

201133002B

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)

およびカテゴリーアプローチの実用化に関する研究

(H21-化学-一般-002)

平成 21～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 本間正充

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

平成 21～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 本間正充

平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添3)	
化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)および カテゴリーアプローチの実用化に関する研究	1
本間 正充	
II. 分担研究報告書 (別添4)	
遺伝毒性の予測に関する研究	17
本間 正充、宮島 敦子、森田 健	
反復投与毒性及び遺伝毒性を指標にした構造活性相関手法構築及び 安全性評価における利用に関する研究	39
広瀬 明彦、林 真、江馬 眞	
構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究	103
小野 敦	
類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究	111
吉田 緑	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5)	121
IV. 研究成果の刊行物・別冊	123

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合総括研究報告書（平成 21 年度～平成 23 年度）

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

研究代表者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

本研究では、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)やカテゴリーアプローチの化学物質行政における利用の実用化に向けた研究を進めた。遺伝毒性に関しては、染色体異常試験での非生理的高濃度における毒性学的に妥当性の低い偽陽性について科学的調査を行い、2mM 程度までの低減化で、Sensitivity、Specificity ともエームス試験と同程度まで維持できると判断された。また、最高用量の低減化により QSAR モデルの Specificity の改善が観察された。一方、ブルガス大学が開発した Tissue Metabolic Simulator (TIMES) により、さらなる Sensitivity の向上が見られ、有用性が確認されたが、Specificity が低いためさらに検証が必要である。in vivo 遺伝毒性評価のため、in vitro 試験および in vivo 齧歯類の遺伝毒性作用に関する分類ワークフローを開発し、その正当性を評価するために、既存試験データを収集して検証した。反復毒性については、標的臓器毒性(脾臓、骨髄、甲状腺毒性、副腎、精巣、および、心臓毒性)について、既存化学物質安全性点検データ及び関連する文献情報をもとに Rapid Prototype アラートの構築に成功した。肝毒性、腎毒性については、偽陰性判定される化合物から特徴部分構造を抽出して計算記述子の組み合わせによるモデルの再構築を行うことで予測精度向上が可能であることが示された。また、in vivo 毒性の強さを分類する、Cramer の毒性分類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による精度向上に成功した。毒性類似性の評価のため、既存化学物質及び新規化学物質のラット反復投与毒性試験において報告された病理組織学的所見を基に、臓器ごとのシソーラスを構築し、毒性の類似性について検討を行った。カテゴリーアプローチの検討として、アミノフェノール類及びジメチルアニリン構造異性体について情報収集を行い、カテゴリーアプローチを適用した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。ヒト健康影響分野における構造活性相関やカテゴリーアプローチの利用に関しては、各国ともまだ検討段階であり、今後とも国際協調のもとでの研究推進、情報交換が重要である。

研究分担者

林 真

: (財)食品農薬品安全性評価センター センター長

吉田 緑

: 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

江馬 眞

: (独)産業技術総合研究所 安全科学研究部門 招聘研究員

宮島 敦子

: 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長

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

森田 健

: 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部 室長

小野 敦

: 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

## A. 研究目的

我が国では、昭和 48 年の化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）制定以降に新たに流通した化学物質については事前審査が実施されてきており、ヒト健康影響に関しては、製造輸入業者は 3 種のスクリーニング毒性試験（AMES 試験、染色体異常試験および動物を用いた 28 日間反復投与試験）結果の提出が義務付けられ、それに基づく安全性評価結果をもとにした規制が行われてきている。しかし、化審法制定以前から市場に存在する化学物質（既存化学物質）については、国自ら必要な試験を実施して安全性評価を行い必要に応じて同法による規制措置を講じることとされているが、我が国では数万種の既存化学物質が流通しており、スクリーニング毒性試験の実施には費用も期間もかかることから、これまでに安全性評価が終了した化学物質はごく一部であり、ほとんどの既存化学物質については十分な安全性評価が実施されないまま使用されている。既存化学物質の多くは、世界中で流通していることから、OECD ではいずれかの加盟国で生産量が多く、安全性情報が少ない既存化学物質の安全性点検を加盟各国で分担して行う高生産量化学物質安全性点検計画（HPV プログラム）を 1993 年より開始したが、現在までに評価が終了した化学物質は約 400 物質程度に留まる。化学物質の安全性評価を従来の毒性試験によって行うためには、多額の費用と期間がかかるため、たとえ国際協力の下で実施したとしても数万種の既存化学物質について十分な評価を行うことは不可能であり、より効率的な方法が求められている。そうした状況下であって、我が国の化審法においても平成 21 年改正にあたり既存化学物質も含めた全ての化学物質の包括的管理制度が導入され、化学物質のスクリーニング評価に要する費用・期間の効率化や国際的な動物試験削減の要請にかんがみ、定量的構造活性相関の活用等を含む動物試験の代替法の開発・活用を促進することが求め

られている。カテゴリーアプローチや SAR 手法を組み合わせた、効率的かつ信頼性の高い安全性評価スキームが実用化されれば、全ての化合物について多額の費用と時間がかかる安全性試験を行わなくても、安全性について有る程度の予測的評価を行うことが可能となり、さらに、安全性試験を実施すべき物質を選定して試験実施することで効率的な安全性評価が可能となる。

本研究では、先立つ研究における成果をもとにカテゴリーアプローチや(定量的)構造活性相関((Q)SAR)の安全性評価における利用の実用化に向けて、構築済みの数種の (Q) SAR 評価モデルの改良や予測適用範囲の拡充、カテゴリーアプローチの安全性評価への適用による利用法・有用性の検証を行い、最終的に得られた成果をもとにこれらの手法を化学物質評価に適用するためのガイダンス案を提案することを目的とした研究を進めた。

## B. 研究方法

### 最高濃度の低減化に伴う染色体異常試験陰性化合物の陽性妥当性評価：

化審法既存化学物質および英国ラーサ社のデータベースを基にカーランドが報告した *in vitro* CA データの陽性妥当性の再評価を行った。国内既存 249 化学物質に関しては、1 mM の最高濃度では *in vitro* 遺伝毒性試験バッテリーで不検出となる物質について、その CA 陽性妥当性を検証し、最適最高濃度を求めた。英国ラーサ社のデータベース 488 化合物については、陽性を示す最低濃度、試験条件を確認し、最小有効濃度を分類した。また、2006 年～2009 年までに本邦で実施された化審法既存化学物質の *in vitro* CA データに関して、10mM から 1mM に低減化した場合の 3 種類の QSAR モデル (DEREK、MCASE、AWORKS) の予測率を再計算した。

### Tissue Metabolic Simulator (TIMES) による染色体異常誘発性の予測に関する研究：

ブルガス大学のメケニアン博士らにより開発された組織代謝シミュレータ (tissue metabolic simulator : TIMES) と染色体異常を引き起こす相互作用メカニズムモデルの併用により、代謝的に活性化によって誘発された染色体異常誘発性の予測性について、化学物質を代謝活性化の有無別に識別したトレーニング用セットを用いて検証を行った。染色体異常試験データとして、1994年から2006年までに我が国でOECDガイドラインに従い、GLP管理の下に *in vitro* 染色体異常試験が行われた249化合物を評価に用いた。

#### In vitro 遺伝毒性と in vivo 遺伝毒性の関係の評価 : in vivo 肝遺伝毒性と in vivo 骨髄小核形成の代謝を含む機序的 QSAR モデルの構築に関する研究 :

本研究では *in vitro* 試験および *in vivo* 齧歯類の遺伝毒性作用に関する分類ワークフローを開発し、その正当性を評価するために、既存試験データを収集し、そのデータを検証した。ワークフローに当てはまらない化合物については *in vitro*-*in vivo*「ギャップ」があると判断し、そのメカニズムを考察し、*in vivo* 遺伝毒性予測(Q)SAR モデル開発にむけた評価モデルに反映させた。

#### ヒト健康影響エンドポイントの被覆率向上のための新規アラートおよび Rapid Prototype アラートの開発に関する研究 :

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 Derek for Windows(DfW)を用いて、DfWによる毒性予測に与するアラート、例証化合物および Reasoning rule について、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遺伝毒性予測精度の向上や反復毒性における標的臓器毒性アラートの構築を実施した。

#### アミノフェノール類及びジメチルアニリン構

#### 造異性体安全性評価におけるテゴリーアプローチ適用の検討 :

アミノフェノール、ジメチルアニリンの構造異性体における物理化学的性状、環境運命及び環境毒性に関し、文献調査を行いデータギャップの部分については構造活性相関手法を用いて補完し、カテゴリーアプローチの適用が妥当であると判断された場合、得られた結果を基に、SIAP、SIAR 及び IUCLID Dossier を作成した。

#### 3 種の構造活性相関毒性評価システムによる肝毒性評価アラート及び予測モデルの構築 :

化審法で実施された28日間試験成績と化学物質構造情報をもとに、3種類のQSARモデル(DEREK、MCASE、ADMEWorks)を用いて肝毒性について毒性アラートもしくは予測モデルを構築して予測精度について検証した。DEREKによる毒性アラートの構築は、Lhasa社と共同により化合物構造クラスタリング、視覚的解析、DEREKの既存アラートとの比較により行った。ADMEWorks、MultiCASEでは、物質を学習セットと検証セットに分割しモデル構築を行い検証セットを用いて予測精度の検証を行った。

#### 特徴部分構造と構造記述子の組合せによる予測モデルの信頼性向上に関する検討 :

化審法で実施された28日間試験成績における肝毒性・腎毒性のLOAEL値をもとに、構造記述子と特徴部分構造を組み合わせによる、定性的評価を行う判別分析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、腎毒性については定量的評価を行うための重相関回帰モデルを構築して、同様に予測精度及び実用性について検討を行った。

#### 毒性強度のクラス分類手法の検証及び構造規則の追加による拡張 :

OECD QSAR Toolbox にプロファイラーとして搭載されている *in vivo* 反復投与毒性の強さ(無毒性量 : NOAEL) の分類を行う Cramer の毒性分類を用いて既存点検試験実施済み化

化合物の分類を実施して有用性について検証を行うとともに、得られた分類結果が妥当でない化学物質の共通構造から分類規則の拡張を行った。

#### 化学物質安全性評価における構造活性相関利用の海外動向：

OECD QSAR Toolbox 管理会議及び OECD 化学物質カテゴリー構築のためのメカニズム情報利用ワークショップ等において、米国 EPA 及び欧州加盟各国代表と各国における化学物質安全性評価における構造活性相関の実用化について情報交換を行った。

#### 反復投与毒性試験病理組織学的所見シソーラスの構築：

既存化学物質 234 試験、新規化学物質(1989 年~2003 年)776 試験のラットを用いた短期反復投与毒性試験で認められた、投与に関連した病理組織学的所見を抜粋してシソーラスを構築し、毒性評価の類似性について検討を行った。

### C. 研究結果

#### 最高濃度の低減化に伴う染色体異常試験陰性化合物の陽性妥当性評価：

国内既存化学物質データベース(ECJ)、英国ラーサ社のデータベース(CGX)から染色体異常試験結果を再調査した結果、1mMに最高用量を低減化した場合、遺伝毒性に懸念がある物質、もしくは発がん性物質の多くを見逃してしまう可能性が指摘された。解析の結果、2mMあるいは1mg/mLのいずれか高い方の適用が最も効果的な検出性を示し、249物質に適用すると陽性率は46.6%(116/249)から37.8%(94/249)に減少し、低減化の有効性が示された。最高濃度の低減化に伴うDEREK、Multicase、AdomeWorksそれぞれによる染色体異常試験モデルの予測率について検討を行った結果、感受性もしくは一致率の向上が認められ、高濃度でのみで陽性反応を示す化合物に基づく不確定なアラートの削除等により予測精度向上が可能であることが明らかとな

った。

#### Tissue Metabolic Simulator (TIMES) による染色体異常誘発性の予測に関する研究：

代謝活性化を伴わないモデルの性能は、感度77%、及び特異度82%であった。一方、代謝シミュレータと組み合わせたモデルに関しては、感度は75%であったが、特異度は56%程度であった。我が国でOECDガイドラインに従い、GLP管理の下にin vitro染色体異常試験が行われた249化合物のうち1mM以上のみで陽性を示すものの、陰性とすべき合理性が認められなかった17化合物についてDEREK、TIMESによって染色体異常誘発性に関係するQSARアラートの検索を行った結果、DEREKでは3化合物、TIMESでは10化合物(代謝中間体を含む)でアラートが検出され、いくつかの化合物に関しては、さらなる検証が必要と考えられた。

#### In vitro 遺伝毒性と in vivo 遺伝毒性の関係の評価：in vivo 肝遺伝毒性と in vivo 骨髄小核形成の代謝を含む機序的 QSAR モデルの構築に関する研究：

in vivo 小核試験データセットを用いて、in vitro 染色体異常予測アラートについて検討した結果、in vivo 染色体異常をカバーするのに適した7種のin vitro染色体異常予測アラートが特定された。さらに文献情報の調査等により、6種のin vivo染色体異常アラートが構築された。生体内での代謝および生物学的利用率を考慮したin vivo遺伝毒性予測モデルを、ブルガス大学と共同開発した。トレーニングセットでのin vivo小核試験の予測率は感度:74%、特異度:75%であった。またin vivo肝臓での遺伝毒性(コメントもしくはUDS)の予測率は感度:70%、特異度:57%であった。

#### ヒト健康影響エンドポイントの被覆率向上のための新規アラートおよび Rapid Prototype アラートの開発に関する研究：

in vitro 染色体異常誘発性に関しては、7化合物クラスの解析により、新たに2つのアラート

と5つの Rapid Prototype アラートの構築に成功した。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、新たに in vivo 染色体異常予測に有効なアラート構築に成功した。反復投与毒性については、標的臓器毒性(脾臓、骨髄、甲状腺毒性、副腎、精巣、および、心臓毒性)について、既存化学物質安全性点検データ及び関連する文献情報をもとに各毒性についての Rapid Prototype アラートの構築に成功し、反復毒性評価における被覆率が向上した。アミノフェノール類及びジメチルアニリン構造異性体安全性評価におけるテゴリーアプローチ適用の検討：

アミノフェノール異性体群の物理化学的性状をカテゴリー評価することに関しては、p-異性体の分配係数値に注意をすべきであるが、他に特に大きな問題は予想されなかった。一方、環境有害性に関しては3種の異性体間で大きな相違があり、毒性推定のためには生体膜透過性の指標である Pow 値をパラメータに用いることは適当ではない事が予想された。ジメチルアニリンの構造異性体 6 物質における物理化学的性状、環境運命及び環境毒性に関し、文献調査を行うとともに、必要に応じて構造活性相関手法を用いて推定を行った結果、これら 6 異性体をカテゴリーとして評価することの妥当性が示され、検討結果をもとに経済協力開発機構の高生産量既存化学物質点検プログラムにおける SIAP、SIAR 及び IUCLID Dossier を作成した。

### 3 種の構造活性相関毒性評価システムによる肝毒性評価アラート及び予測モデルの構築：

DEREK では、新たに 34 個の新規肝毒性 Rapid Prototype アラートの構築に成功した。新規アラートの追加により、学習セットに対する予測精度は、感度が 23% から 61% に上昇し、一致率も 61% から 80% に上昇したが、独立した外

部データセットによる検証の結果は、感度 31%、一致率 58% であった。ADMEworks では、肝毒性予測に有効な 40 パラメータを選定した後、モデル構築を行った結果、学習セットでは 80% 以上の予測精度が得られたが、検証セットに対する予測では、最も精度のよかった ADA モデルで、一死率 70.3% であった。MultiCASE では、陰性陽性の判定基準数パターンについてモデル構築を試みたが、一致率は最大で 62% で、感度は 70% 程度であった。

### 特徴部分構造と構造記述子の組合せによる予測モデルの信頼性向上に関する検討：

構造記述子による判別分析型の ADMEworks モデルについて、化合物部分構造を加味した改良の結果、肝毒性予測モデルについては、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。

腎毒性評価モデルの構築においては、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。一方、定量モデルでは、構築したモデルは最大で予測精度 50% 程度であり実用的な結果を得ることは出来なかった。

### 毒性強度のクラス分類手法の検証及び構造規則の追加による拡張：

OECD QSAR ツールボックスのプロファイラーとして搭載されている 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ことが示された。Cramer の毒性分類モデルの拡張においては、既存化学物質について分類されたクラスが毒性試験結果に対して妥当ではない物質が多く含まれるサブクラスに分類された化学物質における共通構造の解析により、構造ルールの拡張を行い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。

### 化学物質安全性評価における構造活性相関利用の海外動向：

OECD では、毒性データベースと各種の予測

ツールを統合した OECD QSAR ツールボックスの開発を進めており、*in vivo* 反復毒性に関しては、毒性メカニズムごとに構造推定を行う AOP 型のアラートやモデルの整備を進めることによる毒性評価の検討が進められている。しかし、特にヒト健康影響分野における *in silico* 手法の利用は、各国とも未だ検討段階である。

#### 反復投与毒性試験病理組織学的所見シソーラスの構築：

投与に関連して発現した病理組織学的所見は、既存化学物質では 493 所見、新規化学物質では 1622 所見(平成 22 年度)、1364 所見(平成 23 年度)であった。これらを 12 の臓器系(全身を含むと 13 系統)に分け、さらにこれらを類似病変ごとに既存化学物質では 184、新規化学物質では 392(平成 22 年度)および 714(平成 23 年度)のシソーラスに分類することができた。投与による病理組織学的所見が最も観察された臓器系は消化器系であり、泌尿器がこれに続いた。臓器としては、肝臓および腎臓の所見が多く、胃・脾臓と続いた。投与による所見が多かった臓器およびその種類は、既存化学物質および新規化学物質ともほぼ同様であった。肝臓・腎臓についてはこれらの臓器が代謝排泄の主要臓器であること、胃については投与物質が刺激性を有することを反映している結果と考えられた。

#### D. 考察

本研究では、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)やカテゴリーアプローチの化学物質行政における利用の実用化に向け、ヒト健康影響評価で求められる変異原性及び反復投与毒性に関する毒性アラートや構造活性相関評価モデルの構築・改良や適用範囲の拡充、反復投与毒性分類に向けた病理組織学的所見シソーラスの構築、カテゴリーアプローチの安全性評価への適用による利用法・有用性の検証に関して研究を行った。

既存化学物質データの解析から、染色体異常予測に対する新規アラート及び Rapid Prototype アラートの構築に成功したが、外部データセットに対する感度は、15%と低く、テストデータセット化合物内のケミカルスペースの被覆率の不足が示唆された。アラートタイプの評価においては、新しい化合物について、常にトレーニングデータセットによりカバーされる構造であるかどうかを考慮する必要があると考察された。染色体異常試験の最高濃度を 1 mM に低減化することにより、QSAR の予測率が向上し、1mM 以上で陽性を示す化学物質のほとんどは、遺伝毒性の実質上の懸念はないものと判断されたことから最高濃度低減化の妥当性が支持された。最適な最高濃度に関して医薬品では 1 mM が提案されているが、本研究における解析では、2 mM あるいは 1 mg/mL のいずれか高い方の適用が最も効果的な検出性を示した。医薬品と比べ一般化学物質の分子量は一般的に低く、1 mM 上限では低分子物質は十分な濃度での処理ができない可能性が考えられた。代謝活性化による染色体異常の予測性に関してブルガス大学が開発した Tissue Metabolic Simulator (TIMES) は代謝物の染色体異常誘発性まで検出可能であり、さらなる Sensitivity の向上が見られその有用性が確認されたが、Specificity が低いためさらなる検証が必要である。*in vivo* 変異原性の予測に関して、DEREK の *in vivo* 小核試験に対する予測率は低く、アラートの開発による精度向上が必要であるとともに単にアラートから遺伝毒性を予測するような単純なモデルではなく、代謝や生物学的利用率等を考慮したメカニズムベースのモデルの構築が必要であると考察された。一方、種々の化学物質の *in vitro* 変異原性 (S9 使用 AMES、CA、MLA)、*in vivo* 肝遺伝毒性 (UDS、Comet、TGR) ならびに *in vivo* 骨髄遺伝毒性 (MNT) のデータの大規模解析から、現在の *in vitro* 試験の陰性結果は必ずしも *in vivo* 遺伝毒性の欠如を示す十分な

証拠として利用することはできないことが明らかとなった。遺伝毒性評価の *in silico* ワークフローの開発では、DNA および蛋白質との反応性を有する親化合物または代謝物は、標的臓器での代謝に基づき利用可能性の差により、*in vitro*/*in vivo* 差が生じる可能性についてさらなる検討が必要であると考えられた。

反復投与毒性における標的臓器毒性の *in silico* 評価のための構造アラート構築では、対象とする各毒性の陽性化合物が限られていることから文献情報も含めることでケミカルスペースの拡張に成功し、これまでに肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、および甲状腺毒性に対するアラート構築を行った。構築された多くの反復投与毒性に対する **Rapid Prototype** アラート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造は、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。反復投与肝毒性予測に関しては、これまでの検討で得られたモデルの予測精度はあまり高くはないものの、最大で 70% 以上の一致率を示すモデルが得られ、さらに、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毒性判定への寄与が高い部分構造を構造記述子と組み合わせてモデルの再構築を行うことで、一致率 76.8% と若干ではあるが精度向上が得られた。腎毒性に関しても、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、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。また、定量モデルの構築では、実用的な精度のモデルを構築することは出来なかった。病理学的変化の種類やメカニズム、化学構造分類ごとにモデル構築することでより精度の高い予測が可能になると考察されるが、その一方で本研究の結果から分子の物理化学的特性値である構造記述子と毒

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毒性の種類や構造を細分類しなくても、ある程度の予測が可能であることが示された。毒性の分類に関しては、毒性試験で報告されている病理組織学的所見シソーラス構築における解析の結果、理組織学的用語の統一が、臓器により種々であり、特に精巣、腎臓、骨髄、精巣上体ではさまざまな病理組織学的所見が用語として使用されていた。よって、毒性試験報告からの毒性分類を行うためには用語の統一が重要な課題である。

カテゴリーアプローチの検証において、アミノフェノール異性体群の物理化学的性状をカテゴリー評価することに関し、特に大きな問題は予想されなかったが、環境有害性に関しては、毒性推定ためには生体膜透過性の指標である Pow 値をパラメータに用いることは適当ではない事が予想された。アミノフェノール類の環境有害性試験結果は通常物質に較べて試験手順による試験結果の変動が大きいという特徴があり、また用いた生物種、成長段階によって異なる毒性傾向がみられており、種によるターゲット部位が異なるための違いであるのか、代謝酵素系の有無による差なのか、今後、検討が必要である。ジメチルアニリン類の構造異性体 6 種を対象として環境運命及び環境毒性に関する情報収集を行いカテゴリー評価の妥当性が認められたことから、結果をもとに OECD 提出文章の作成を行った。今後は、ヒト健康影響についてもカテゴリー評価の検討を行い、SIAM 会議において評価結果の妥当性や信頼性について議論することにより本手法の信頼性および効果的な適用について検討を進める。

OECD 加盟各国における構造活性相関やカテゴリーアプローチの利用状況について情報収集を行った結果、カテゴリーアプローチに関しては、OECD SIAM 等で実際の評価に一部利用されつつあるが、構造活性相関の利用は、物理化学的性状や環境有害性において限定的

ではあるが利用されているものの、本研究班で検討しているヒト健康影響分野での利用は、各国とも検討段階であり、特に *in vivo* 毒性に関しては、現時点では利用可能な手法がないとの認識であった。これに対し OECD では、反復投与毒性に関しては、毒性予測のための AOP (毒性パスウェイ) の構築・整備について活発な議論がされており、引き続き情報収集及び検討の必要があると考察される。

## E. 結論

本研究では、ヒト健康影響の *in silico* 評価のための手法について検討を行った。*in silico* 評価を行うためには、これまでに得られている毒性試験結果をもとに化学構造からの評価モデル (スキーム) を構築する必要がある。本研究で検討した *in vitro* 染色体異常試験における、非生理的高濃度における毒性学的に妥当性の低い偽陽性反応や遺伝毒性評価における *in vitro* 評価結果と *in vivo* 評価結果に差がある多くの化学物質の存在は、信頼性の高い *in silico* モデルを構築するためには、より多くのデータを収集するとともに、用いる試験結果の毒性学的な信頼性についての再評価が重要であることを示している。このことは、反復投与毒性試験についても同様である。

本研究では毒性の種類やメカニズム、化合物の構造を細分化することなくモデル構築を進めてきたが、更なる信頼性の向上に向けては、毒性や構造を細分化しての検討が必要と考えられる。しかし、特に反復投与毒性においては、利用可能な毒性試験データが限られていることにより、複雑で多様な個々の毒性について十分な数の陽性化合物が得られない可能性がある。すなわち、今後は化学物質ヒト健康影響評価における *in silico* 手法の実用化に向けて、評価対象とするそれぞれの毒性 (試験) について、なるべく多くの信頼性の高い試験結果を収集するとともに、試験結果の再評価により信頼性が確認された情報をもとにしたモデル構築を

進めるとともに、試験結果からのみでは予測が難しい毒性メカニズムや生体内代謝情報について、文献情報や AOP なども含めて検討することで、限られた範囲ではあっても信頼性の高い *in silico* 評価スキームの構築が必要であろう。

一方で本研究の結果は、毒性の種類や構造を細分類しなくても、ある程度の予測が可能であることを示しており、特異性の少ない毒性については、毒性の細分類を行わずに評価を行うほうが効率的であるとも考えられる。すなわち、今後は AOP のような特定の毒性や構造に特化した信頼性の高い評価が可能なモデルの構築を進めるとともに、本研究で構築した適用範囲の広いモデルと組み合わせて利用することで *in silico* データを WoE とした安全性評価を段階的に実用化することが重要である。

現時点では、ヒト健康影響分野における構造活性相関やカテゴリーアプローチの利用に関しては、各国ともまだ検討段階であり、特に反復投与毒性を始めとする *in vivo* 毒性の予測については、アプローチの仕方も含め議論の余地のあるところであり、今後とも国際協調のもとでの研究推進、情報交換が重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 本間正充 構造活性相関による遺伝毒性の予測 国立医薬品食品研究所報告 128, 39-43 (2010)
- 2) 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.* 25: 277-296, 2012.

- 3) 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)
- 4) 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 400, 165-174 (2011)
- 5) 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.
- 6) Takeshi Morita, James T. MacGregor and Makoto Hayashi: Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, Mutagenesis, 26, 223-230, 2011.
- 7) 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.
- 8) Takeshi Morita and Kaoru Morikawa: Expert Review for GHS Classification of Chemicals on Health Effects, Industrial Health, 49, 559-565, 2011.
- 9) 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.
- 10) Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Dourson ML, Parker A, Sweeney LM, Nishikawa A, Yoshida M, Ono A, Hirose A. "Proposal of new uncertainty factor application to derive tolerable daily intake." Regul Toxicol Pharmacol. 58(2):237-42.(2010)
- 11) 広瀬明彦;レギュラトリーサイエンスにおけるコンピューターを用いた構造活性相関予測研究の現状と展望 国立医薬品食品衛生研究所報告, 128, 27-28 (2010)
- 12) Matsumoto M, Fujii S, Hirose A. and Ema M. (2010) Prenatal developmental toxicity of gavage or feeding doses of 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol in rats. Reprod Toxicol, 29, 292-297.
- 13) 江馬 眞、小林憲弘、納屋聖人、花井荘輔、中西準子 (2010) 二酸化チタンの発がん性評価、環境毒性学会誌、13, 15-26.
- 14) Ema M, Kobayashi N, Naya M, Hanai S. and Nakanishi J. (2010) Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. Reprod Toxicol, 30, 343-352.
- 15) Kobayashi N, Naya M, Ema M, Endoh S, Maru J, Mizuno K, Nakanishi J. (2010) Biological response and morphological assessment of individually dispersed multi-wall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats. Toxicology, 276, 143-153.
- 16) 高橋美加、松本真理子、宮地繁樹、菅野誠一郎、菅谷芳雄、平田睦子、鎌田栄一、江馬 眞、広瀬明彦 (2010)、OECD 化学物質対策の動向 (第 16 報) - 第 27

- 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2008 年オタワ)、化学生物総合管理学会誌, 6, 180-188.
- 17) 江馬 眞、納屋聖人、吉田喜久雄、永翁龍一 (2010) 次世代の冷媒の候補とされている 2,3,3,3-Tetrafluoroprop-1-ene (HFO-1234yf) の毒性評価、環境毒性学会誌、13 (2), 73-84.
  - 18) 江馬 眞、小林憲弘、納屋聖人、花井莊輔、中西準子 (2010) 種々の暴露経路による二酸化チタンの体内分布及び毒性、環境毒性学会誌、13 (2), 85-103.
  - 19) Matsumoto M, Hirose A, Ema M. (2011) Developmental toxicity of nitrophenolic herbicide dinoseb, 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol. *Herbicides and Environment*, Edited by Kortekamp A, InTech, ISBN 978-953-307-476-4  
<http://www.intechopen.com/articles/show/title/developmental-toxicity-of-nitrophenolic-herbicide-dinoseb-2-sec-butyl-4-6-dinitrophenol>
  - 20) 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)
  - 21) 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)
  - 22) 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)
  - 23) 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)
  - 24) 小林克己, 櫻谷祐企, 阿部武丸, 西川智, 山田隼, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 林 真 ; ラットを用いた短期反復投与毒性試験の低用量群に統計学的有意差が検出される割合 *Pharma Stage*, 9(10),49-52,(2010)
  - 25) 小林克己, 櫻谷祐企, 阿部武丸, 西川智, 山田隼, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 林 真 ; 毒性試験から得られる定量値に対する有効数値の桁数の差違および Mann-Whitney の U 検定と Wilcoxon の検定の有意差検出の違い *Pharma Stage*, 10(3),45-48,(2010)
  - 26) K. Kobayashi, Y. Sakuratani, T. Abe, S. Nishikawa, J. Yamada, A. Hirose, E. Kamata and M. Hayashi ;Relation between statistics and treatment-related changes obtained from toxicity studies in rats: if detected a significant difference in low or middle dose for quantitative values, this change is considered as incidental change? *J. Toxicol. Sci.*, 35,79-85,(2010)
  - 27) Heddle JA, Fenech M, Hayashi M, Macgregor JT (2011), Reflections on the development of micronucleus assays, *Mutagenesis*, 26(1), 3-10.
  - 28) Morita, T., JT MacGregor and M. Hayashi (2011), Micronucleus assays in redent tissues other than bone marrow, *Mutagenesis*, 26(1), 223-230.
  - 29) 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.
- 30) Bolognesi, C and M Hayashi (2011), Micronucleus assay in aquatic animals, *Mutagenesis*, 26(1), 205-213.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 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)
- 40) 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.
- 41) 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
- 42) 小野 敦 ; in vivo 反復投与毒性の構造活性相関による予測評価の展望 国立医薬品食品衛生研究所報告, 128, 44-49 (2010)
- 43) Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Fujimoto H, Shibutani M, Hirose M, Nishikawa A. Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of

- madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay. *Cancer Sci.*100:2261-2267, 2009
- 44) Takahashi M, Yoshida M, Inoue K, Morikawa T, Nishikawa A. A ninety-day toxicity study of semicarbazide hydrochloride in Wistar Hannover GALAS rats. *Food Chem Toxicol.* 47(10):2490-8, 2009
- 45) Yoshida M, Sanbuissyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A. Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *J Toxicol Sci.* 34:Suppl 1 SP189-972009.
- 46) Yoshida M, Watanabe G, Suzuki T, Inoue K, Takahashi M, Maekawa A, Taya K, Nishikawa A. Long-term treatment with bromocriptine inhibits endometrial adenocarcinoma development in rats. *J Reprod Dev.*;55(2):105-9, 2009.
- 47) Takahashi M, Inoue K, Yoshida M, Morikawa T, Shibutani M, Nishikawa A. Lack of chronic toxicity or carcinogenicity of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats. *Food Chem Toxicol.*; 47(2): 462-71, 2009.
- 48) Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Shibutani M, Takagi H, Hirose M, Nishikawa A. Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study. *Food Chem Toxicol.* 47(1):184-91 2009.
- 49) Sato I, Kawamoto K, Nishikawa Y, Tsuda S, Yoshida M, Yaegashi K, Saito N, Liu W, Jin Y. Neurotoxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in rats and mice after single oral exposure. *J Toxicol Sci.*34(5):569-742009.
- 50) Takahashi M, Yoshida M, Inoue K, Morikawa T, Nishikawa A. Age-related susceptibility to induction of osteochondral and vascular lesions by semicarbazide hydrochloride in rats. *Toxicol Pathol.* 38:598-605,2010
- 51) Yahia D, El-Nasser MA, Abedel-Latif M, Tsukuba C, Yoshida M, Sato I, Tsuda S. Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure to pregnant mice on reproduction. *J Toxicol Sci.* 35:527-33, 2010.
- 52) Kawanoto K, Sato I, Yoshida M, Tsuda S. Air purifiers that diffuse reactive oxygen species potentially cause DNA damage in the lung. *J Toxicol Sci.*35:929-933, 2010.
- 53) Kawanoto K, Sato I, Tsuda S, Yoshida M, Yaegashi K, Saito N, Liu W, Jin Y. Ultrasonic-induced tonic convulsion in rats after subchronic exposure to perfluorooctane sulfate (PFOS). *J Toxicol Sci.*36:55-62, 2011.
- 54) Takahashi M, Inoue K, Koyama N, Yoshida M, Irie K, Morikawa T, Shibutani M, Honma M, Nishikawa A. Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity. *Arch Toxicol.*,In press. 2011.
- 55) Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A. The newly formed corpora lutea of normal cycling rats exhibit drastic changes in steroidogenic and luteolytic gene expressions. *Exp. Toxicol. Pathol.*, In press, 2011.

- 56) Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Nakae D, Nishikawa A. Lack of chronic toxicity and carcinogenicity of dietary administrated catechin mixture in Wistar Hannover GALAS rats. J Toxicol Sci.36: 297-311,2011
2. 学会発表
- 1) Mekenyan, O., Ptkov, P., Todorov, M., Kotov, S., Stoeva, S., Dimitrov, S., Honma, M., Hayashi, M., Benigni, R.; Modeling in vivo micronucleus test by simulating detoxification pathways. QSAR2010、(2010.5)
- 2) 本間 正充 ; 遺伝毒性試験とその科学的リレバンス 第 11 回日本トキシコロジー学会生涯教育講演会 (2010.6)
- 3) 本間 正充 ; リスク評価における in vitro 遺伝毒性試験の役割 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会(2010.6)
- 4) 森田 健、森川 馨 : GHS 分類における専門家判断の適用、第 37 回日本トキシコロジー学会、沖縄、2010.6
- 5) 森田 健、本間正充、福島久美子、森川馨 : In vitro 染色体異常試験における 1 mM の上限濃度は一般化学物質においても許容できるか? 第 39 回日本環境変異原学会、つくば、2010.11
- 6) 森田 健、本間正充、森川 馨 : 一般化学物質における哺乳類培養細胞を用いる遺伝毒性試験の最高濃度、日本薬学会第 131 年会 (2011.03)、静岡
- 7) 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, 42<sup>nd</sup> EMS 2011 Annual Meeting (2011.10), Montreal
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) Ono A, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Matsumoto K, Kawabata M, Yajima K, Matsuyama T, Kamata E, Ema M. (2010) Gender-related differences of the hepatic enzyme activities in relation to the toxicity of benzotriazole ultraviolet absorber in rats. The 12<sup>th</sup> International Congress of Toxicology, July 20-22, Barcelona, Spain
- 11) Naya M, Kobayashi N, Ema M, Nakanishi J. (2010) Pulmonary responses to multi-wall carbon nanotubes after single intratracheal instillation in rats. The 12<sup>th</sup> International Congress of Toxicology, July 20-22, Barcelona, Spain
- 12) Ema M, Naya M, Yoshida K, Nagaosa R. (2010) Developmental toxicity of hydrofluorocarbons used as refrigerants. The 12<sup>th</sup> International Congress of Toxicology, July 20-22, Barcelona, Spain
- 13) Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, Hirose A, Hasegawa R, Imai T, Ogawa K, Ema M, Nishikawa A. (2011) Two-generation reproductive toxicity study of aluminium sulfate administered via drinking water to rats. The 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology. March 6-10, 2011, Washington, DC, USA
- 14) Naya M, Kobayashi N, Endoh S, Mizuno K, Nagaosa R, Ema M, Nakanishi J. (2011) Pulmonary toxicity of crystalline

- silica after a single intratracheal instillation in rats. The 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology. March 6-10, 2011, Washington, DC, USA
- 15) 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*, San Francisco, USA.2012
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) F.Deal, W.Casey, P.Ceger, D.Allen, C.Yang, M.Nakamura, H.Kojima, A.Ono, H.Yoon, S.Han, W.Stokes "International Validation Study of an in vitro Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and Antagonists in MCF - 7 cell" 50th Annual Meeting of Society of Toxicology (Washington DC, USA) 2011.3
- 23) 小野 敦 ”in vitro 内分泌かく乱試験法の OECD ガイドライン受け入れ(パネルディスカッション - In vitro トキシコロジー試験法の行政的な受け入れ) ” 第 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会 (沖縄) 2010.6
- 24) Midori Yoshida, Naoki Koyama, , Kaoru

- Inoue, Miwa Takahashi, Youhei Sakamoto, Yoshikazu Taketa, Yoshiya Shimada, Akiyoshi Nishikawa, Early depletion of ovarian follicles by prepubertal exposure to gamma ray promotes rat uterine cancer development, 第 68 日本癌学会学術総会(横浜)2009年10月
- 25) Midori Yoshida, Atsushi Sanbuissho, Shigeru Hisada, Michihito Takahashi, Yasuo Ohno, Akiyoshi Nishikawa, Collaborative work to evaluate ovarian toxicity by repeated dose and female fertility studies in rats: Morphological characteristics of normal cycling ovary in rats and their viewpoints for ovarian toxicity detection, 49th Annual Meeting & ToxExpo (Baltimore, US)2009年3月
- 26) 吉田緑 生殖発性毒性の評価法: : 現状と問題点, 第 10 回日本トキシコロジー学会生涯教育講習会
- 27) 2009年7月(岩手)
- 28) 吉田緑 通常の反復投与の動物試験による化学物質の雌性生殖器系への影響評価, 第 3 回 In vivo 実験医学シンポジウム(東京)2009年12月
- 29) 吉田緑、武田賢和、島田義也、井上薫、森川朋美、高橋美和、坂本洋平、渡辺元、田谷一善、西川秋佳, 未成熟期の放射線照射による小卵胞の経時的変化, 第 26 回日本毒性病理学会講演要旨集(金沢)2010年2月
- 30) 吉田緑、河部真弓、古川文夫、井上薫、高橋美和、広瀬明彦、西川秋佳; 酸化チタン曝露ラットの肺の経時的変化とチタンの局在., 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集 S128、2010年、

G. 知的所有権の取得状況  
(該当なし)

## Ⅱ. 分担研究報告書