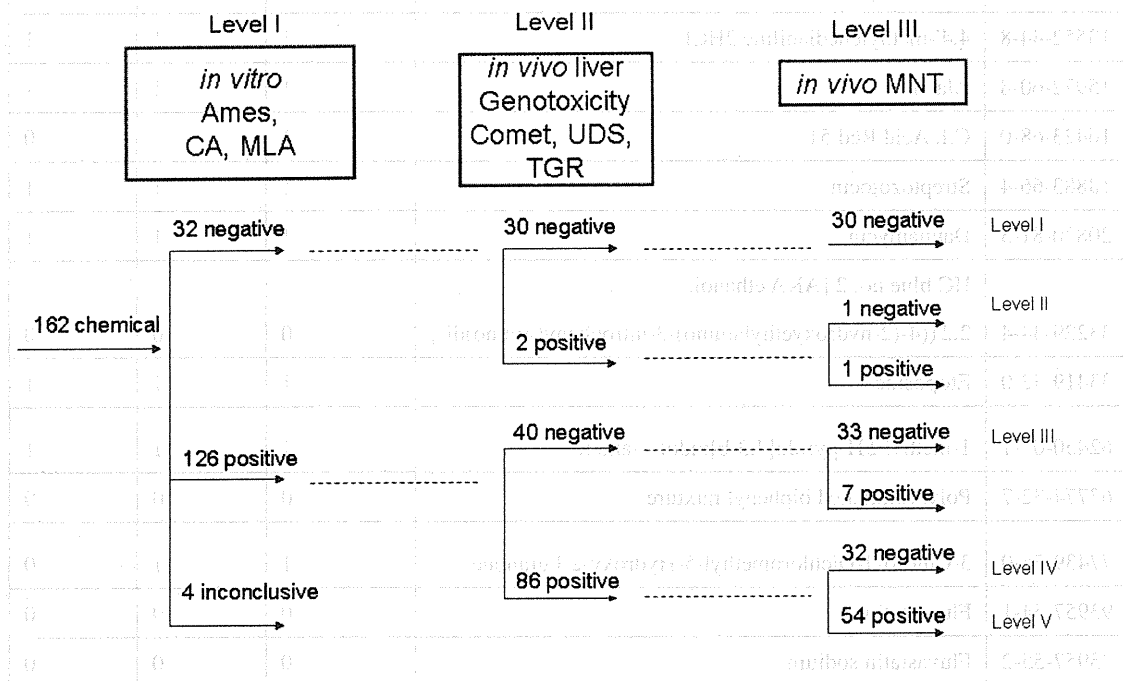


図2 ワークフローに組み込んだ162化合物の分類

研究発表

1. 論文発表

- 1) Mekenyan OG, Petkov P, Kotov S, Stoeva S, Kamenska VB, Dimitrov S, Honma M, Hayashi M, Benigni R, Donner M, Patlewicz GY. Investigating the relationship between in vitro - in vivo genotoxicity: Derivation of mechanistic QSAR models for in vivo liver genotoxicity and in vivo bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism. Chem Res Toxicol. [Epub ahead of print] (2011)
- 2) Matsumoto M, Harada T, Shibuya T, Hamada S, Honma M, and Hirose A. A chemical category approach of genotoxicity studies for branched alkylphenols. Bull, Natl. Inst. Health Sci., 129, 68-75 (2011)
- 3) 城内 博, 宮川宗之, 森田 健:英和対訳 最新 OECD 毒性試験ガイドライン, 追録版, 化学工業日報社, 東京, 2011.
- 4) Takeshi Morita, James T. MacGregor and Makoto Hayashi: Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, Mutagenesis, 26, 223-230, 2011.
- 5) Sheila Galloway, Elisabeth Lorge, Marilyn J. Aardema, David Eastmond, Mick Fellows, Bob Heflich, David Kirkland, Dan D. Levy, Anthony Lynch, Daniel Marzin, Takeshi Morita, Maik Schuler, Günter Speit: Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and

top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), Mutation Research, 723, 77-83, 2011.

- 6) R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, A. Miyajima, M. Sunouchi, Y. Goda. Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. Anal Bioanal Chem (2011) 400, 165-174
- 7) Takeshi Morita and Kaoru Morikawa: Expert Review for GHS Classification of Chemicals on Health Effects, Industrial Health, 49, 559-565, 2011.
- 8) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa, Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, Mutation Research, 741, 32-59, 2012.

2. 学会発表

- 1) 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(2011.03)、静岡
- 2) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa: Analysis of *in vitro* chromosomal aberration test data with CHL cells for reducing top test concentration for industrial chemicals, 42nd EMS 2011 Annual Meeting (2011.10), Montreal

- 3) M. Sunouchi, A. Miyajima-Tabata, R. Kikura-Hanajiri, S.-R. Kim, T. Kubo, S. Ishida, M. Usami, Y. Sekino ▶ Inducibility of CYP1A by linuron in primary cultured human hepatocytes, EuroTOX 2011 (2011.8)
- 4) 2) 酒井 恵子、宮島 敦子、加藤 玲子、岡田 恵里、尾崎 正康、松岡 厚子 ▶ ナノ材料の安全性評価における A549 細胞と CHL 細胞の感受性の比較 日本環境変異原学会 第 40 回大会 (2011.11)

知的所有権の取得状況

なし

平成 23 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）

反復投与毒性及び *in vivo* 染色体異常を指標にした構造活性相関モデルに関する研究
及び安全性評価における利用に関する研究

研究分担者	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
研究分担者	林 真	食品農医薬品安全性評価センター センター長
研究分担者	江馬 眞	産業技術総合研究所安全科学研究部門 研究員
研究協力者	宮地 繁樹	(財)化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 主任
研究協力者	茂木 邦夫	(株)シーティシー・ラボラトリーシステムズ

要旨

本年度は、反復投与毒性における標的臓器毒性の *in silico* 評価における適用可能な化合物構造のカバー率向上のため、副腎、精巣、および、心臓毒性に対する **Rapid Prototype** アラートの構築を行った。アラート構築のため化審法で審査された物質のみでは、ターゲットとする標的臓器毒性陽性化合物が限定されるため文献情報も含めることでカバーされるケミカルスペース拡大に成功し、新たに 12 種の **Rapid Prototype** アラートが構築された。これまでの研究で構築された **Rapid Prototype** アラートの多くが複数のエンドポイントをカバーすることからそれらオーバーラップする構想活性相関は、同じ作用機序により異なる臓器に対して毒性を引き起こす化合物、もしくは、双方の毒性にリンクするパスウェイに影響を及ぼす化合物群に起因する可能性が示唆された。*in vivo* 染色体異常エンドポイントの被覆率向上のため *in vivo* 小核試験データセットについて *in vitro* 染色体異常アラートに対して予測処理を行い、有効なアラート候補について文献調査等により新たな *in vivo* 染色体異常アラートの構築に成功した。変異原性予測精度を改善するために、WHO 食品添加物シリーズ(FAS)報告書にて評価された 376 個の化合物に対する Ames 試験データを解析した結果、14 化合物が疑陰性、44 化合物が 7 疑陽性判定された。疑陰性化合物に対する解析により、二つの新たなアラートが選択された。安全性評価における構造活性相関手法の利用の検討として、ジメチルアニリンの構造異性体における環境運命及び環境毒性に関する情報収集を行い、経済協力開発機構の高生産量既存化学物質初期評価のための SIAP、SIAR 及び IUCLID Dossier を作成した。

研究目的 (英文資料をスキャンした) 金剛糖で良好に開発された毒性エンドポイントで

Derek for Windows(DfW)は、Lhasa Limited: UKによって開発された毒性予測のためのエキスパートシステムである。その知識ベースは、DfWにより行われる毒性予測に与するアラート、例証化合物および Reasoning rule から成り立っている。本研究では、NIHSとLhasa Limitedとの共同により、NIHSにより提供されたデータをもとに、DfWアラートやRapid Prototypeアラートの開発や修正によりDfW知識ベースの改善による予測精度や適用化合物構造の拡張を実施した。

今年度は、NIHSより提供されたin vivo染色体異常、変異原性、副腎・精巣・心臓毒性に対する標的臓器毒性に関連するデータの解析を実施した。データセットの性質・被覆率・現在のDfW中の毒性エンドポイントに応じて様々な手法が採用されている。反復毒性のうち副腎・精巣・心臓毒性に対する標的臓器エンドポイントは、これまでDfWにおいてあまり解析されてきておらず、提供されたデータセットは様々なケミカルスペースを表現していたことから、これらの毒性エンドポイントの被覆率を広げるRapid Prototypeアラート開発を行った。一方、in vitro染色体異常毒性エンドポイントについてはDfWは既にその知識ベースの中で比較的良好にカバーしており、提供されたin vivo活性のデータセットをもとに、in vitroアラートのin vivoへの適用性の精査による既存構造アラートの適用性の検討や、必要に応じてエンドポイントを拡張することによる、モデルの最適化を行った。また、変異原性はDfW知識ベース

Part I: 標的臓器毒性予測

序論

NIHSより支援を受けた以前のプロジェクトは、亜急性毒性試験データの、例えば、甲状腺、脾臓、および、骨髄毒性といった新しい毒性エンドポイントを開発する際の可能性を示した。

このプロジェクトはNIHSより提供された亜急性毒性試験データを使用して、新しいエンドポイント: 副腎、精巣、および、心臓毒性に対する新たなRapid Prototypeアラートを開発することにより、標的臓器毒性予測の被覆率を高めることである。DfW知識ベース(DfW version 13.0.0i)は現在、一つの心臓毒性アラート、二つの精巣毒性アラートを有しているが、副腎毒性アラートは存在していない。

このプロジェクトを開始する前に、NIHSより提供された28日間亜急性毒性試験データ中の1515個の化合物のデータセットを使って、実現可能性調査が行われた。この調査の結果、陰性化合物と比較して限られた量の陽性化合物¹(表1)とそのデータセットの多様性が、従来の方法(専門家に

¹ 組織病理の副腎、精巣および心臓のデータフィールド値が存在した場合、その化合物を陽性とした。

よる解析、in silico クラスタリングツール) を使用しての、それぞれの毒性エンドポイントに対するクラスターの特定を困難にするかも知れないことが分かった。しかしながら、もしも、以前のプロジェクトで使用されたのと類似の手法が採用され、Rapid prototype 開発の候補が活性と文献(NIHS Year4 レポートを参照)中で議論されている支持するメカニズムの痕跡に基づいて選択されるならば、Rapid Prototype の実装が可能となるかも知れない。

臓器	陽性化合物数	陰性化合物数	陽性化合物の割合
副腎	93	1422	6.1%
精巣	82	1433	5.6%
心臓	31	1484	2.1%

表 1: 各々の標的臓器毒性に対するデータセット中の陽性化合物の割合

従って、この作業においては、DfW におけるこれらの標的臓器毒性エンドポイントの被覆率を改善させるために、Rapid Prototype アラートを開発するための文献中に記載されている関連する作用機序と関連付けて、28 日間亜急性毒性試験データと入手可能な関連毒性試験データを用意した。

方法

NIHS は要約亜急性毒性試験データに関

する二つの ISIS/Base²データベース(Sinki and Kison) を提供した。これらのデータベース、Sinki と Kison はそれぞれ 254 個、1261 個の化合物を含んでおり、それらは一つの ISIS/Base データセットとして組み合わせられ、SD ファイルが生成された。そして、この SD ファイルは Instant JChem² にインポートされ、新しいデータベースが作成された。Instant JChem データベースは、部分構造検索機能が ISIS/Base のものよりも優れているために、構築された。

このデータベースに含まれる 23 個の化合物構造が、視覚的な解析を行なうために、また、DfW による予測時における価数違反を避けるために再描画されなければならなかった。(トレーニングデータセットに対してなされた変更の要約は付録 I を参照)。そして、このデータベースは全ての更なる解析において出発点として使用された。(修正された構造を含む SD ファイルは、DfW を利用しての予測精度値を算出する際には、独立して予測処理がなされ、その結果は残りの予測結果と組み合わせられた。)

副腎・精巣、および、心臓毒性に対する陽性結果の定義は、組織病理学的所見が観測された臨床パラメータや投与量には依らず、それぞれ、副腎・精巣および心臓の組織病理学的値の存在に基づく。

提供されたデータセット中の陽性化合物の個数が限られていることから、視覚的な解析により Rapid Prototype に対する候補

² ISISTM/Base Version 2.3 (1990-2000), MDL Information Systems, Inc. ²Instant JChem Version 5.5, ChemAxon

化合物クラスが特定された。各々の毒性エンドポイントに対して全ての陽性化合物を含む SD ファイルが作成され、それらは置換基、フラグメント、類似の化学的環境を考慮することにより、そして、DfW の知識ベース内の他の毒性エンドポイントに対する既存のトキシコファーとの類推により解析された。副腎、精巣および心臓に対する組織病理学的値もまた、潜在的な化合物クラスの特定に対して考慮された。

化合物クラスは、陰性化合物を考慮するために Instant JChem データベースに対して部分構造検索を行なうことにより更に洗練された。この解析に続いて、公開された文献情報がトキシコファーを導出するために毒性発現の潜在的なメカニズムを特定するために精査され、その後トキシコファーが DfW に導入された。DfW 知識ベースに導入された Rapid Prototype アラートは、パターン構造、alert description picture およびトレーニングデータセット化合物に対する予測精度を記述するための概要コメントから成る。

結果

過去の NIHS プロジェクトからの経験に基づき、潜在的な化合物クラスを特定するための古典的なクラスタリング手法は、これら三つの毒性エンドポイント全てに対して活性化合物に対する不活性化合物数の大きな不均衡のために、不適切と考えた。従って、視覚的解析により特定された初期の化合物クラス群が更に解析され、公開済み文献が、追加的な毒性試験データ、および、潜在的な毒性メカニズムの探究のために調査された。

全部で 12 個の Rapid Prototype アラートが開発され、そして、DfW version13 知識ベースに実装され、それはこの報告書において DfW13 NIHS 170112_1 として引用される。7 個の副腎毒性 Rapid Prototype アラート、4 個の精巣毒性アラート、そして、4 個の心臓毒性アラートが、新しいアラートと新規および既存アラートに対する複数の毒性エンドポイントを作成するための毒性エンドポイント追加の結果として作成された。これらのアラートのリストが表 2 に示されている。個々の Rapid Prototype アラートに対する DfW rtf レポートが付録 II に記載されている。

エンドポイント	アラート番号	アラート名
副腎毒性	RapidPrototype153	Bis-4-oxyaniline
	RapidPrototype158	Phenylethyltriazole or analogue
	RapidPrototype159	4-Bicyclohexylphenol trifluoromethyl ether
	RapidPrototype160	2-Thio-benzimidazole, -benzothiazole or -benzoxazole
	RapidPrototype161	Methylenebisphenol
	RapidPrototype162	Adamantane
	RapidPrototype164	Methylenedi-2,6-xyleneol

精巣毒性	RapidPrototype153	Bis-4-oxyaniline
	RapidPrototype159	4-Bicyclohexylphenol trifluoromethyl ether
	RapidPrototype161	Methylenebisphenol
	RapidPrototype163	Ethylene- or propylene-urea
心臓毒性	RapidPrototype165	Halogenated acrylic acid or derivative
	RapidPrototype166	2,2'-Dimorpholinodiethyl ether
	RapidPrototype167	Benzaldehyde
	RapidPrototype168	Dialkyl-disulphide or -trisulphide

表 2: DfW13 NIHS 170112_1 に実装された標的臓器毒性に対する新たな Rapid Prototype アラートのリスト

副腎毒性アラート開発

副腎毒性に対する Rapid Prototype アラート開発のために考慮された全ての化合物クラスの表と、個々のセットに対して至った決定事項が付録 III に記載されている。アラート開発に対するそれらの可能性は、もしも関連の支援するデータが見つけれらるのであれば潜在的な毒性効果のメカニズムと同様に、陽性化合物と陰性化合物を効果的に分離することのできる洗練されたトキシコファーを導出する能力に基づく。NIHS データセットからの化合物群に見受けられる副腎毒性に対する 2,3 の報告書があるにも関わらず、これらの化合物の毒性効果に対する起こりえるメカニズムを支援する入手可能なデータは限られていた。実際に、たった一つの特定された化合物クラス、アゾール系殺虫剤 (RapidPrototype158:

Phenylethyltriazole or analogue)は、あらゆる文献が、副腎毒性の潜在的なメカニズムに対して恐らく関連するかも知れない構造に関するものであった。これらの化合物は、副腎に対して組織病理学的な変化を引き起こすことが示されており [Zarn *et al*]、この化合物クラスにより表現される多くのアゾール系殺虫剤の薬理的な作用の一部である、ステロール 14 デメチラーゼとアロマターゼの阻害がこれらの活性に対する役割を演じているかも知れない。この酵素の阻害と引き続いて引き起こされるステロイドホルモン合成のダウンレギュレーションは、哺乳類の正常な副腎機能に対してインパクトとなるフィードバック効果の引き金となるかも知れない [Sanderson, Zarn *et al*] (図 1)。この潜在的なメカニズムは、このクラスに対して構造活性相関(SAR)を開発する際に考慮された。

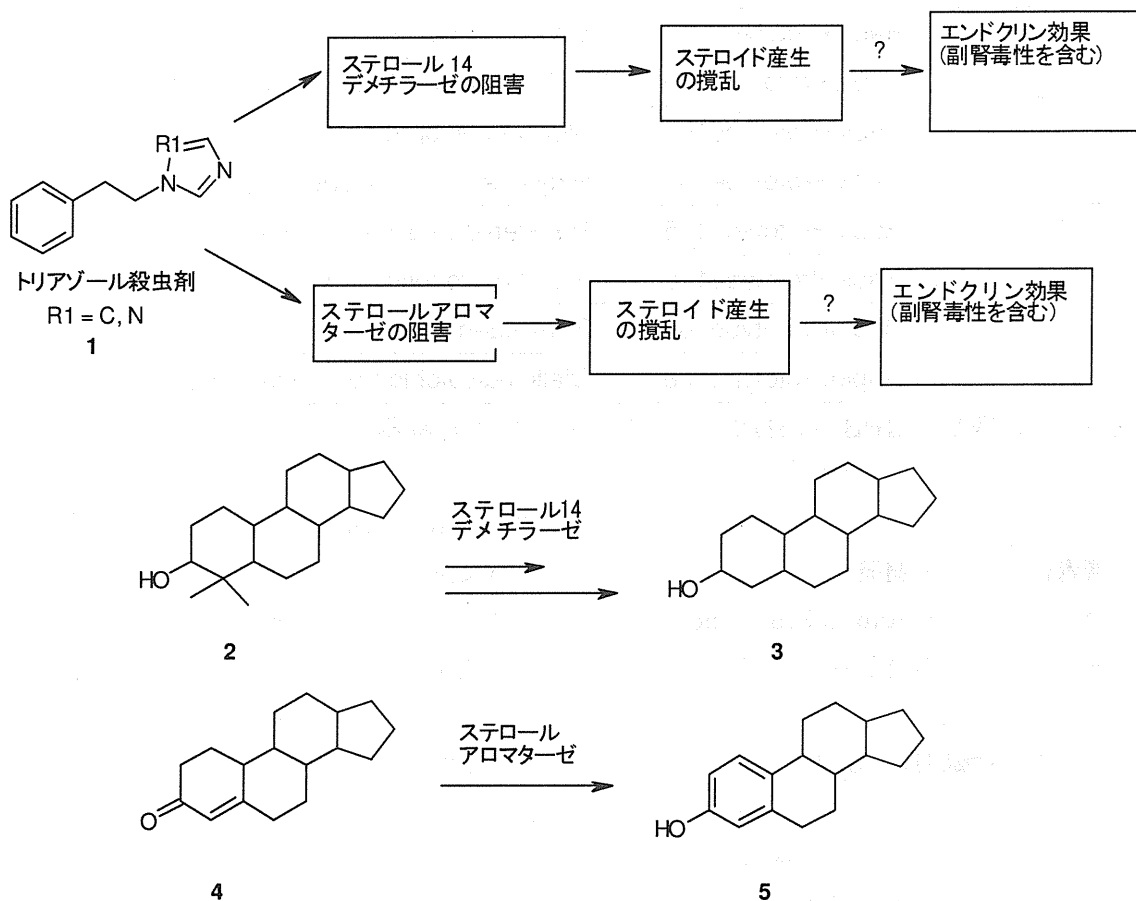


図 1: フェニルエチルトリアゾール化合物により引き起こされる副腎毒性に繋がる可能性のあるパスウェイ

これ以外に実装された他の化合物クラス (RapidPrototype153, 159-162, 164) に対して、公共の文献からは毒性試験データやこれらの化合物の毒性効果の潜在的なメカニズム情報は見つけられなかった。これらの RP アラートは、従って、化合物構造の類似性と化合物クラス中の陽性化合物と陰性化合物を効果的に分離することができるトキシコファーを導出する可能性に基づき実装された。RapidPrototype160 において、たった一つの化合物 (2-Thio-benzimidazole, -benzothiazole or -benzoxazole) 2-mercaptobenzimidazole に対してのみ、副腎の壊死についての情報を含む公共文献中において、その毒性効果に関する報告書がある [Gaworski *et al.*].

そのデータセット中における多くの化合物が副腎に対して有毒であると報告されているが、それらはシングルトンであり毒性効果の潜在的なメカニズムは特定されておらず、これらのデータは SAR 開発に対して活用出来なかった。

このデータセットから特定された化合物クラスを支持するような、また、これらの化合物の活性に対して可能性のあるメカニズムを示唆するような文献は殆んど無かった一方、他の化合物クラスやそれらの副腎毒性に対する原因を含む総説記事が見つかった [Rosol *et al.*]. ただし、それらの化合物の多くは、そのデータセットにおいて表現されていなかった。しかしながら、そのデータセット中に存在しているこの文献からの幾つかの化合物クラス、例えば Triarylphosphate の場合に関して、このプロジェクトに対して提供された毒性試験データによっては支持されていなかった。

Triarylphosphate の活性は、副腎皮質中のコレステロールエステルの蓄積に至る中性コレステロールエステル加水分解酵素の阻害に関連付けられていた。 [Rosol *et al.*].

精巣毒性

実現可能性調査にて報告した通り、NIHS データセットからの一つの化合物が真陽性として正しく予測されており、それは精巣毒性エンドポイントに対するアラート: alert 637 “Phthalate mono- or di-ester” にヒットした (compound ID 9910018A)。精巣毒性エンドポイントに対する残りの疑陰性化合物が副腎毒性に対する場合と類似の方法にて解析された。副腎毒性に対する Rapid Prototype アラート開発のために考慮された全ての化合物クラスの表と、個々のセットに対して至った決定事項が付録 III に記載されている。

データセット中の精巣毒性陽性化合物は限られていた。実装された Rapid prototype に対して、ビスフェノール A (RapidPrototype161: Methylenebisphenol) のみが、ライディッヒ細胞に影響を及ぼす精巣毒性についての報告を有しており、それは血漿と精巣テストステロンレベルを減少させ、未成熟な精子細胞の個数を増やすというものである [Nakamura *et al.*].

幾つかの毒性データが、調査された他の化合物クラスに対して見つけられた。例えば、type II ピレスロイド殺虫剤の多くは精子形成を損なうと報告されているが、このプロジェクトにて提供されたデータは、これが組織病理学的な損傷に至るわけではないことを示している。Thiophosphates と

phosphates が調査され、睾丸において毒性を引き起こすことが示されている[Uzun *et al*, Latendresser *et al*]この化合物クラスからの幾つかの化合物の存在にも関わらず、可能性のあるメカニズムについての情報の不足とこの化合物クラスに対して選択的なトキシコファーを導出することが可能でないことを意味する陽性化合物と陰性化合物の特徴の多様性のために、アラートは実装されなかった。単純置換ニトロベンゼンに対する精巣毒性試験データも公共文献から取得可能であった[Working]。しかしながら、提供されたデータセットと多くの化合物のパブリックドメイン中の毒性の帰属における差異が、潜在的なメカニズムに関するデータが限られていることと化合物の化学的な多様性と同様、この化合物クラスに対して SARs を開発することが困難であることを意味していた。副腎毒性と精巣毒性の間の相関関係を評価することにより、全部で 21 個の化合物が副腎と精巣の双方において組織病理学的な値を示していたことが分かった。この値は、精巣毒性陽性である化合物の 25.6%が副腎でも同様に陽性であり、幾つかの化合物について双方の毒性エンドポイントに対して適用可能な類似した毒性メカニズムが存在しているかも知れないということを示している。これらの臓器の機能を思い起こすと、毒性についてこれらの共有されたメカニズムやパスウェイがステロイドの合成と関連がありそうである。副腎毒性に紐づけられた Rapid Prototype アラートの内三個が精巣毒性に紐づけられ、それは異なる毒性エンドポイントに対してこれら個々の化合物クラスに対する SAR において良好な重複が見受けられるからで

ある。これらのアラート群と関連している明確なメカニズムは存在しない一方、この良好な重複はそれらのエンドポイント間に共通したメカニズムやパスウェイを示しているかもしれず、そのような関係性は化合物の毒性発現のメカニズムを提案する上で有用であると証明されるかも知れない。データセット中の陽性化合物の残りは、不十分な毒性試験データと定義されたメカニズム面でのデータが不足しているために、シングルトンであると見做された。

心臓毒性

心臓毒性に対する二個の既存 DfW アラートは、提供されたデータセット中のいずれの化合物に対してもヒットしなかった。全ての疑陰性化合物が視覚的に解析された。この解析に引き続く副腎毒性に対する Rapid Prototype アラート開発のために考慮された全ての化合物クラスの表と、個々のセットに対して到達した決定事項が付録 III に記載されている。

幾つかの化合物クラスが調査され、公共文献中に幾らか心臓毒性データが見受けられるにも関わらず、その毒性効果についての潜在的なメカニズムに関する報告書は見つからなかった。合計で、4 個の Rapid Prototype アラートが、構造類似性と、それによって示唆される同様の毒性発現メカニズムの尤もらしさに基づいて実装された。

副腎毒性 Rapid Prototype アラートに対する予測精度

新しい知識ベースの予測精度が NIHS データセットを使って DfW version13 にて評価された。表 3 は、副腎毒性予測に関して

DfW13 NIHS 170112_1 に対する予測精度を示している。このエンドポイントは DfW version13 においてカバーされていないので、予測精度は比較できなかった。

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陽性	20	73	93
陰性	5	1417	1422

感度 = $20/93 = 21.5\%$

特異性 = $1417/1422 = 99.6\%$

一致率 = $(20+1417)/(93+1422) = 94.9\%$

表 3: NIHS データセット中の化合物に対する、副腎毒性エンドポイントに対する DfW13 NIHS 170112_1 の予測精度

精巣毒性 Rapid Prototype アラートに対する予測精度

新しい知識ベースの予測精度が NIHS データセットを使って DfW version13 にて評価された。表 4 と表 5 は、精巣毒性予測に関して、標準 Derek version14 知識ベース (表 4) と DfW13 NIHS 170112_1 (表 5) に対する予測精度を示している。

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陽性	1	81	82
陰性	0	1433	1433

感度 = $1/82 = 1.2\%$

特異性 = $1433/1433 = 100\%$

一致率 = $(1+1433)/(82+1433) = 94.7\%$

表 4: NIHS データセット中の化合物に対する、精巣毒性エンドポイントに対する DfW version14 の予測精度

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陽性	14	68	82
陰性	6	1427	1433

感度 = $14/82 = 17.1\%$

特異性 = $1427/1433 = 99.6\%$

一致率 = $(14+1427)/(82+1433) = 95.1\%$

表 5: NIHS データセット中の化合物に対する、精巣毒性エンドポイントに対する DfW13 NIHS 170112_1 の予測精度

心臓毒性 Rapid Prototype アラートに対する予測精度

新しい知識ベースの予測精度が NIHS データセットを使って DfW version13 にて評価された。表 6 は、心臓毒性予測に関して DfW13 NIHS 170112_1 に対する予測精度を示している。このエンドポイントは DfW version13 においてカバーされていないので、予測精度は比較できなかった。

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陽性	9	22	31
陰性	0	1484	1484

感度 = $9/31 = 29.0\%$
特異性 = $1484/1484 = 100\%$
一致率 = $(9+1484)/(31+1484) = 98.5\%$

表 6: NIHS データセット中の化合物に対する、心臓毒性エンドポイントに対する DfW13 NIHS 170112_1 の予測精度

結論

7 個の副腎毒性、4 個の精巣毒性、そして、4 個の心臓毒性 Rapid Prototype アラートが DfW version13 に対して実装された。全ての Rapid Prototype アラートの実装後のトレーニングセットに対する予測精度は、副腎毒性: 感度 21.5%・特異性 99.6%、精巣毒性: 感度 17.1%・特異性 99.6%、心臓毒性: 感度 29%・特異性 100%である。

このプロジェクトの開始前には、DfW 知識ベースは一個の心臓毒性アラートと二個の精巣毒性アラートを有していたが、その一方で副腎毒性エンドポイントに対してはアラートが開発されていなかった。このプロジェクトは、これまでの知識ベースに対して殆んどもしくは全くカバーされてこなかった標的臓器毒性エンドポイントに対する予測精度を大幅に向上させた。

トレーニングデータセット中の陽性化合物の個数が限られていたために、陽性化合物の視覚的解析が利用され、(適宜)毒性の潜在的なメカニズムが Rapid Prototype 開発に向けて考慮された。多くの包括的な総説論文が興味のある毒性エンドポイントに関連する文献中に見受けられたが、その一方で、データベースによってカバーされているケミカルスペースのために、首尾よくいったケースは限られていた。従って、

Rapid Prototype アラートの大部分は従来の方法ののっとして開発された。

このプロジェクトの一部として特定された多くの構造活性相関は異なるエンドポイントに対して同じ化合物クラスと類似もしくは同等であり、これは多くのアラートが複数のエンドポイントをカバーするように拡張されたという事実によって反映されている。そのようなケースのうちの幾つかにおいて、それらオーバーラップしている構想活性相関は、同じ作業機序を通じて異なる臓器に対して毒性を引き起こす化合物、もしくは、双方の毒性にリンクし得るパスウェイに摂動を及ぼすような化合物群に起因するかもしれないと述べられている入手可能な文献を見ることにより仮説を立てることが可能である。他のケースにおいては、その化合物クラスの情報の不足、かつ/または、二つの毒性エンドポイント間の関連性がより弱いというために、なぜオーバーラップが存在するのかは、あまり明らかではない。従って、この作業とこれらのオーバーラップする化合物クラスは、化合物が毒性を引き起こすメカニズムやパスウェイに対する更なる見識を与える可能性がある。(勿論、関連性を確立することがより困難な幾つかのオーバーラップは誤っているかもしれないが)

副腎毒性エンドポイントの更なる開発が、二つの方法により集中できるだろう。1) NIHS データセット中において過小評価されている化合物クラスの調査を含める。例えば、副腎に対する毒性物質として文献に記載されている化合物クラスや脂肪族化合物、両染色性化合物、そして合成・天然エストロゲンやアンドロゲンを含める[Rosol et

a]。2)相反するような毒性学的結果が報告されているクラスに対する毒性データを再評価する。

精巣毒性エンドポイントの更なる開発は、精巣毒性を有するとしてパブリックドメインにて報告されているクラスの調査を含むことが出来るだろう。例えば、アルコール・鉛・メチルドーパ・フルタミドといった化合物は、質的变化(形態学的異常)や量的変化(成熟精子細胞の減少)へと導く精子形成に影響を及ぼすと示されている[Chapin and Williams]。更に、既存の精巣毒性アラート alert 067 “Monothio glycol or glycol monoalkyl”は、潜在的に NIHS データセットからの幾つかの化合物を含むように拡張できるだろう。

心臓毒性エンドポイントの更なる開発は、心臓毒性を有するとしてパブリックドメインにて報告されているクラスの調査を含むことが出来るだろう。例えば、局所麻酔薬は、例えば頻脈のような不整脈を引き起こすと報告されている[Reiz and Nash]。

これらの Rapid Prototype は、予測の信頼性を評価するために外部データセットに対してバリデーションされる必要があるかも知れず、そして、そのバリデーションに基づき、実装された Rapid Prototype の更なる改良を行えるかも知れない。

参考文献

Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J and Capen CC, *Toxicologic Pathology*, **2001**, 29 (1), 41-48.
Zarn JA, Brüscheiler BJ and Schlatter JR, *Environmental health perspectives*, **2003**, 111 (3), 255-261.

Sanderson JT, *Toxicological sciences*, **2006**, 94 (1), 3-21.

Gaworski CL, Aranyi C, Vana S, Rajendran N, Abdo K, Levine BS and Hall A 3rd, *Fundamental and applied toxicology*, **1991**, 16 (1), 161-171.

Nakamura D, Yanagiba Y, Duan Z, Ito Y, Okamura A, Asaeda N, Tagawa Y, Li C, Taya K, Zhang SY, Naito H, Ramdhan DH, Kamijima M and Nakajima T, *Toxicology Letters*, **2010**, 194 (1-2), 16-25.

Malik JK, Aggarwal M, Kalpana S. and Gupta RC, *Reproductive and Developmental Toxicology*. Gupta RC (Editor), Academic Press. **2011**, 487-501.

Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F and Kalender Y, *Food and Chemical Toxicology*, **2009**, 47 (8), 1903-1908.

Latendresse JR, Brooks CL, Flemming CD and Capen CC, *Fundamental and applied toxicology*, **1994**, 22 (3), 392-399.

Chapin RE and Williams J, *Toxicologic Pathology*, **1989**, 17 (2), 446-451.

Reiz S and Nath S, *British journal of anaesthesia*, **1986**, 58 (7), 736-746.

Part II: *In Vivo* 染色体異常予測

序論

これまで、DfW の *in vivo* 染色体異常予測の改良は NIHS Year4 と Collaborative projects の焦点であった。全部で 17 個の *in vitro* 染色体異常アラート(付録IV)がこれまで三つの *in vivo* 染色体異常データ: FDA Genetox Database (Leadscope Inc)、

Kirkland データセットの一部 (NIHS により提供された)、オンライン毒性データベース Vitic Nexus (database version 1.75) を使って調査されている。多くの場合において、それらの *in vivo* 活性を予測するために、新たな reasoning rule が既存の *in vitro* 染色体異常アラートに対して追加された。In vivo 活性が異なる、もしくは、*in vitro* 染色体異常アラートと比較して関連が無い場合は、アラートコメントの更新に留まった。最後に、例えば異なるメカニズムのために別々のスコープが描画されるような化合物クラスに対しては、新たなアラートが実装された。この作業の結果、Kirkland データセットに対する *in vivo* 染色体異常予測の感度が 29% に上昇し、組み合わせられたデータセットに対して全体的な感度が 20% に上昇した。

NIHS Year5 プロジェクトの目的は、DfW の *in vivo* 染色体異常予測の被覆率を更に改善させ続けることである。上記で述べられたデータセットを使っての既存 *in vitro* 染色体異常アラートの *in vivo* アラートへの拡張は、このエンドポイントの予測の感度を上昇させる比較的素早い方法であることが示されている。しかしながら、しばしば一貫性の無い試験結果を有するこれらのデータセット間の重複の存在は、開発するアラートの優先順位付けのために、標準的なデータセットを持つ必要性を指摘してきた。この理由のために、意思決定ベース手法が

重複データを取り除き、陽性結果の有無に基づき最終結果を定義することで三つのデータセットを組み合わせるために開発された。

この報告書では、*in vivo* 染色体異常の組み合わせられたデータセットを用いて候補アラートを特定するための僅かに修正された手法を記述する。そして、既存の *in vitro* 染色体異常アラートに対する更新によって続けられたデータの次なる解析、および、新しい *in vivo* 染色体異常アラートの開発が記述されている。

方法

・データセットの組み合わせ

この作業において、三つの *in vivo* 小核試験データが使用された。

Kirkland データセットの一部 - NIHS により蓄積、提供されたデータセットであり、*in vivo* 小核試験データを有する 256 個の化合物を含む。

FDA Genetox Database - Leadscope Inc. のデータベースから抽出されたデータセット。*in vivo* 小核試験データを有する 956 個の化合物を含む。

Vitic Nexus - オンラインデータベース Vitic Nexus (database version 1.75) から抽出されたデータセット。*in vivo* 小核試験データを有する 804 個の化合物を含む。

これらの三つのデータセットが組み合わせられ、ある化合物に対して三つのデータセットの内の何れか一つが陽性結果である場合最終結果を陽性とするように、各々の新規化合物に対して最終結果が割り当てられた。少なくとも一つの弱陽性結果を有する化合物は弱陽性と割り当てられた(ただし陽性結果が報告されていなかった場合)。少なくとも一つの"equivocal"な結果を有する化合物(ただし陽性もしくは弱陽性結果が報告されていなかった場合)にたいして

は”equivocal”、陰性結果のみを有する化合物については陰性を割り当てた。不確定を除き何か他の結果を持たない化合物は不確定とした。そして、データセット中に残っている重複構造や化合物構造に関連の無いレコードは除外された。このことにより、overall in vivo 染色体異常結果を有する1544個の化合物データセットの生成に至った。(如何にして最終結果の割り当てがなされ、データセットから如何にして重複データが除外されたのかに関する詳しい説明は、付録 V を参照。)

・候補アラートの特定

次に、組み合わせられたデータセットが DfW version14 の in vitro 染色体異常アラートに対して予測処理され、それに続く陽性予測率が各々のアラートに対して算出された(付録 VI)。この解析からは、弱陽性、equivocal、不確定、および、データが無かった化合物は除外された。更なる調査のための候補アラートを選択するための基準は、高い陽性予測率だけでなく、アラートにヒットした化合物数や化合物クラスの専門家による分析といった他の要因の考慮にも基づく。更なる調査のために選択された候補アラートは、付録 VII において強調されている。

・In vivo 染色体異常予測の開発

候補アラートを選択した後、アラートにヒットした各々の化合物の実験値を文献からの原著論文に対してチェックした。可能であれば、同じ化合物に対して競合する結果がテストプロトコル(例: 投与量、サンプリング時間、組織、投与経路など)の違いに

基づき正当化された。化合物には実験結果、陽性・陰性・不確定が割り当てられた。加えて、それら化合物や化合物クラス中の別の化合物に対して追加的なデータソースを特定したり、また、提案されているメカニズムや一貫しない結果に対する原因を支持したりするために、一般的な文献の検索を行った。

結果

更なるアラート開発のために、7個のアラートが特定された(付録 VII)。調査により、4個のアラートが in vivo 染色体異常をカバーするように拡張され、その各々に対して Reasoning rule が追加された(表 7)。例えばスルホン酸エステルのような、化合物のサブクラスが in vivo 活性ありとして特定されたような alert 027 に対するアラートコメントが更新され、それに続いて独立したアラートが実装された。化合物クラスに対する調査の結果として、三個の新しい in vivo 染色体異常アラートが実装された。