

アラート番号	アラート名称	結果	Reasoning Rule	Likelihood
019	Epoxide	<i>in vivo</i> にアラート拡張	新 reasoning rule 追加	Plausible
027	Alkylating agent	コメント更新 新規アラート実装 (748).	alert 748 にルール追加	N/A
323	Aryldialkyltriazene	<i>in vivo</i> にアラート拡張	新 reasoning rule 追加	Plausible
519	Aminocarbazole analogue	<i>in vivo</i> にアラート拡張	新 reasoning rule 追加	Plausible
530	Inorganic arsenic compound	<i>in vivo</i> にアラート拡張	新 reasoning rule 追加	Plausible
576	Thymine, cytosine or derivative	新規アラート実装(751)	alert 751 にルール追加	N/A
577	Purine base	新規アラート実装(752)	alert 752 にルール追加	N/A
748	Alkyl sulphate or sulphonate	027 を拡張するように実装	新 reasoning rule 追加	Plausible
751	Thymine or cytosine derivative	576 を拡張するように実装	新 reasoning rule 追加	Plausible
752	Purine base	577 を拡張するように実装	新 reasoning rule 追加	Plausible

表 7: 候補アラートと調査の結果のリスト。実装された新しいアラートは赤くハイライトされている。N/A = 非適用。

新しい *in vivo* アラート実装の背後の Reasoning

In vivo アッセイに対して予測を行えるように *in vitro* アラートを拡張することが可能である場合、この背後にある Reasoning は殆ど説明を必要としない(即ち、アラートにヒットする化合物の大部分が *in vivo* 染色体異常試験において陽性を示す)一方、新しいアラートが *in vitro* アラートによってカバーされる多くの化合物の *in vivo* 活性を記述するように書かれなければならない場合、いくらかの議論が必要となる。

Alert 027 は、アルキル化剤の *in vitro* 染

色体異常誘発能を予測する。ハロゲン化アルキルに加えて、そのアラートは硫黄原子に直接結合している水酸基が欠けている alkyl sulphinates, スルホン酸塩、および、硫酸塩を含む。このアラートは程々の陽性予測率(44%, 付録 VI)を有しているのみだが、比較的多数の陽性化合物(27 化合物)がこのアラートにヒットし、それは更なる解析の適切な候補とされた。

In vivo 陽性および陰性化合物を精査すると、多くのハロゲン化アルキルが *in vivo* 細胞毒性試験において陰性結果となるのに対して、スルホン酸塩と硫酸塩は一般に陽性であることがわかる。例えば、ハロゲン

化アルキル 1,1,2-トリクロロエタン (6)、1,3-ジクロロプロパン (7) [Crebelli *et al*]、そして、3-iodo-1,2-propanediol (8) [NTP 1988]の全ては、マウス骨髄で試験した場合小核の誘導が見られないが、一方で、メタンスルホン酸メチル(9) [Tsuyoshi *et al*]、メタンスルホン酸エチル(10) [Kondo *et al*]、および、ジエチル硫酸(11) [Morita *et al*]は、マウス骨髄もしくは末梢血において陽性となる(図2)。

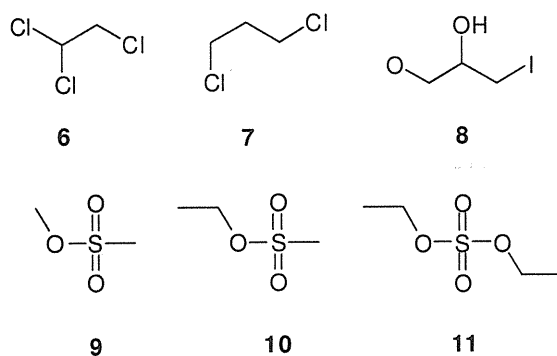


図 2: alert 027 にヒットする化合物の構造

特定された化合物サブクラスの結果として、新しいアラート(alert 748)がスルホン酸塩と硫酸塩により引き起こされる *in vivo* 染色体異常を予測するように実装された(付録 VIII)。この新しいアラートのスコープが図3に示されている。*in vivo* 細胞毒性試験における多くのハロゲン化アルキルの不活性に対する理由は、それらの *in vitro* 活性にも関わらず、明確でない。一つの見込みのある説明は、一般に、ハロゲン化アルキルは反応性が余りに高すぎて標的臓器(骨髄および末梢血)にたどり着けず、代わりに、投与された場所の近くの生体分子と反応する、というものである。

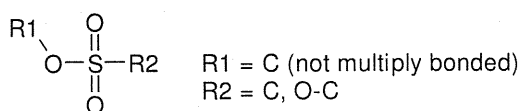


図 3: alert 748 のスコープ

Alert 576 はチミン、シトシンとそれらの誘導体の *in vitro* 染色体異常を予測する。これらの化合物の染色体異常に寄与するかもしれない幾つかのメカニズムが存在する。内因性の塩基とヌクレオシドに対して、DNA 合成中に使用される構成要素のプールにおける dNTP(deoxyribonucleotide triphosphates)の相対的濃度を変えることによって、それらは作用する可能性が高い。このプールの攪乱は DNA への不正塩基の組み込みを通じて突然変異を引き起こし得る。外因性の塩基とヌクレオシド類縁体もまたヌクレオシドプールを攪乱し得るが、そのような化合物も DNA へと組み込まれるかもしれず、それは誤対合や連鎖停止を引き起こす[Wutzler and Thust]。外因性の塩基とヌクレオシドはまた、DNA 合成に関与する幾つかの酵素を阻害することが示されている[Mini *et al*]。

Alert 576 は高い陽性予測率(78%, 付録 VI)を示し、比較的多くの陽性化合物を予測している(7個の陽性化合物)。しかしながら、このアラートは内因性の塩基とヌクレオシドをカバーしており、従って、内因性の塩基とヌクレオシドは *in vivo* 活性を示すことはありそうに無いと思われるため、*in vivo* 染色体異常の予測に対しては適切でないと考えられる。これらの化合物の *in vitro* 活性を説明するメカニズム、ヌクレオシドプールの攪乱は、この効果を引き起こすために

は極端に大きな濃度が求められ、生体内の調節系がそれを圧倒するため、*in vivo* と関連しそうな見込みは低い。これは、組み合わせられた *in vivo* データセットからのデータによって支持される仮定であった。修飾された糖の部分をもつチミンとシトシン誘導体の大部分(例えば スタブジン(12)、ザルシタビン(13)そしてジドブジン (14) 図 4)がマウス小核試験において陽性となる一方[Phillips *et al*]、内因性塩基チミンはたいてい陰性となる[Phillips *et al*]。これを念頭に置いて、修飾された糖の部分をもつチミンとシトシン誘導体の活性をカバーするように、新しい *in vivo* アラートが開発された; 内因性化合物はこのアラートのスコープから除外された。

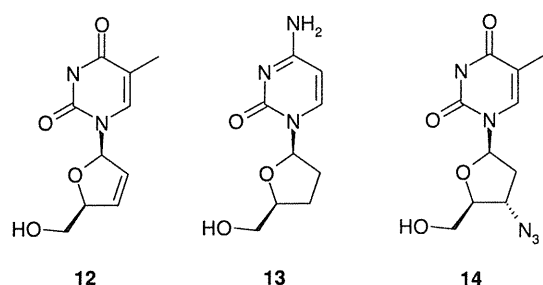


図 4: alert 576 にヒットする化合物の構造

Alert 577 は、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、2-アミノプリンと誘導体を含むプリン塩基の *in vitro* 染色体異常を予測する。ピリミジン塩基とヌクレオシドについて上で議論されたのと同様に、これらの化合物がヌクレオシドプールを攪乱するような染色体異常の惹起や、DNA への組み込みと引き続いて起こる連鎖停止や誤対合や、

DNA 合成に参与する酵素の阻害といった複数のメカニズムがある [Wutzler and Thust]。

Alert 576 と同様に、alert 577 は、比較的高い陽性予測率(67%, 付録 VI)を示すにも関わらず、*in vivo* 染色体異常予測に対しては不適当だと考えられた。In vivo メカニズムとしてヌクレオシドプール攪乱は不適切であるために、内因性化合物が染色体異常を引き起こすことは期待されない。これは、組み合わせられた *in vivo* データセットからのデータによって支持された。即ち、様々な外因性プリンがマウス骨髄小核試験において活性を示す一方で(例えば、アシクロビル(15)、ガンシクロビル(16) [Haynes *et al*]そしてチオグアニン(17) [NTP 1990], 図 5)、陰性結果が内因性プリンアデニンとグアノシンに対して報告されている[Sato *et al*]。これを念頭において、新しい *in vivo* アラートが、外因性プリン塩基、ヌクレオシド、そして、ヌクレオチド類縁体の染色体異常を記述するように開発された。

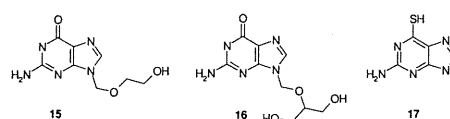


図 5: alert 578 にヒットする化合物の構造

In vivo 染色体異常アラートの予測精度

新規および修正されたアラートを含む新しい知識ベースの予測精度が、組み合わせられたデータセットを使って評価された。表 8 と 9 は、組み合わせられたデータセット中の化合物の *in vivo* 染色体異常の予測について、標準の DfW version 14 (表 8)と

DfW13 NIHS 170112_1 (表 9)知識ベースのそれぞれ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	79	405	484
陰性	57	920	977

感度 = $79/484 = 16.3\%$

特異性 = $920/977 = 94.2\%$

一致率 = $(79+920)/(484+977) = 68.4\%$

表 8: 組み合わせられたデータセットに対する DfW14 の予測精度。1544 個の化合物のデータセットからは、31 個の"equivocal"、43 個の不確定、8 個のデータ無し、そして、1 個の弱陽性化合物は計算から除外され、全部で 1461 個の化合物となった。

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陽性	116	368	484
陰性	70	907	977

感度 = $116/484 = 24.0\%$

特異性 = $907/977 = 92.8\%$

一致率 = $(116+907)/(484+977) = 70.0\%$

表 9: 組み合わせられたデータセットに対する DfW13 NIHS 170112_1 の予測精度。1544 個の化合物のデータセットからは、31 個の"equivocal"、43 個の不確定、8 個のデ

ータ無し、そして、1 個の弱陽性化合物は計算から除外され、全部で 1461 個の化合物となった。

表 8 と 9 から、陽性予測率が 16%から 24%へと有意な改良が、特異性に対して 93%という小さな低下を伴うのみで達成されたことがわかる。正しく予測された陽性化合物(真陽性)の個数は 37 個増加し、一方、誤って予測された陰性化合物(疑陽性)の個数はたったの 13 個のみ増加した。

結論

この調査は、DfW における in vivo 染色体異常エンドポイントの更なる開発をもたらした。さらにまた、(Q)SAR 開発の前に、データ共有とデータキュレーションの重要性がハイライトされた。

参考文献

- Crebelli R, Carere A, Leopardi P, Conti L, Fassio F, Raiteri F, Barone D, Ciliutti P, Cinelli S and Vericat JA, *Mutagenesis*, **1999**, *14*, 207-215.
- National Toxicology Program (NTP), **1988**, *Study ID 670270*.
- Tsuyoshi T, Takeuchi M, Hirono H and Masamoto Y, *Mutation Research*, **1989**, *223*, 383-386.
- Kondo K, Suzuki H, Hoshi K and Yasui H, *Mutation Research*, **1989**, *223*, 373-375.
- Morita T, Asano N, Awogi T, Sasaki YF, Sato S, Shimada H, Sutou S, Suzuki T, Wakata A, Sofuni T and Hayashi M, *Mutation Research*, **1997**, *389*, 3-122.
- Kunz BA, *Mutation Research*, **1988**, *200*,

133-147.

Wutzler P and Thust R, *Antiviral Research*, **2001**, *49*, 55-74.

Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I and Mazzei T, *Annals of Oncology*, **2006**, *17*, v7-v12.

Phillips MD, Nascimbeni B, Tice RR and Shelby MD, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **1991**, *18*, 168-183.

Sato S, Takizawa H and Inui N, *Mutation Research*, **1993**, *301*, 45-49.

Clode SA and Anderson D, *Mutation Research*, **1988**, *200*, 249-254.

Haynes P, Lambert TR and Mitchell I de G, *Mutation Research*, **1996**, *369*, 65-74.

National Toxicology Program (NTP), **1990**, *Study ID 414883*.

Part III: 変異原性予測

序論

NIHS は近頃、WHO 食品添加物シリーズ (FAS)中の化合物に対する公開された結果を元に、376 個の香料化合物に対する Ames 試験データを収集した。In silico システムを使用してのこの種の化合物の活性を予測することは、当局対応向けの食品添加物の評価の観点から、NIHS にとって興味の対象であり、このために予測精度評価研究(論文は近刊予定)の一部として、これらの化合物が DfW 知識ベース version10.0.2 に対して予測処理された。この解析の結果は表 10 に示されている。

A

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陽性	14	22	36
陰性	22	309	331

感度 = $14/36 = 38.9\%$

特異性 = $309/331 = 93.4\%$

一致率 = $(14+309)/(36+331) = 88.0\%$

B

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陰性	10	14	24
陽性	26	317	343

感度 = $10/24 = 41.7\%$

特異性 = $317/343 = 92.4\%$

一致率 = $(10+343)/(24+343) = 96.2\%$

表 10: NIHS により収集された FAS データセットに対する DfW version10 の予測精度。表 A は、予測結果が equivocal の場合その化合物は陽性化合物に対して含まれ、表 B では陰性化合物と見做した。

この研究において、我々はこの研究においてなされた予測とデータセットが DfW version 13.0.0i に対して予測された際の結果を比較した。そして、我々は DfW によってなされた予測を評価し、個々の疑陰性化合物の主要なデータを解析・個々の化合物の被覆率に対する結論を導き・full 変異原性アラートの開発に対して最も有望な化合物クラスを選択するによって、データセッ

トに対する感度を改善させることを目的とした。加えて、我々は DfW により特定された疑陽性化合物に対して幾らかの予備解析を行うことを意図した。

方法

この研究に対するデータセットが 454 個の構造を含む SD ファイルと 367 個の化合物や混合物に対する全体的な Ames 試験結果を含むエクセルシートとして提供された。

化合物構造のデータベースが Instant JChem³により SD ファイルから作成され、次に Ames 試験結果を有する化合物がそれらの全体的な結果とそれらの JECFA 番号を使用して DfW version10.0.2 にて得られた結果とが突き合わせられた。Ames 試験結果の無い 25 化合物がデータセットから除外され、結果として 429 個となった。

異なる化合物構造が、同じ試料に対して試験された異なる幾何異性体もしくは構造異性体を表現していたので、多くの残りの化合物が同じ JECFA 番号によって共有された。幾何異性体の場合、個々の異性体の内の一つの物質がデータセット中に残され、その構造中の二重結合は未定義とした。それ以外の構造は削除された。同じ JECFA 番号を共有している化合物の場合、様々な構造異性体が同時に試験されていたため、個々の化合物がデータセット中に残された。

次に、DfW version13.0.0i に対して予測が実行された 376 個の化合物のデータセットを得た。その結果からデータベースが得られ、DfW version10.0.2 と DfW 13.0.0i の間の予測結果の差異が解析された。個々

の疑陰性化合物に対して、主要な文献に立ち戻ることにより、また、個々の化合物に対するデータとそれらの関連する構造を詳細に解析することにより、詳細な評価が行われた。そして、新規もしくは更新アラートに対する可能性の決定がこれらの知見や構造活性相関を導出できるであろうケースを含む他の要因に基づき、成された。これは、アラート開発に対して二つの化合物クラスを導き、これらの化合物クラスに対して full 変異原性アラートが書かれた。加えて、疑陽性化合物に対する簡易的な評価も為された。これはすべて結果と解析を含んでいる Instant JChem データベース中に記録された。

結果

この研究において使用されたデータセットは、367 個の化合物・混合物に対して得られた Ames 試験結果から導かれた 376 化合物から成る。24 個の化合物が Ames 陽性、340 個が Ames 陰性、12 個が equivocal として、NIHS により割り当てられた。

DfW 10.0.2 と DfW 13.0.0i を使って得られた結果の比較

このデータセットに対する DfW 10.0.2 の予測精度が NIHS により評価され、その結果が表 10 に示されている。二つのプログラムバージョン間のあらゆる差異を評価するために、データセットが DfW version 13.0.0i に対して予測処理され、その結果を表 11(この解析において、別々の化合物として表現されている混合物のために、結果の重複が考慮されている)に見ることができ

³ Instant JChem Version 5.5, ChemAxon

A

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陽性	17	19	36
陰性	44	287	331

$$\text{感度} = 17/36 = 47.2\%$$

$$\text{特異性} = 287/331 = 86.7\%$$

$$\text{一致率} = (17+287)/(36+331) = 82.8\%$$

B

Derek for Windows 実験	陽性	陰性	合計
陽性	12	12	24
陰性	49	294	343

$$\text{感度} = 12/24 = 50.0\%$$

$$\text{特異性} = 294/343 = 85.7\%$$

$$\text{一致率} = (12+294)/(24+343) = 83.4\%$$

表 11: NIHS により収集された FAS データセットに対する DfW version 13.0.0i の予測精度。表 A は、予測結果が equivocal の場合その化合物は陽性化合物に対して含まれ、表 B では陰性化合物と見做された。

これらの表を比較することにより、古いバージョンと比較して新しいバージョンの DfW において感度が良好に向上している (equivocal 化合物を陰性で見做すと、41.7% から 50% となる)。事実、これは 4-oxy-3(2H)-furanone の活性を記述するアラート(number 645)に起因すると考えられ

る。この表から、このデータセットに対する特異性が二つのプログラムバージョン間で減少しているように見える一方 (equivocal 化合物を陰性で見做すと 96.2% から 85.7% となる)、疑陽性化合物に対するより詳細な解析は、その化合物の多くが実際に DfW のアラートにヒットするはずだということを示している (より詳しい説明は以下を参照)。

各々の解析における感度は未だ比較的低いものの、データセット中の相対的に少ない個数の陽性化合物により (全部で 24 個)、このソフトウェアの予測精度を評価するためにこの値を使用する際には注意が払われるべきだということに留意する必要がある。この少ない個数の結果として、わずかな個数の化合物に対する試験結果の変更は、生成された個数に対して顕著な効果を与えるかもしれない。このデータセットから生成された特異性は、データセット中の比較的多数の陰性化合物のために、より信頼できるかもしれない。

データセット中の疑陰性化合物の解析

Equivocal 化合物に対して如何にして正確に割り当てられるべきかの評価が困難であるため、データに対する我々の更なる解析においては無視された。従って、我々はデータセット中の残りの 12 個の疑陰性化合物をより詳しく調査することから始めた。我々の調査の知見と個々の化合物に対するアラート開発可能性の評価は付録 X のデータベースから抽出された表で確認できる。

手短かに言えば、二つの化合物が明確なメカニズムと関連の可能性のある明確な陽性結果 (たとえ弱かったとしても) を有してお

り、同じクラス中の化合物も Ames 試験において陽性となるため、それら二つの化合物は構造アラートを持つ可能性があるとして評価された。5 個の化合物は構造アラートを有する限定された可能性があるとして示されているが、この化合物に対して唯一のかつ化合物クラスの他の化合物により反映されていない(もしくは関連する化合物が試験されていない)、もしくは陽性結果が得られるために求められる特別な条件のために、この開発が成功することの確からしさは低かった。最後に、化合物のうち 5 個に対する結果が明確でない、もしくは、標準的な条件下における Ames 試験結果が陰性であることを示しているため、それら化合物は構造アラート開発の可能性を持たないとして割り当てられた。

アラート開発の良い候補であるとして特定された二つの化合物クラス、ジアセチルとマルトールは、更に調査され、これらの化合物に対してアラートが開発された。

新しい変異原性アラートの導出

ジアセチルとマルトールの活性に対する手始めの調査では、両者に存在する 1,2-diketone 官能基(図 6 において、18 と 20 により描画されている)を軸として展開し、恐らく共通の変異原性メカニズムが存在し、従って、両者の化合物に対して一つのアラートが示された。1,2-diketone 箇所は、DNA 塩基と *in vitro* で付加体を形成するように反応することが示されており [Rodriguez Mellado and Ruiz Montoya]、このメカニズムは 1,2-diketone 系の遺伝毒性に対して役割を演じているとして示唆されている [Bjeldanes and Chew] (図 6)。し

かしながら、この官能基は両化合物の活性に対して役割を演じている可能性が高いが、より大きなトキシコファーと関連している他のメカニズムやマルトールとその誘導体に対して役割を演じているかも知れない光活性化の可能性が考えられる [Watanabe-Akanuma *et al.*] ことが、更なる調査で示された。

結果として、二つの別々のアラートが DfW version13 の知識ベースに対して実装され、それはこの報告書において DfW13 NIHS 170112_1 として引用され、これらの個々のサブクラスに基づく。各々のクラス中の幾つかの化合物に対して得られた比較的弱い陽性、いくつかの化合物に対する首尾一貫性の無い、あるいは陰性の結果は、これらのアラートに対して Reasoning level として equivocal が割り当てられたことを意味する。個々のアラートに対する RTF レポートは付録 XI で確認できる。

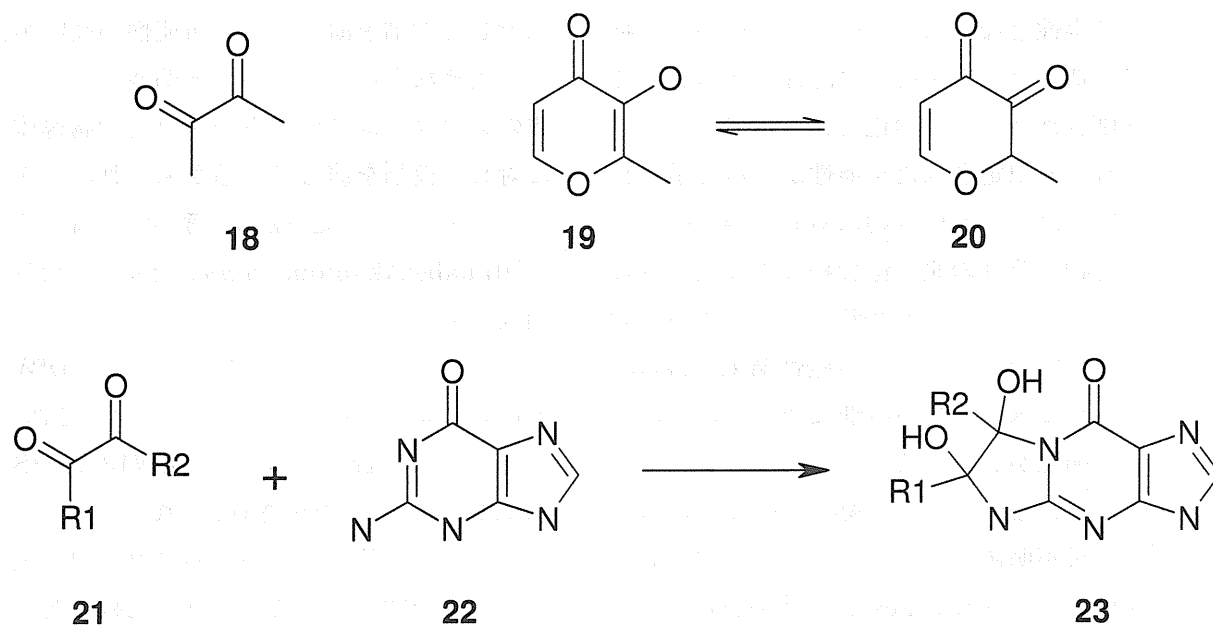


図 6: ジアセチルとマルトールの 1,2-diketone 互変異性体と、それらの DNA 塩基との可能性の考えられる反応

これらの新しいアラートの実装は、特異性に影響を及ぼすこと無くデータセットに対して DfW の感度を著しく向上させた。これらのアラートの実装後の解析の結果が表 12 に示されている(この解析において、別々の化合物として表現されている混合物の存在のために結果の重複が考慮されている)。

A

Derek for Windows 実験 \	陽性	陰性	合計
陽性	19	17	36
陰性	44	287	331

$$\text{感度} = 19/36 = 52.7\%$$

$$\text{特異性} = 287/331 = 86.7\%$$

$$\text{一致率} = (19+287)/(36+331) = 83.4\%$$

B

Derek for Windows 実験 \	陽性	陰性	合計
陽性	14	10	24
陰性	49	294	343

$$\text{感度} = 14/24 = 58.3\%$$

$$\text{特異性} = 294/343 = 85.7\%$$

$$\text{一致率} = (14+294)/(24+343) = 84.0\%$$

表 12: NIHS により集められた FAS データセットに対する DfW13 NIHS 170112_1 の予測精度。表 A は、予測結果が equivocal の場合その化合物は陽性化合物

物に対して含められ、表 B では陰性化合物と見做された。

データセット中における疑陽性の解析

DfWに対してデータセットが処理された際に生成された比較的少ない個数の疑陽性化合物はとても有望である。特に、データセット中において高い割合を示している陰性化合物数を考慮すると尚更である。しかしながら、DfW version10.0.2 と version13.0.0i の間の疑陰性化合物の増加には、幾つかの説明が必要となる。生成された追加的な疑陽性化合物(22 個)の大部分は、*in vitro* のほ乳類細胞系におけるアルキルアルデヒドやそれらの前駆体に対する変異原性を記述する単一アラート alert 306 に関連している。従って、これらのデータはこのアラートに対する妥当性は有しておらず、これらの疑陽性化合物は無視することができる。生成された他のたった一つの疑陽性化合物は、フランの変異原性に関連するアラート(alert 574)に対する更新の結果である。このアラートのスコープ変更は、この一つの化合物に対してなされた予測に対して悪影響を与える一方、そのアラートはコメント欄に記述されている個々の化合物に対して得られた結果における極度の変動性を有する化合物クラスについて記述している。従って、このアラートに対するより広範なスコープは 2,3 個の疑陽性を生み出すかも知れない一方で、アラートによって提供される情報はこの欠点を埋め合わせると考えられる。このデータセットからの疑陽性の要約は付録 X で見ることができる。

結論

結論として、この調査は、僅かな個数の疑わしい陽性結果を有する化合物を含むデータセットを使用した際 DfW の変異原性エンドポイントの感度を上昇させることが困難であることを示したかもしれない一方で、これらのデータを使用して知識ベースに対して幾らかの改良を加えることが可能であることを強調した。この調査の一部として実装された二個のアラートのスコープは限定されており、記述された活性は通常弱い(個々のアラートに対する要因と考えられる reasoning level によって反映されているように)一方、アラートコメントに記載されている個々のクラスに対する活性に関する情報が、これらのアラートにヒットする試験済の他の化合物の調査に際して有用となるだろう。データセット中で陽性とされている残りの化合物はより広範な文献によって支持されているわけでもそれらの活性が全体としてクラスを代表しているわけでもないので、このデータを元に更にアラートを実装することは困難だろう。より広範な文献で陰性と記述されている化合物の場合において、更なる行為を行なうことのできる見込みは低い。活性は見られるものの関連する化合物に対して殆んどまたはまったく活性の見られないそれらの化合物に対して、DfW において何らかの方法でこれらの化合物を表現することは有用かも知れない。現在、そのような化合物のデータは通常 Vitic Nexus において表現されており、このデータベースの構造検索は化合物と関連付けられたデータを強調するだろう。加えて、これらのような多くの化合物クラスとアラートが無いことの原因として与えられた説

明が、Lhasa Limited ウェブサイト (https://www.lhasalimited.org/derek_nexus/no_predictions_in_derek/) の “No predictions in Derek?” ページに列挙されている。従って、これら二つの情報と DfW の間の関係を強化することは有益であるかも知れない。

参考文献

Rodriguez Mellado JM and Ruiz Montoya M, *Mutation Research*, 1994, 304, 261-264

Bjeldanes LF and Chew H, *Mutation Research*, 1979, 67, 367-371

Watanabe-Akanuma M, Inaba Y and Ohta T, *Mutagenesis*, 2007, 22, 43-47

結論と今後の方向性

標的臓器毒性予測

既存の標的臓器毒性 Rapid Prototype アラートから Full アラートへの開発

DfW 知識ベースは現在、NIHS との共同プロジェクトの一部として開発された 96 個の Rapid Prototype アラートを含む。DfW の Rapid Prototype アラートは新しいデータセットの探索やタイムリーなやり方で新しいエンドポイントを予測することに役立つ。しかしながら、これらのアラートはデータの探索のための単なる出発点であり知識ベースの永続的に固定されたものであるべきでない、というのが我々の方針である。従って、何らかの方法でこれらの Rapid Prototype を将来のプロジェクトで評価すること、そして、将来何らかの決定がなされることは有用であるだろう。幾つかは恐

らく full アラートへと開発されるかも知れないし、その他のものは見込みが低いかも知れない。これを達成する方法が議論されなければならないだろうが、優先順位付けは入手可能な支持データの量や毒性へと至る考えられ得るメカニズムが特定できるか否かに基づくかも知れない。

予測を行うための自己組織ネットワークと標的臓器データを組み合わせる

新しい Rapid Prototype アラートは現在 DfW 知識ベースに対して追加されていない。従って、NIHS プロジェクトを通じて生成されたあらゆる Rapid Prototype はプログラムの将来バージョンに対して含められないだろう。探索されたデータセットは広範なケミカルスペースをカバーしており極わずかな陽性結果を含むということを組み合わせると、このことは従来の手法で標的臓器毒性に対する Rapid Prototype 開発の模索を継続することが有益でないかもしれないことを意味する。データは full アラートを開発するために使用できるだろうが、調査されたエンドポイントは一般に新しいので、このやり方では与えられた時間内で要求された被覆率を達成できないかもしれない。

しかしながら、我々は現在、毒性データ (二値データと連続値の双方) と関連する化学構造とを組み合わせ取り扱ったり、クラスターを構築したり、このデータを元にアラートを有する部分構造を提案したりする可能性を持つ自己組織ネットワークを含む新たな知識発見ツールに従事している。このツールは、異なる毒性エンドポイント間の関係性および恐らく毒性へと至るメカ

ニズムを探索すると同時に、標的臓器データからの構造アラートの開発を自動化することにおいて有用であるかも知れない。NIHS に対して潜在的に興味を引き起こす様な結果に加えて、この調査はこのツールの機能開発の指針を与えることを支援するだろう。このソフトウェアは現在まだ開発段階にあるので、得られた結果は DfW のメインリリースには組み込まれないかもしれない。しかし、うまくいけば、この技術の進展と併せてこの調査の一部として特定されたクラスターと部分構造がこの調査を価値あるものにするだろう。

In vivo 染色体異常予測

in vitro アラートと化合物クラスの in vivo 活性の間の関係の調査を継続する

in vivo 染色体異常に対する全体的結果を持つ化合物の大きなデータセットを生成したこの作業と、in vivo 染色体異常を予測するように拡張される in vitro アラートの可能性を調査するためにこのデータセットを使用することは、今回および過年度のプロジェクトにおいて非常に実りあるものであったことを証明した。解析を必要とする in vitro アラートの個数がこの作業の結果として著しく減少してしまった一方、このデータセットに対する予測の大幅な改善に至るかも知れない幾つかの in vitro アラートが 2,3 個残っている。もしも次年度のプロジェクトの一部として、継続した取り組みに焦点が当てられるのであれば、これらの残りの in vitro アラートを更新することは有用であるだろう。

In vitro アラートによってカバーされていない

疑陰性化合物を調査する

DfW における in vitro 染色体異常アラートにヒットする in vivo 染色体異常データセット中の陽性化合物に加えて、DfW 中のあらゆる染色体異常アラートにヒットしない 257 個の陽性化合物がデータセット中にある。このことは、予測されていない非常に多くの化合物が残されていることを意味し、これらの活性を予測するためのアラートを開発することが求められるだろう。DfW 知識ベース中の既存の変異原性アラートや発がん性アラートを基本としてこれらの化合物から新たなクラスを特定することが可能かもしれない。しかしながら、これらの化合物に対して新たなアラートを開発することは既存のアラートを更新することよりも恐らく時間のかかることだろう(これが解析され、また、in vivo データに加えてアラートに記述されなければならないので、もしも in vitro 染色体異常データ入手可能であるならば特に)。これは結果を評価するときには、心に留めて置かれなければならない。

In vivo 活性に対する投与経路と組織特異的な予測をより詳しく調査する

In vitro 構造アラートに基づいて in vivo 活性をモデリングする我々の現在の手法は幾つかの場合において単純かつ効果的である一方、この種の化合物に基づくクラスに対して in vivo で得られた結果や、もしくは、試験に対して選択されたプロトコルにおける幾つかの微妙な点を見逃しているかも知れない(例えば、選択された投与経路や抽出された組織)。例えば、メカニズムの結果が毒性や化合物に特有の毒性に至るので、芳香族ニトロ化合物や脂肪族アルデヒドとい

った化合物クラスは、幾らかの組織、および、投与経路選択性を示す(芳香族ニトロ化合物はニトレンウムイオンを形成し、もしくは、付加体を形成するそれらの前駆体は肝臓において最も容易に検出される。脂肪族アルデヒドにより引き起こされる染色体異常は、化合物の反応性のために、投与経路のサイト近傍で最も容易に検出される)。現在、この情報は特異性が入手可能なデータから明らかであるようなアラートのコメント欄に記録されており、これはこれらのケースにおいて適用可能であるかも知れない。しかしながら、徹底的にテストされていないクラスに対して、そのような特異性は検出されないかもしれず、このことは *in vivo* 染色体異常がこのクラスに対して予測されないという結果となるかも知れない。

多くの *in vitro* 染色体異常アラートは毒性に至るかも知れないメカニズムに基づいており、本質的に現時点において我々はこの/これらのメカニズムが *in vivo* に関連するかまたはしていないのかを予測している。我々が実際に意味していることは、このメカニズムが組織や試験された化合物に対する投与経路に関係しないということである。従って、全ての *in vitro* メカニズムが関連があり(*in vitro* 染色体異常アラートによって表現されている通り)、そして、メカニズムが特定の投与経路を通じて試験された化合物や試験された組織に対する *in vivo* 活性に至るかどうかが他の要因が決定づけるという仮定を受け入れることがより効果的であると示されるかも知れない。そして、このことは化合物が *in vivo* 活性を示すかどうかを決定する際に我々がこれらの要因を検出し、これらに基づいて判断を下すことを求

めるだろう。これらの要因は、本質的な反応性に対する依存性とクラスが毒性を引き起こすと考えられるメカニズムを持つことと同様に特定の化合物の ADME パラメータを含むかも知れない(前者は経口投与試験において重要であり、後者二つは上記で述べられたような二つのクラスに対して有意である)。これら全ての要因を考慮に入れたシステムを作成することは困難だろうが、現行の *in vivo* アラートにより為された予測に対して効果的な改良を施すことができるかもしれない重要な要因を特定することは興味深いかも知れない。メカニズムに関する情報が *DFW* のアラートの大部分に対して利用可能であるため、これはあらゆる調査のための良い出発点であると思われる。アラートは大雑把に以下のクラスに分けられる。DNA/タンパクに対して直接反応するもの、DNA と非共有結合するもの、ROS を生成するもの、そして、DNA 複製/合成に関与する酵素と相互作用するもの。個々の作用機序クラスに対して、メカニズムタイプと最も感受性の高いテストプロトコル間の関係が調査できるだろう。その結果に依存して、あらゆる相関関係がそれぞれのプロトコルに対する Reasoning を個々に変更するために使用できる(例えば、反応性の高い生物種に対して代謝活性化されたクラスが肝臓に現れるかも知れない)。そして、他の物理化学的な要因がプロトコルやメカニズムタイプに依存して考慮できるだろう。まず、その手法は限定されたプロトコルのみを評価することによって単純化されるだろう(経口もしくは腹腔内投与、肝臓もしくは骨髄組織)。本研究成果は将来の研究の方向性に重要な影響を及ぼすと結論された。

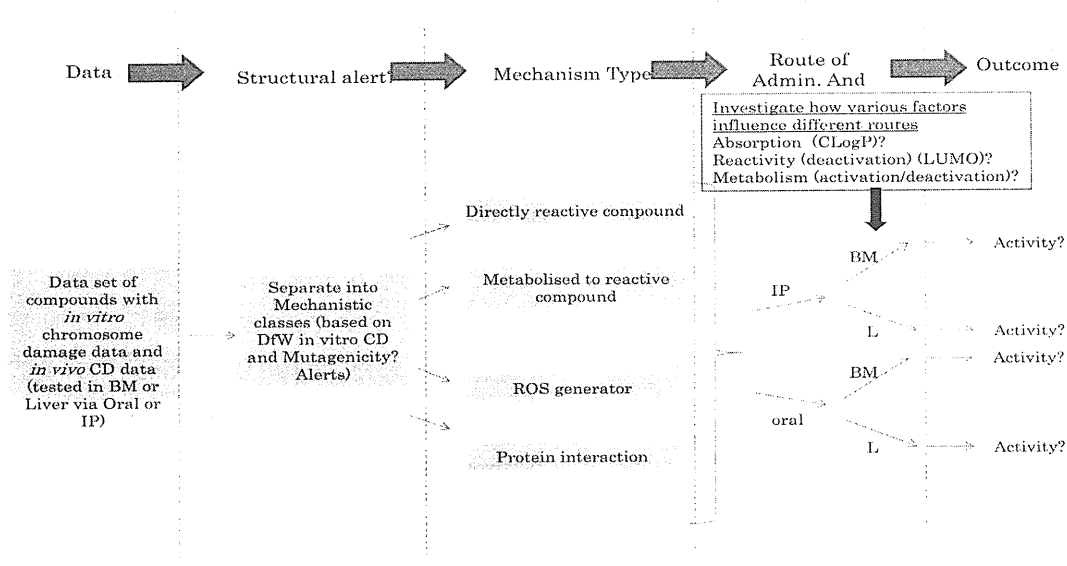


図 7: *in vitro* 毒性から *in vivo* 活性への経路と、可能な調査ポイント

In vitro での最小有効量レベルと *in vivo* 活性の間の関係性を調査する

in vitro 染色体異常に至る最小有効量と *in vivo* 化合物活性の相関については、Lhasa Limited により最近ポスター発表されており、結果は *in vitro* 最小有効量と化合物の *in vivo* 活性の間に相関関係があるということを示した。ただし、*in vitro* 活性を示すために高投与量が必要とされる化合物は一般に *in vivo* 活性は見られない。このことから、この領域において、*in vitro* 染色体異常試験に対する最高投与量が減らされるべきだという提言へと至った、より詳細な調査を支持する[Morita *et al*]。将来のプロジェクトにおいて、より大きなデータセットの解析により、そして、この広範な見解の中のより具体的な関係性を探索する(例えば、毒性に至るメカニズムが最高投与量カットオフ値に影響を及ぼすか否か(DfW 内の既存の構造アラートを使ってデータポイントをクラスタリングすることにより)、如何にして標的

組織および投与経路が最高投与量カットオフ値に影響を及ぼすか、そして、如何にして他の物理化学的パラメータがこれらの最高投与量と相関しているか)ことが重要と考えられる。今回の結果は現時点では DfW に直ちに組み込まれないかも知れないが、更なる調査を促し、将来我々がプログラム中のこれらのエンドポイントの間の相関関係を開発する道しるべとなるかも知れない。もしもクラス効果が観測されるならば、アラートコメント欄にこれらの調査による知見についての幾らかの情報を含めることが可能であろう。

参考文献

Morita T, Honma M and Morikawa K, *Mutation Research*, 2012, 741, 32-56

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の情報収集に関する調査

研究目的

既存化学物質の物理化学的性質、環境運命及び環境毒性の性状に基づいて構造分類を行うために、各種の毒性データを収集し、翻訳整理すると共に、カテゴリー分類のための基礎的研究を行う。

研究方法

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し、文献調査を行うとともに、データギャップの部分については、必要に応じて構造活性相関手法を用いて補完した。これらの結果を基に、SIAP、SIAR 及び IUCLID Dossier を作成した。

調査対象物質

今回の調査における対象物質を以下に示す。

CAS No. 87-59-2	2,3- Dimethylaniline
CAS No. 95-68-1	2,4- Dimethylaniline
CAS No. 95-78-3	2,5- Dimethylaniline
CAS No. 87-62-7	2,6- Dimethylaniline
CAS No. 95-64-7	3,4-Dimethylaniline
CAS No. 108-69-0	3,5-Dimethylaniline

研究結果

環境運命については、上記 6 物質は、いずれも難分解性かつ低濃縮性であり加水分解性も示さない。環境に放出された場合は主に土壌及び水に分布する。また、いずれの物質も環境省が実施している化学物質環境実態調査の結果があり、環境への放出は低い

と考えられた。

環境毒性については、水生生物の藻類、甲殻類(オオミジンコ)及び魚類の試験結果が得られたが、2,4-ジメチルアニリンのみ藻類及び魚類の試験結果が得られず、構造活性相関手法を用いて推定を行った。ジメチルアニリン異性体 6 物質は、魚類及び藻類に比べて甲殻類(オオミジンコ)に対してより強い毒性を示した。魚類では、3,5-ジメチルアニリンを除く 5 物質は LC50 がおおよそ 100mg/L 超であったが、3,5-ジメチルアニリンは LC50 の値が 17-33.9mg/L であり他の 5 物質よりやや強い毒性を示した。甲殻類(オオミジンコ)では、3,4-ジメチルアニリン及び 3,5-ジメチルアニリンの EC50 倍が他の物質よりも僅かに小さい値を示した。また、甲殻類(オオミジンコ)に対する NOEC は 2,6-ジメチルアニリンを除き 0.1mg/L 以下であり、強い毒性を示した。藻類では、EC50 倍は 8.59-100mg/L 超の範囲にあり、3,4-ジメチルアニリンが他の物質よりもやや強い毒性を示した。

調査により得られた環境運命及び環境毒性に関する結果を経済協力開発機柄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 としてまとめた。これらの書類を付録に添付する。

添付資料

添付資料 1 ジメチルアニリン異性体 6 物質カテゴリーの SIAR

添付資料 2 ジメチルアニリン異性体 6 物質カテゴリーの SIAP

研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) Ono, A., Takahashi, M., Hirose, A., Kamata, E., Kawamura, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada, M., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y. and Honma, M. ;Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals. Food Chem Toxicol , 50,1538-1546,(2012)
- 3) Hirata-Koizumi, M., Fujii, S., Furukawa, M., Ono, A. and Hirose, A. ;Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate in rats. Reprod Toxicol , 31,219-230,(2011)
- 4) Hirata-Koizumi, M., Fujii, S., Ono, A., Hirose, A., Imai, T., Ogawa, K., Ema, M. and Nishikawa, A. ;Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluorooctadecanoic acid in rats. J Toxicol Sci , 37,63-79,(2012)
- 5) 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, 小野 敦, 鎌田 栄一, 広瀬 明彦 ;OECD化学物質対策の動向 (第17報) -第28回 OECD高生産量化学物質初期評価会議 (2009年パリ) 化学生物総合管理学会誌, 7,47-54,(2011)
- 6) Heddle JA, Fenech M, Hayashi M, Macgregor JT (2011), Reflections on the development of micronucleus assays, Mutagenesis, 26(1), 3-10.
- 7) Morita, T., JT MacGregor and M. Hayashi (2011), Micronucleus assays in redent tissues other than bone marrow, Mutagenesis, 26(1), 223-230.
- 8) Dertinger, SD, DK Torous, M Hayashi and JT MacGregor (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: An efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage, Mutagenesis, 26(1), 139-145.
- 9) Bolognesi, C and M Hayashi (2011), Micronucleus assay in aquatic animals, Mutagenesis, 26(1), 205-213.
- 10) Kirkland, D.J., Hayashi, M., Jacobson-Kram, D., Kasper, P., Gollapudi, B., Mueller, L. and Uno, Y.(2011), Summary of major conclusions from the 5th IWGT, Basel, Switzerland, 17-19 August 2009, Mutat. Res., 723, 73-76.
- 11) Aardema, MJ, S Galloway, E Zeiger, MC Cimino and M Hayashi (2011), Guidance for understanding solubility as a limiting factor for selecting the upper test concentration in the OECD In Vitro Micronucleus Assay Test Guideline No. 487, Mutat. Res., 722, 89-90.
- 12) Thybaud, V, JT MacGregor, L Müller, R Crebelli, K Dearfield, G Douglas, PB Farmer, E Gocke, M Hayashi, DP Lovell, WK Lutz, D Marzin, M Moore, T Nohmi, DH Phillips, J Van Benthemo (2011), Strategies in case of positive in vivo results in genotoxicity testing, Mutat. Res., 723, 121-128.

- 13) Hayashi, M, K Dearfield, P Kasper, D Lovell, H-J Martus and V Thybaud (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutat. Res.*, 723, 87-90.
- 14) Honma, M and M Hayashi (2011), Comparison of in vitro micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p-53-deficient human lymphoblastoid cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, 52, 373-384.
- 15) Makenyan, O. G., P. I. Petkov, S.V. Kotov, S. Stoeva, V. B. Kamenska, S. D. Dimitrov, M. Honma, M. Hayashi, R. Benigni, E. M. Donner and G. Patlewicz (2011), 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.* (in press)
- 16) Hayashi, M., Y. Sakuratani (2011), Development of an Evaluation of Evaluation Support System for Estimating Repeated-Dose Toxicity of Chemicals Based on Chemical, *New Horizons in Predictive Toxicology*. Wilson, A.G.E., Royal Society of Chemistry: Chap.3.
- 17) Hayashi, M., Y. Sakuratani (2011), Report of the Workshop on Using Mechanistic Information in Forming Chemical Categories: Annex 8 , OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.138
- 18) Hartung, T., B.J. Blaauboer, S. Bosgra, E. Carney, J. Coenen, R.B. Conolly, E. Corsini, S. Green, E.M. Faustman, A. Gaspari, M. Hayashi, A.W. Hayes, J.G. Hengstler, L.E. Knudsen, T.B. Knudsen, J.M. McKim, W. Pfaller and E.L. Roggen (2011), An Expert Consortium Review of the EC-commissioned Report “Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects-2010”- a t4 Report, Galley Proofs, ALTEX. 28, 3/11
- 19) Hayashi, M. (2011), A challenge to the ultimate 3R's, -In silico approach to evaluate chemical safety for human-, ALTEX, 29, special issue (in press)
- 20) Kobayashi, K., Y. Sakuratani, T. Abe, K. Yamazaki, S. Nishikawa, J. Yamada, A. Hirose, E. Kamata and M. Hayashi (2011), Influence of coefficient of variation in determining significant of quantitative value obtained from 28-day repeated-dose toxicity studies in rats, *J. Toxicol. Sci.*, 36(1), 63-71.
- 21) 林 真、櫻谷祐企 (2011) , 化学物質の安全性 –in silico 評価への挑戦、 , 構造活性フォーラム 2011, pp.29-42
2. 学会発表
- 1) Hirata-Koizumi, M., Fujii, S., Furukawa, M., Kawamura, T., Takahashi, M., Matsumoto, M., Kato, H., Ono, A. and Hirose, A. , A combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening study of perfluorododecanoic acid in rats. *Society of Toxicology 51th*

- Annual meeting*, Sun Francisco, USA.2012
- 2) Hirose, A., Ono, A., Hirata-Koizumi, M., Serizawa, H., Sunaga, M., Furukawa, M., Kamata, E. and Nishimura, T. , Repeated dose 28-day oral toxicity studies of single- and multi-walled carbon nanotubes in rats. *The 47th EUROTOX2011*, France, Paris.2011
 - 3) Ono, A., Takahashi, M., Kawamura, T., Kamata, E., Hirata-Koizumi, M. and Hirose, A. , An evaluation of structure-based toxicity classification and TTC approach for assessing safety of existing industrial chemicals with JECDB. *The 47th EUROTOX2011*, France, Paris.2011
 - 4) Hirose, A., Fujii, S., Furukawa, M., Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Yamamoto, M., Usami, M., Ono, A. and Umemura, T. , A combined repeated dose and reproductive/ developmental toxicity screening study of perfluorooctadecanoic acid in rats. *The 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants*, Belgium, Brussels.2011
 - 5) Naya, M., N. Kobayashi, M. Ema, S. Kasamoto, M. Fukumuro, S. Takami, M. Nakajima, M. Hayashi and J. Nakanishi “In vivo genotoxicity study of nanosized titanium dioxide particles using comet assay following intratracheal instillation in rats” *.Society of Toxicology 50th Annual meeting*, San Francisco DC, USA.2012
 - 6) Aoshima, T., Y. Ueda, M. Tsuboi, Y. Ota, M. Makita, M. Nakajima and M. Hayashi “Orally-dosed polyethylene glycol 400 induced gastric mucosal changes in rats” *Society of Toxicology 50th Annual meeting*, San Francisco DC, USA.2012
 - 7) Tateno, C., Y. Ishida, M. Kakuni, M. Fukumuro, J. Tanaka, S. Masumori, M. Nakajima and M. Hayashi “Comet assay and micronucleus test using chimeric mice with humanized liver(PXB MICE)” *Society of Toxicology 50th Annual meeting*, San Francisco DC, USA.2012

SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE

Category Name	Dimethylaniline Category
CAS No.	87-59-2 95-68-1 95-78-3 87-62-7 95-64-7 108-69-0
Chemical Name	2,3- Dimethylaniline 2,4-Dimethylaniline 2,5-Dimethylaniline 2,6-Dimethylaniline 3,4-Dimethylaniline 3,5-Dimethylaniline
Structural Formula	<p>87-59-2 2,3- Dimethylaniline</p> <p>95-68-1 2,4- Dimethylaniline</p> <p>95-78-3 2,5- Dimethylaniline</p> <p>87-62-7 2,6- Dimethylaniline</p> <p>95-64-7 3,4-Dimethylaniline</p>

108-69-0
3,5-Dimethylaniline

SUMMARY CONCLUSIONS OF THE SIAR

Category/analogue rationale

Physical-chemical properties

Human Health

Environment

All category member substances are not expected to undergo hydrolysis in the environment due to the lack of hydrolysable functional groups. A hydrolysis test [OECD TG 111] for 2,6-dimethylaniline showed no hydrolysis at pH4, pH7 and pH9 at 50 °C for 5 days.

In the atmosphere, indirect photo-oxidation for 2,3-dimethylaniline, 2,4-dimethylaniline, 2,5-dimethylaniline, 2,6-dimethylaniline, 3,4-dimethylaniline and 3,5-dimethylaniline by reaction with hydroxyl radicals are predicted to occur with a half-life of 0.053, 0.066, 0.053, 0.066, 0.053 and 0.053 days, respectively.

Ready biodegradation tests [OECD TG 301C or 302C] for 2,3-dimethylaniline, 2,4-dimethylaniline, 2,5-dimethylaniline, 2,6-dimethylaniline, 3,4-dimethylaniline and 3,5-dimethylaniline resulted in 2-3, 0, 1, 0, 7.1 and 3 % biodegradation after 28 days, respectively. All category member substances are not readily biodegradable under aerobic conditions.

A level III fugacity model calculation with equal and continuous distributions to air, water and soil compartments suggests that 2,3-dimethylaniline will distribute mainly to the soil (77.9 %) and water (21.7%) compartments with minor distribution to the sediments compartment (0.24%) and negligible amount in the air compartment (0.07%). If released only to the water compartment, 2,3-dimethylaniline stays in the water compartment (98.9%) with negligible amounts in other compartments. A level III fugacity model calculation with equal and continuous distributions to air, water and soil compartments for other category member substances are shown same distribution as 2,3-dimethylaniline.

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 phase is not expected to be high. A log K_{oc} of 1.8-2.0 was estimated for category member substances based on the log K_{ow} and indicates a low potential for accumulation in soil.

Bioaccumulation potential for 2,3-dimethylaniline, 2,6-dimethylaniline and 3,5-dimethylaniline are predicted to be low based on a BCF value of 7.6, 6.9 and 7.5 estimated with BCFWIN, respectively. 2,4-dimethylaniline, 2,5-dimethylaniline and 3,4-dimethylaniline are not expected to bioaccumulate in the aquatic environment based on a measured bioconcentration factor of 4.1-<10, 1.5-<3.8 and 1.9-<10, respectively.