

OECD SIDS [Dimethylaniline category]

Table 4- 5 Summary of Chronic Toxicity to Aquatic Plants

Test substance (CAS No.)	Species	Method	Result (mg/L)	Reliability	Reference
2,3-Dimethylaniline (87-59-2)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	OECD TG 201 Static	72h NOEC = 4.32 growth rate	1	MOE, Japan, 2004c
2,4-Dimethylaniline (95-68-1)			72h NOEC = 2.0 growth rate		RA
2,5-Dimethylaniline (95-78-3)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Other Guideline; Chemical Substances Control Law, Japan (equivalent to OECD Guideline 201) Static	72h NOEC = 2.0 growth rate	1	MOE, Japan, 2009c
2,6-Dimethylaniline (87-62-7)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	OECD TG 201 Static	72h NOEC = 32 growth rate	1	MOE, Japan, 2003c
3,4-Dimethylaniline (95-64-7)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Other Guideline; Chemical Substances Control Law, Japan (equivalent to OECD Guideline 201) Static	72h NOEC = 2.94 growth rate	1	MOE, Japan, 2005c
3,5-Dimethylaniline (108-69-0)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	OECD TG 201 Static	72h NOEC = 5.8 growth rate	1	EA, Japan, 1998d

RA: Read Across

Toxicity to Microorganisms

No toxicity data on aquatic microorganisms are available.

Conclusion

Acute aquatic toxicity data are available for category member substances except fish and aquatic plants for 2,4-dimethylaniline. Where data were missing for 2,4-dimethylamine, toxicity was estimated by structural homology to other dimethylanilines with known toxicity (Read Across) or by using the Ecological Structure Activity Relationships (ECOSAR) Program in EPIWIN v 4.0. In general, dimethylanilines are more toxic to daphnids than fish and algae. For fish, LC₅₀ values are generally greater than 100 mg/L, but that of 3,5-dimethylaniline are between 17 and 33.9 mg/L. Therefore 3,5-dimethylaniline is more toxic than other category member substances. For daphnids, EC₅₀ values are between 1.09 and 25 mg/L, 3,4-dimethylaniline and 3,5-dimethylaniline are slightly more toxic than other category member substances. For algae, EC₅₀ values are between 8.59 and >100 mg/L, 3,5-dimethylaniline are more toxic than other category member substances.

No chronic toxicity data on fish are available.

Chronic aquatic toxicity data on daphnids and algae are available for category member substances except 2,4-dimethylaniline. Where data were missing for 2,4-dimethylamine, toxicity was estimated by structural homology to other dimethylanilines with known toxicity (Read Across). In general, dimethylanilines are more toxic to daphnids than algae. For daphnids, NOEC values are generally less than 0.1 mg/L except 2,6-dimethylaniline (NOEC=2.23 mg/L), dimethylanilines are very toxic to daphnids with chronic exposure. For algae, NOEC values are generally less than 10 mg/L except 2,6-dimethylaniline (NOEC=32 mg/L), dimethylanilines are toxic to algae with chronic exposure.

4.2 Terrestrial Effects

No data are available on terrestrial organisms.

4.3 Other Environmental Effects

No data are available on other environment effects.

5 REFERENCES

[Ecotoxicity]

- Bringmann, G., and R. Kühn (1977): The Effects of Water Pollutants on *Daphnia magna* (Befunde der Schadwirkung Wassergefährdender Stoffe Gegen *Daphnia magna*). *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* 10(5):161-166. [in German]
- CERI (1977a) Study of bio-degradability of 2,4-dimethylaniline (K-239). (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (1977b) Study of bio-concentration on 2,4-dimethylaniline (K-238). (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (1977c) Study of bio-concentration on 3,4-dimethylaniline (K-239). (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (1981) Study of bio-degradability of 2,4-dimethylaniline (K-238). (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (1989a) Study of bio-degradability of 2,3-dimethylaniline (K-1024). Report number 21024 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (1989b) Study of bio-degradability of 2,5-dimethylaniline (K-1025). Report number 21025 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (1989c) Study of bio-degradability of 3,5-dimethylaniline (K-1026). Report number 21026 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (1990) Study of bio-concentration on 2,5-dimethylaniline (K-1025). Report number 51025 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (2001) Study of bio-degradability of 2,6-dimethylaniline (K-1548). Report number 21548 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- CERI (2003) Measurement of hydrolysis function of 2,6-dimethylaniline (K-1548). Report number 805134 (in Japanese). Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.
- EA (Environmental Agency), Japan (1998a) Final report of Fish (*Oryzias latipes*), Acute Toxicity Test of 3,5-Dimethylaniline, Study No. 7B786G, conducted by Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.
- EA (Environmental Agency), Japan (1998b) Final report of Fish (*Oryzias latipes*), Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study of 3,5-Dimethylaniline, Study No. 7B804G, conducted by Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.
- EA (Environmental Agency), Japan (1998c) Final report of *Daphnia magna*, Acute Immobilisation Test of 3,5-Dimethylaniline, Study No. 7B750G, conducted by Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.
- EA (Environmental Agency), Japan (1998d) Final report of Alga (*Selenastrum capricornutum*), Growth Inhibition Test of 3,5-Dimethylaniline, Study No. 7B732G, conducted by Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.
- EA (Environmental Agency), Japan (1998e) Final report of *Daphnia magna*, Reproduction Test of 3,5-Dimethylaniline, Study No. 7B768G, conducted by Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.

HSDB (2012) Hazard Substances Data Bank. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>

Kühn, R., and M. Pattard (1990): Results of the Harmful Effects of Water Pollutants to Green Algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the Cell Multiplication Inhibition Test. *Water Res.* 24 (1):31-38.

Kühn, R., M. Pattard, K.D. Pernak, and A. Winter (1989a): Results of the Harmful Effects of Selected Water Pollutants (Anilines, Phenols, Aliphatic Compounds) to *Daphnia magna*. *Water Res.* 23(4):495-499.

Kühn, R., M. Pattard, K.D. Pernak, and A. Winter (1989b): Results of the Harmful Effects of Water Pollutants to *Daphnia magna* in the 21 Day Reproduction Test. *Water Res.* 23(4):501-510.

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 (Ministry of the Environment), Japan (2003a) Final report of Fish (*Oryzias latipes*), Acute Toxicity Test of 2,6-Dimethylaniline, Study No. 2002-22, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2003b) Final report of *Daphnia magna*, Acute Immobilisation Test of 2,6-Dimethylaniline, Study No. 2002-20, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2003c) Final report of Alga (*Selenastrum capricornutum*), Growth Inhibition Test of 2,6-Dimethylaniline, Study No. 2002-19, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2003d) Final report of *Daphnia magna*, Reproduction Test of 2,6-Dimethylaniline, Study No. 2002-21, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2004a) Final report of Fish (*Oryzias latipes*), Acute Toxicity Test of 2,3-Dimethylaniline, Study No. 15044, conducted by Japan Food Research Laboratories.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2004b) Final report of *Daphnia magna*, Acute Immobilisation Test of 2,3-Dimethylaniline, Study No. 15042, conducted by Japan Food Research Laboratories.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2004c) Final report of Alga (*Selenastrum capricornutum*), Growth Inhibition Test of 2,3-Dimethylaniline, Study No. 15041, conducted by Japan Food Research Laboratories.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2005a) Final report of Fish (*Oryzias latipes*), Acute Toxicity Test of 3,4-Dimethylaniline, Study No. 2004-83, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2005b) Final report of *Daphnia magna*, Acute Immobilisation Test of 3,4-Dimethylaniline, Study No. 2004-81, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2005c) Final report of Alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), Growth Inhibition Test of 3,4-Dimethylaniline, Study No. 2004-80, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2005d) Final report of *Daphnia magna*, Reproduction Test of 3,4-Dimethylaniline, Study No. 2004-82, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2009a) Final report of Fish (*Oryzias latipes*), Acute Toxicity Test of 2,5-Dimethylaniline, Study No. 2007-74, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2009b) Final report of *Daphnia magna*, Acute Immobilisation Test of 2,5-Dimethylaniline, Study No. 2007-72, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2009c) Final report of Alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), Growth Inhibition Test of 2,5-Dimethylaniline, Study No. 2007-71, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2009d) Final report of *Daphnia magna*, Reproduction Test of 2,5-Dimethylaniline, Study No. 2007-73, conducted by KUREHA SPECIAL LABORATORY CO.,LTD.

MOE (Ministry of the Environment), Japan (2012) Report on Environmental Survey and Monitoring of Chemicals. <http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/index.html>

NITE (2012), National Institute of Technology and Evaluation. Chemical Risk Information Platform, <http://www.safe.nite.go.jp/english/db.html>, 2012.

Tonogai, Y., S. Ogawa, Y. Ito, and M. Iwaida (1982) Actual Survey on TLm (Median Tolerance Limit) Values of Environmental Pollutants, Especially on Amines, Nitriles, Aromatic Nitrogen Compounds and Artificial Dyes. *J.Toxicol.Sci.*, 7(3), 193-203.

Tonogai, Y., S. Ogawa, Y. Ito, and M. Iwaida (1983) Studies of the Syncopic Effect of Aniline Derivatives on Fish. I. The Problem Concerning the Determination of Median Lethal Concentration. *J.Hyg.Chem./Eisei Kagaku*, 29(5), 280-285.

USEPA (2008a) AOPWIN programme. version 1.92a. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., USA.

USEPA (2008b) EPISUITE programme. version 4.00. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., USA.

USEPA (2008c) BCFBAF programme. version 3.00. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., USA.

USEPA (2009) BIOWIN programme. version 4.10. United States Environmental Protection Agency. Washington D.C., USA.

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）

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 スイロイ ホセ (株)富士通九州システムエンジニアリング

要旨

本研究では、これまでにスクリーニング毒性評価のうち、特に反復投与毒性試験結果をもとに、化学構造から *in vivo* 毒性を推定評価する手法の信頼性について検討を進めてきた。本年度は、腎毒性について判別分析型の ADMEworks を用い、昨年度の肝毒性モデルの構築と同様に構造記述子に加え化合物の特徴部分構造を組み合わせた評価モデルを構築して予測精度及び実用性について検討を行った。また、これまでの研究では定性的モデルのみの検討を進めてきたが、反復毒性の毒性評価においては、惹起される毒性の種類のみではなく毒性の強さ（無毒性量）が評価指標として重要であることから、本年度は、定性的モデルの検討に併せて定量的モデルについての検討も併せて行った。その結果、定量モデルの構築では、学習母集団について 3 種類の分類法により線形重回帰モデルを作成したが、どのモデルでも外部検証の結果は、最大で予測精度 50%程度であり実用的な結果を得ることは出来なかった。一方、定性モデルにおいては、外部検証における特異度 75%を得ることに成功したものの感度は 50%程度（予測精度は 65%）であった。予測精度が低い原因として、学習母集団における腎毒性陽性データが少ないことが一因と考えられた。毒性強度の判定に関しては、昨年度の検討に引き続き、Cramer の毒性分類モデルについて既存点検試験結果をもとに毒性分類規則の拡張の検討を行い、毒性の強いクラスと弱いクラスに分類された化合物の動物試験における無毒性量の平均値の比は、2.97 倍から 5.98 倍に拡大し分離精度向上に成功した。これまでの結果から、反復毒性に関しては毒性の種類を判定する定性的モデルと、毒性の強さを判定する（半）定量的モデルを組み合わせることで実用的な毒性推定が可能となると考察された。

研究目的

本研究では、反復投与毒性に関して有用性が期待される幾つかの手法によるモデル

構築を実施して、手法間の比較を行うとともに複数の手法の組み合わせによる信頼性向上について検討を進めてきた。昨年度ま

での検討においては、in vivo 反復投与による肝毒性に関して、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、また腎毒性について DEREK による毒性アラートの抽出を進めてきた。さらに、肝毒性評価モデルに関しては、3種の予測手法のうち最大で70%を超える一致率のモデルの構築に成功した ADMEworks を用いて、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。そこで、本年度は、同様に ADMEworks を用いて腎毒性について評価モデルの構築を実施した。また、昨年度までの肝毒性モデルの構築においては、肝毒性の発現する投与量に関わりなく、毒性試験における肝毒性所見の有無を指標とした2値モデルのみの構築を実施してきたが、本年度は、腎毒性について肝毒性と同様に2値モデルの構築に併せて、腎毒性発現用量を定量的に評価するための定量化モデルの構築を実施して、それぞれ得られたモデルについて安全性評価における適用について検証した。一方、in vivo 毒性の(半)定量的評価に関しては、毒性の種類によらず化合物の毒性の強さを3クラスに分類する手法として OECD QSAR toolbox に登録されている Cramer の毒性分類モデルについて、昨年度の検討に引き続き、既存点検試験結果をもとに毒性分類規則の拡張による精度向上の検討を行った。

研究方法

1. ADMEworks による腎毒性評価モデルの構築

1.1 データの整理

モデル作成には、昨年度、肝毒性モデル作成用に使用した構造式データを使用した。腎毒性情報については、新たに毒性試験結果の検索を行い、腎臓に重量変化もしくは病理変化が認められた各化合物の最低投与量(LOAEL)をデータベース化して用いた。モデル作成のためには、腎毒性に関する LOAEL 値について幾つかの基準により解析対象母集団を作成して解析対象とした。

1.2 定性的モデルの構築

定性的モデルの構築においては、全化合物構造を解析対象として、構造式を腎毒性 NOAEL 値をもとに以下の2クラスに分類してモデル作成を実施した。

陽性(pos):LOAEL 1000 未満の実験結果(log 対数<3)

陰性(neg):LOAEL 1000 以上の実験結果(log 対数>=3)

すなわち、毒性の比較的強い化合物を評価可能なモデルを構築する目的のため、腎毒性が最大投与量の1000mk/kgでのみ認められた化合物については陰性として取り扱い、それ以下の投与量で腎毒性が認められた化合物を陽性と分類した。

ADMEWORKS/ModelBuilder を用いて物理化学的パラメータや部分構造を含む698パラメータを発生した後、新規化合物セットを学習用データとして AdaBoost 及び SVM 手法により判別に有効なパラメータの絞り込みを実施した後、モデル構築を行い、既存化合物セットを外部検証用データとして予測精

度の検証を実施した。

1.3 定量的モデルの構築

定量的モデルの構築においては、腎毒性 NOAEL をもとに 3 種の母集団を作成し、それぞれに対して ADMEWORKS/ModelBuilder を用いて発生した物理化学的パラメータや部分構造を含む 698 パラメータからモデル作成に有効なパラメータの絞り込みを行った後、線形重回帰モデルを作成した。新規化合物セットもしくは既存化合物セットそれぞれを学習用データとする各モデル構築を行い、学習用データとして使用しなかった化合物セットを外部検証用データとして予測精度の検証を実施した。

2. 既存点検試験結果をもとにした Cramer 毒性分類規則の拡張

既存化学物質点検により反復経口投与毒性試験が実施済みの 233 化合物について、毒性試験での無毒性量 (NOEL) 及び構造式を整理し、OECD QSAR Application Toolbox を用いて cramer ルールによる 3 種の毒性クラス (クラス 1 (低毒性)、クラス 2 (分類外)、クラス 3 (高毒性)) 分類を行い、各クラスに分類された化合物の NOEL 値分布をもとにクラス分類の有用性について検討を行った。

次にクラス 1 及び 3 に分類された化合物について、JRC より配布されている Toxtree を用いて cramer 決定樹の所属する枝ごとに化合物のサブグループ化を行い、各サブグループに含まれる化合物の実験 NOEL 値の分布から、分類されたクラスが妥当でない可能性のある化合物が含まれるサブグループについて、新たなルール化候補となる

共通構造の抽出を行い、抽出された候補共通構造を新たに適用して全化合物構造についてクラス 1~3 への分類を実施し、各クラスに分類された化合物の実験 NOEL 値の分布を、元のクラス分類における実験 NOEL 値の分布と比較することによりルール拡張による分類性能の向上について検討した。

研究結果

1. ADMEworks による腎毒性評価モデルの構築

1.1 データの整理

腎毒性 LOAEL 値について下記に示す 3 種類基準による構造式集団を作成した。

T1 : LOAEL 値が 1000 及び腎毒性が認められない化合物のデータを外した母集団

T2 : 腎毒性が認められない化合物のデータのみを外した母集団

T3 : 腎毒性が認められない化合物の LOAEL 値を仮に 10000 として全データを利用した母集団

T1~T3 の各基準で学習もしくは検証に利用可能な構造式の数を表 1 に示した。

母集団	既存化合物 セット	新規化合物 セット
T1	121	361
T2	140	494
T3	248	1260

表 1. モデル作成に利用した学習及び検証母集団の化合物数

1.2 定性的モデルの構築

定性的モデル構築においては、化合物数の多い新規化合物セットを学習母集団としてモデル構築を行い、既存化学物質セットに

より外部検証を行った。それぞれの化合物セットにおける実験データからの陽性・陰性化合物数を表 2 に示した。

	既存化合物 セット	新規化合物 セット
母集団	外部検証用	学習用
陽性	121	357
陰性	127	883
全体	248	1260

表 2. 定性的モデル構築に利用した化合物数

まず始めに AdaBoost 手法による検証を実施したが、内部検証結果(感度=54%)が良くなかったため、Support Vector Machine(SVM) 手法による最適な定性モデルの内部検証及び外部検証を実施した。結果については表 3 に、両モデルの内部検証及び外部検証結果の詳細は表 4 と表 5 に示す。また両モデルに利用したパラメータ (32 件) について表 6 に示した。

モデル名	Class_SVM-71	Class_ADA-52
モデル作成手法名	Support Vector Machine	AdaBoost
サンプル数 (個)	1240	1240
パラメータ数 (個)	32	32
外部検証化合物数 (個)	248	248
内部検証結果 (%)	予測精度=93 特異度=98 感度=83	予測精度=82 特異度=93 感度=54
外部検証結果 (%)	予測精度=61 特異度=71 感度=51	予測精度=65 特異度=75 感度=54
総評	△	×

表 3. 定性モデルの内部検証及び外部検証結果

内部検証詳細	陽性(POS)	陰性(NEG)	合計
陽性(POS)	296	61	357
陰性(NEG)	20	863	883
合計	316	924	1240
外部検証詳細	陽性(POS)	陰性(NEG)	合計
陽性(POS)	62	59	121
陰性(NEG)	37	90	127
合計	99	149	248

表 4. SVM 手法によるモデルの検証結果の詳細

内部検証詳細	陽性(POS)	陰性(NEG)	合計
陽性(POS)	193	164	357
陰性(NEG)	59	824	883
合計	252	988	1240
外部検証詳細	陽性(POS)	陰性(NEG)	合計
陽性(POS)	65	56	121
陰性(NEG)	95	32	127
合計	160	88	248

表 5. AdaBoost 手法によるモデルの検証結果の詳細

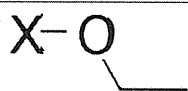

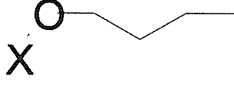

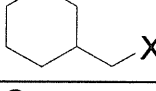




Descriptor name	Description
SYMM2	Geometrical symmetry
AVERAGE	Average energy resulting from All group energies
MOG_MHOMO	MOG: Highest occupied molecular orbital energy
MOG_MLUMO	MOG: Lowest unoccupied molecular orbital energy
MOG_PCHGNC	MOG: Most negative partial charge on C atom
MOG_PCHGPC	MOG: Most positive partial charge on C atom
MOG_PCHGMO	MOG: Mean partial charge on O atom
CTert	Tertiary carbon count
CSP3	sp3 carbon count
NS	No. of Sulfur atoms
MOYX	Second/first moment of inertia
GEOMWL	Mass weighted Length/Width
FLXAFW	Fractional mass of flexible atoms
MDEC14	Molecular distance edge between al primary quat C
MDEC24	Molecular distance edge between al sec quat C
MDEO22	Molecular distance edge between al sec sec O
WIEN	Wiener number
MCB	Balaban's topological index J
SaaaC	Sum of (aaaC) E-states
MATS4m	Moran autocorrelation - lag 4 / weighted by atomic masses
MATS1v	Moran autocorrelation - lag 1 / weighted by atomic van der Waals volumes
MATS1p	Moran autocorrelation - lag 1 / weighted by atomic polarizabilities
GATS6v	Geary autocorrelation - lag 6 / weighted by atomic van der Waals volumes
SC (SC.5.kidney2011SH-V77.amb.1)	
SC (SC.8.kidney2011SH-V77.amb.1-LX)	
SC (SC.11.kidney2011SH-V77.amb.1)	
SC (SC.18.kidney2011SH-V77.amb.1-LX)	
SC (SC.21.kidney2011SH-V77.amb.1)	
SC (SC.22.kidney2011SH-V77.amb.1)	
SC (SC.27.kidney2011SH-V77.amb.1)	
SC (SC.32.kidney2011SH-V77.amb.1)	
SC (SC.33.kidney2011SH-V77.amb.1)	

表 6. 定性モデル (Class_SVM_71 と Class_ADA_52) に利用したパラメーター一覧

1.3 定量的モデルの構築

1.3.1 パラメータの生成

ADMEWORKS/ModelBuilder を用いて、表 7 に示す合計 698 件のパラメータを発生した。

1.3.2 特徴抽出・サンプル抽出

表 1 に示す 3 種の各母集団 (T1~T3) に対し、表 8 のとおり ModelBuilder によるパラメータの絞込みを行い、有効なパラメータをモデル作成に利用した。また、パラメータの絞込みを行う前に、表 2 の発生した 698 件のパラメータについて、欠損値の多

い化合物 (欠損値 > 70%) を母集団から除外した。

1.3.3 定量モデル作成および検証

3 種の母集団 (T1~T3) に対し、表 9 に示す最適な線形重回帰モデルを作成した。しかし、外部検証においては、どのモデルでも満足する結果 (目標値: 外部検証精度 > 70%) を得られなかった (表 9 を参照)。また、学習母集団と検証母集団を入れ替えた場合でも、満足する外部検証の結果を得られなかった (表 10 を参照)。

パラメータ種類	件数
1) 部分構造	114
2) トポロジカル、電子的、物理化学的 (MBの標準提供)	555
3) 分子起動法によるパラメータ: MOG (MBのオプション)	29
合計	698

表 7. 発生したパラメータ件数

順番	手法	絞込み指標
1	欠損値 (MV)	1つでも欠損値のあるパラメータを除外した
2	ゼロ値 (ZT)	90%以上の値がゼロになっているパラメータを除外した
3	単相関 (CM)	90%以上の相関がある2つのパラメータ、その一つを除外した
4	多重相関 (AC)	99%以上の多重相関を示したパラメータを除外した
5	最適化 (PSO)	100%出現頻度のあるパラメータを抽出した

表 8. パラメータの絞込み手順

モデル名	logRD_MLR_1	logRD_MLR_2	logRD_MLR_3
学習母集団名	T1	T2	T3
サンプル数(個)	121	140	247
パラメータ数(個)	32	38	48
サンプル数/パラメータ数(倍率)	3.78125	3.68421	5.14583
内部検証(%)	75.0424	73.5433	54.1873
外部検証(%)	50.5194	50.3003	31.3684

表 9. 既存化合物を学習母集団にした定量モデル

モデル名	logRD_MLR.SHINKI-1	logRD_MLR.SHINKI-2	logRD_MLR.SHINKI-3
学習母集団名	T1	T2	T3
サンプル数(個)	360	489	1240
パラメータ数(個)	89	90	90
サンプル数/パラメータ数(倍率)	4.04494	5.43333	13.7778
内部検証(%)	32.2462	37.1085	23.4378
外部検証(%)	-40.305	-48.884	0.35

表 10. 新規化合物を学習母集団にした定量モデル

2. 既存点検試験結果をもとにした Cramer 毒性分類規則の拡張

解析のために整理した 233 化合物の反復投与毒性試験は、28 日間反復投与試験 (OECD TG407 相当) による 124 試験 (化合物) ものと反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (OECD TG422 相当) による 109 試験 (化合物) が含まれたことから、まず始めに試験法ごとの NOEL 値分布について比較した結果を表 11 に示した。両試験法では、用いる動物週齢や投与期間等に違いがあるが、NOEL 値分布は、ほぼ同じであることから、両試験法により得られた試験結

果について区分せず以降の解析に用いることの妥当性が示された。

Experimental type	OECD TG407	OECD TG422
Number of chemicals	124	109
Geometric mean	40.41	33.04
Geometric standard deviation	5.61	6.31
Median	30.00	30.00
5 %tile	4.00	2.00
95 %tile	1000.00	1000.00

表 11. 28 日間反復毒性試験と反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験による NOEL 分布

次に 233 化合物の構造式を cramer ルールに基づいて 3 種の毒性クラス (クラス 1 (低毒性)、クラス 2 (分類外)、クラス 3 (高毒性)) に分類した。その結果、約 69% の化合物がクラス 3 に 30% の化合物がクラス 1 に分類され、クラス 2 に分類された化合物は、3 化合物のみであった。クラス 2 は、所属化合物数が少ないため以降の解析対象とはしなかった。

クラス 1, 3 に分類された化合物の NOEL 値分布の比較を表 12 及び図 1 に示す。下側 5 パーセント値でクラス 1 : 8.75 に対してクラス 3 : 1.25 と約 7 倍の差があることからある程度の有用性が示唆されたものの、クラス 1 に分類されたものの NOEL の低い化合物やクラス 3 にも NOEL の高い化合物が相当数含まれることから、分類結果の利用の難しさが示された。

Cramer Toxicity class	Low (Class I)	Intermediate (Class II)	High (Class III)
Number of chemicals	69	3	161
Geometric mean	78.98	35.57	26.52
Geometric standard deviation	5.35	4.46	5.67
Median	100.00	15.00	30.00
5 %tile	8.75	15.00	1.25
95 %tile	1000.00	154.36	1000.00

表 12. Cramer 分類による既存 233 化学物質の NOEL 値の分布

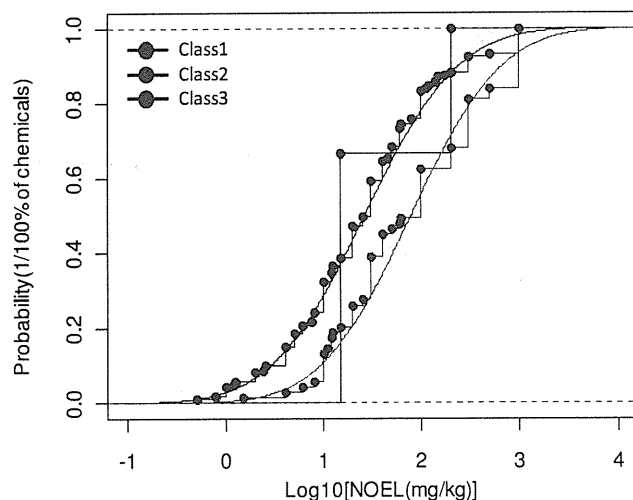


図 1. Cramer 分類による既存 233 化学物質の NOEL 値の累積分布図

当初解析に用いた OECD QSAR Application Toolbox では、3 クラスへの分類のみしか行えないことから、JRC より配布されている Toxtree ソフトウェアを用いて、各クラスに分類された化合物について分類基準となっている構造サブクラスへの細分類を行い、各サブクラスの化合物について NOEL 値の分布を解析した結果を図 2 に示す。クラス 3 は 18 サブクラスに、クラ

ス 1 は 9 サブクラスに分類された。サブクラスのうち 2 つのクラス 1 サブクラスに比較的 NOEL 値の低い化合物が含まれており、他方、2 つのクラス 3 サブクラスには比較的 NOEL 値の高い化合物が含まれていた。そこで、分類規則の拡張による分類精度の向上について検討するため、これらのサブクラス化合物について詳細な構造解析を行った。

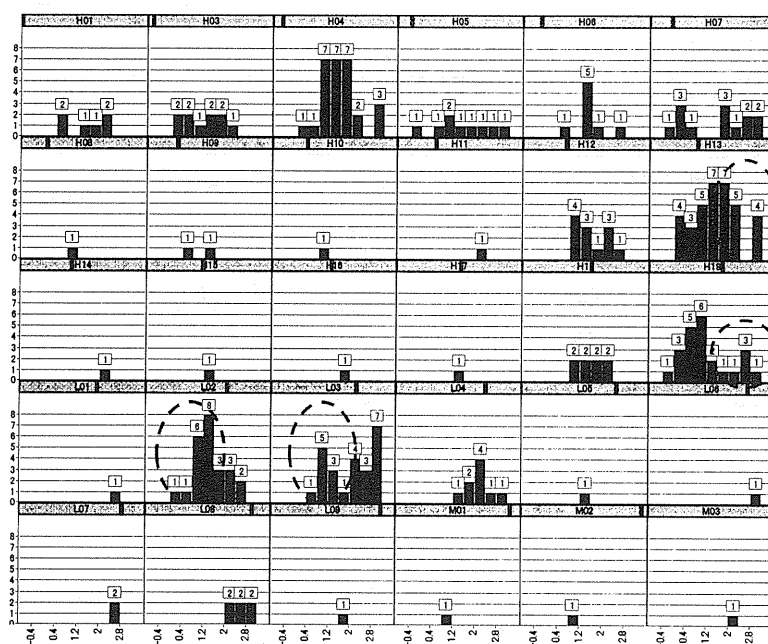


図 2. Cramer 分類サブクラスに分類された化学物質の NOEL 値のヒストグラム

赤破線：クラス 1 サブクラスの NOEL 値の低い化合物

緑破線：クラス 3 サブクラスの NOEL 値の高い化合物

クラス 1 サブクラス L02 には、ベンゼン環 1 つに比較的単純な置換基が置換した構造が含まれており、そのうち NOEL 値が低い化合物はいずれもフェノール化合物であった(図 3)。クラス 3 化合物を解析した結果、フェノールそのものやメチルフェノールなどについてはクラス 3 に分類されるものの、

C2 以上のアルキルフェノールについては、現在の分類規則ではクラス 1 に分類されていることが明らかになった。また、クラス 1 サブクラス L03 には、環状構造を含まない化合物に反応性の置換基が結合した構造が含まれていた。これらのうち、-SH 基を含む化合物、分子中に N 原子を含む化合物

及び枝分かれ構造に-OH基を含む構造は、いずれもNOEL値が低いことが明らかとなった(図4)。これらの化合物はいずれも比

較的低いNOEL値が示されていることからクラス3分類されるよう分類規則を拡張することが妥当であると考えられた。

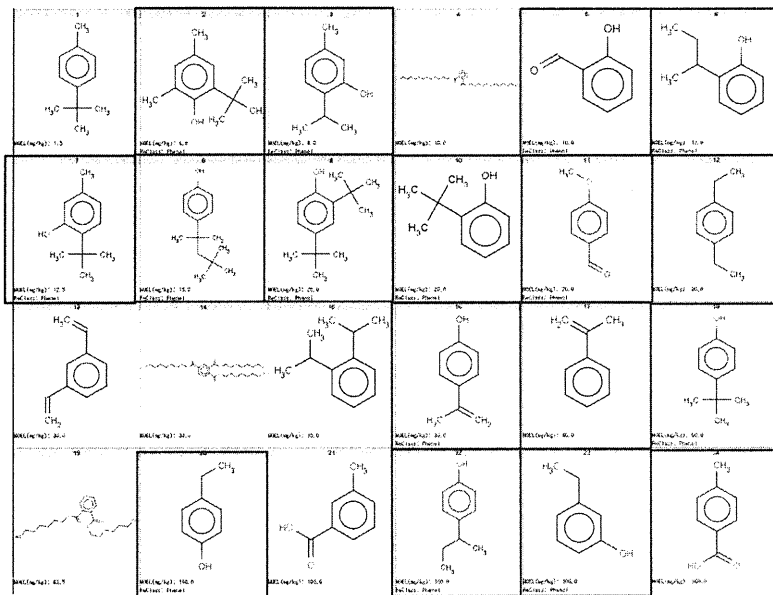


図3. L02 サブクラスの化合物

赤枠は、NOEL 値の低いフェノール化合物を示す

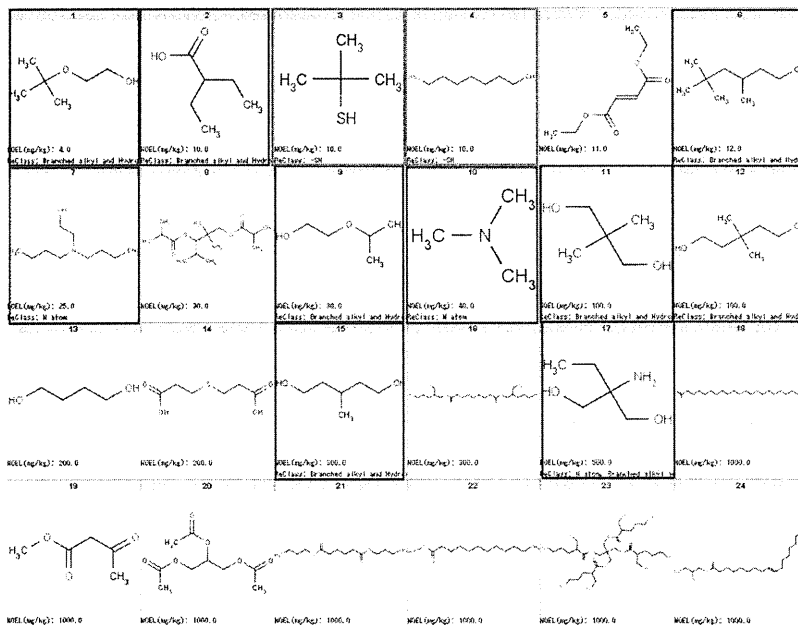


図4. L03 サブクラスの化合物

NOEL 値が低い-SH基を含む化合物(緑枠)、分子中にN原子を含む化合物(青枠)及び枝分かれ構造に-OH基を含む構造(赤枠)

一方、クラス 3 サブクラスのうち比較的高い NOEL 値の化合物にはあまり共通の構造が認められなかったものの、ベンゼンスルホン酸構造を部分構造として含む 3 化合物が含まれていた (図 5)。ベンゼンスルホン酸構造を有する化合物の多くはクラス 1 に分類されていたが (図 6)、これら 3 化合物

はアミノ機やニトロ基など反応性の置換基を有するためクラス 3 に分類されていたが、NOEL 値はクラス 1 に分類されていた化合物と同程度であることからベンゼンスルホン酸部分構造を含む化合物については、その他の置換基によらずクラス 1 に分類出来る可能性が示唆された。

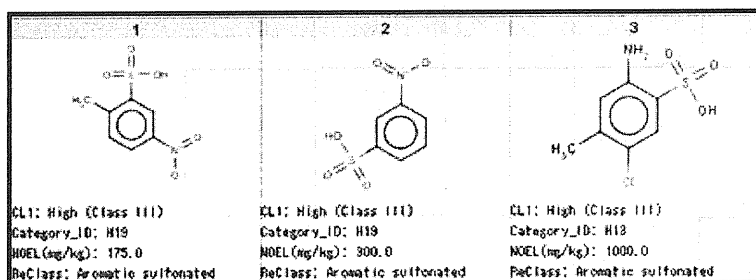


図 5. クラス 3 に分類されたベンゼンスルホン酸構造を部分構造として含む 3 化合物いずれも NOEL 値は、比較的高い

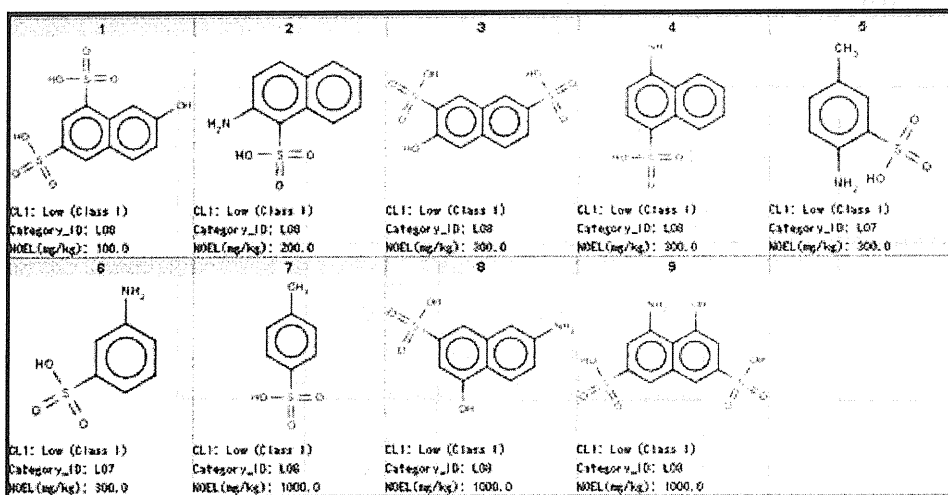


図 6. クラス 1 に分類されたベンゼンスルホン酸化合物

上述の構造ルールを追加して再度クラス分類を実施した結果を表 13 及び図 7 に示した。構造ルールの拡張により、クラス 1, 3 の下側 5 パーセント値の比は、7 倍から 5.9 倍にかえて低減してしまったものの、累

積分布曲線の分離の改善が認められ、また各クラスの NOEL 値の平均値の比は、2.97 倍から 5.98 倍に拡大した。

また、解析の過程で図 8 に示したように非常に類似した構造でありながら動物試験で

報告されているNOEL値が大きく異なる化合物が含まれていることが明らかとなり、化合物構造からの毒性の強さの分類精度が必ずしも良く無いことの原因の一つと考えられた。

Updated Toxicity class	Low (Class I)	Intermediate (Class II)	High (Class III)
Number of chemicals	43	3	187
Geometric mean	157.64	35.57	26.38
Geometric standard deviation	5.04	4.46	5.23
Median	199.53	15.00	25.12
5 %tile	11.64	15.00	1.99
95 %tile	1000.00	154.36	812.83

表 13. 分類ルール拡張による既存 233 化学物質の再分類による NOEL 値の分布

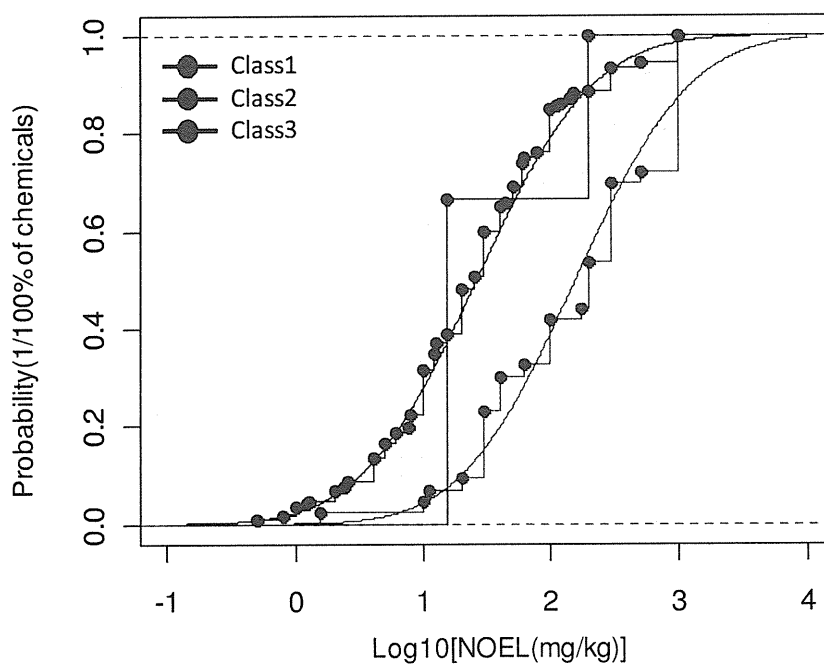


図 7. 分類ルール拡張による既存 233 化学物質の再分類による NOEL 値の累積分布図

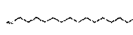


ChemID	Structure	CAS Formula Mol Weight Cramer Class	Experimental NOEL(mg/kg)	Observed toxicity
66		CAS: 544763 C16H34 MW: 226.44 Low (Class I)	40.00	RBC ↓ PT, GPT ↑ Kidney weight ↑
67		CAS: 629629 C15H32 MW: 212.41 Low (Class I)	100.00	No toxic change were observed up to 1000mg/kg
108		CAS: 1120214 C11H24 MW: 156.31 Low (Class I)	100.00	Salivation Kidney:eosinophi lic bodies Liver, Thymus weight ↑

図 8. 類似構造でありながら実験 NOEL 値が大きく異なる化合物

考察

本研究では、これまでにスクリーニング毒性評価のうち、特に反復投与毒性試験結果をもとに、化学構造から *in vivo* 毒性を推定評価する手法の信頼性について検討を進めてきた。昨年度までに肝毒性については、構造記述子に加え化合物の特徴部分構造を組み合わせた評価モデルを構築することにより外部検証において全体の一致率 76.8% のモデル構築に成功した。そこで本年度は、*in vivo* 反復投与試験において肝毒性に次いで頻度の高い腎毒性について、昨年度の肝毒性モデルの構築と同様に判別分析型の ADMEworks を用い構造記述子に加え化合物の特徴部分構造を組み合わせた評価モデルを構築して予測精度及び実用性について検討を行った。腎毒性について本研究では、以前に rapid phenotype アラートの構築を行い、学習セットにおいては一致率 79% を得たものの外部検証での一致率は約 60% に留まり、特に感度は 30% に満たなかった。

本年度の研究におけるモデル構築では、部分構造と構造記述子を組み合わせることにより最終的に学習セットにおける一致率 93% のモデルを得た。しかし、外部検証による一致率は 61% の留まり、感度は 51% と以前より向上したものの、昨年度構築した肝毒性モデルに比べ予測精度は低かった。原因として、モデル構築や外部検証に使用できる化合物数をなるべく増やすため、様々な種類の腎毒性の種類を分けること無く一括してモデル構築を行ったことが挙げられる。しかし、肝毒性に関しても壊死や肥大等、毒性の種類を問わずモデル構築を行ってきたことを考えると腎毒性のほうが、毒性の種類特異的な構造が存在する可能性を示唆する結果とも考えられる。今後は病理所見や生化学的検査等の指標をもとに毒性の種類を細分化しての検討も必要と考えられた。反復毒性の毒性評価においては、惹起される毒性の種類のみではなく毒性の強さ（無毒性量）が評価指標として重要で

あることから、本年度は、腎毒性について定性的評価を行うモデルのみではなく定量的な評価を行うモデル構築についても検討を行った。その結果、定量モデルの構築では、学習母集団について3種類の分類法により線形重回帰モデルを作成したが、どのモデルでも外部検証の結果は、最大で予測精度50%程度であり実用的な結果を得ることは出来なかった。腎毒性に関しては、定性的モデル構築においてもあまり精度のよい予測モデルが得られなかったことから、毒性の種類や化学構造の種類ごとに検討をする必要があると考察されるが、その場合、陽性化合物数が少ないことが解析のネックとなると考えられる。

一方、毒性の強さの定量的評価の手法として毒性の種類を全く考慮せず、化学構造から推定される毒性の強さをクラス分けするcramerルールについて、昨年度の検討で有用性が示唆されたことから、本年度は、詳細な構造解析によるルール拡張による精度向上について検討を実施し、各クラスのNOELの5パーセントイル値の比は低下してしまっただものの、累積分布曲線の分離の改善が認められ、また各クラスのNOEL値の平均値の比は、2.97倍から5.98倍に拡大し、ルール拡張による精度向上の可能性が示唆された。しかし、依然として毒性の強い化合物であっても低毒性クラス(クラス1)に分類される構造もあることから、分類結果の判断に関しては注意が必要である。一方、今回解析に用いたデータには、類似構造でありながら実験によるNOEL値の大きく異なる化合物群が含まれていた。毒性試験そのものはガイドラインに従って実施されているものの、試験実施施設や媒体等

が異なることによる実験間差や用いた検体の不純物による可能性もあるが、だとすればそうしたデータを基にした予測モデルそのものの信頼性について注意が必要である。一方、実験データが信頼出来ると考えるならば、構造のみから毒性を評価する限界を示している可能性もある。反復投与毒性試験は、費用も期間もかかることから評価モデル構築に使用出来るデータには限界があるためこれまで本研究では、適用可能な化学構造の範囲をなるべく広げる目的で、構造の細分化や毒性の種類を細分化を行わずに評価モデルの構築を進めてきたため、これまでに構築されたモデルの予測精度は多少犠牲となっていると考えられる。今後は、化学構造や毒性の種類を絞り込むことで適用範囲は限定されるが、精度の高い予測モデルを構築し、これまでに構築したモデルと組み合わせて評価することにより、in silico毒性推定の信頼性を向上し、実際のリスク評価に適用可能な評価スキームを構築可能であると考察される。

結論

これまで本研究では、構築された評価モデルの適用範囲をなるべく広げるため化学構造の細分化や毒性の種類を細分化を行わない評価モデルの検討を進めてきたが、in vivoでの毒性発現は多様なメカニズムによるため、今後は化学構造や毒性の種類を絞り込むことで適用範囲は限定されるが、精度の高い予測モデルを構築し、これまでに構築したモデルと組み合わせて利用することでin silicoデータからのエキスパートジャッジメントにおける、有用な手段と成り得るであろう。