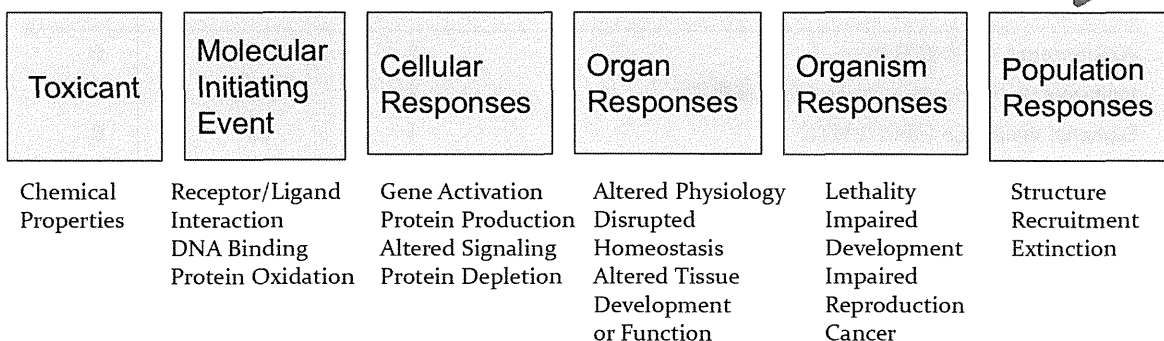


Adverse Outcome Pathway (AOP)



近年OECDでは、毒性発現メカニズムが複雑なエンドポイントについて、AOPに基づいてカテゴリー化を行う手法開発の検討を開始した。AOPとは、毒性発現の原因となる分子レベルのメカニズム(Molecular Initiating Event)から、細胞レベル、生体レベルのメカニズムを経て、最終的な毒性発現に至るまでの経路を示したものの。

本プロジェクトによる反復投与毒性のカテゴリーアプローチ手法開発は、OECDによるAOPに基づくカテゴリーアプローチの手法開発の先駆けとなったものである。

nite *OECD. 2011. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 138, Report of the workshop on using mechanistic information in forming chemical categories.

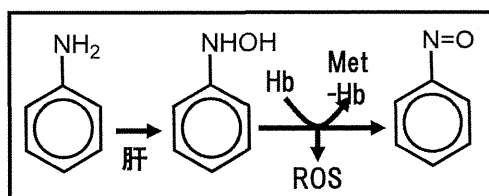
15

反復投与毒性に関するAOPの構築

カテゴリー化の根拠とするため、特定の毒性傾向が知られている物質群(Class Effect)に対し、AOPを構築する。

例：アニリン類の溶血性貧血に対するAOP

分子→細胞→生体レベルの毒性メカニズム
(作用機序DBの情報を基に構築)



ROSによる
赤血球脂質
膜過酸化

関連する
反復投与毒性所見
(毒性・病理専門家の
知見を基に構築)

溶血(脾臓での貪食)

RBC ↓, HGB ↓
HTC ↓,
Reticulo ↑
Met-Hb ↑, T-bil ↑
脾-ヘモジデリン
沈着
髄外造血亢進(代
償作用) 等

nite

Hayashi, M. and Sakuratani, Y. 2011. Hemolytic anemia induced by anilines and nephrotoxicity induced by 4-aminophenols. In: OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 138, Report of the Workshop on Using Mechanistic Information in Forming Chemical Categories: Annex 8.

16

作成したカテゴリー (1)

カテゴリー (影響)	物質数	各影響のLOEL (mg/kg/day)	信頼性ランク
Azobenzenes (溶血性貧血)	2	0.6±5.7	B
Imidazole-2-thione derivatives (甲状腺毒性)	2	5.5±5.8	B
Diphenyl disulfides (溶血性貧血)	1	30	B
Hydrazines (溶血性貧血)	2	20±127	B
Acrylamides (神経毒性)	2	21±111	B
Oximes (溶血性貧血)	3	23±7	B
Aliphatic nitriles (肝毒性)	4	33±46	B
Nitrobenzenes (溶血性貧血)	12	54±82	A
Hydroquinones (肝毒性)	2	55±64	B
p-Aminophenols (腎毒性)	2	63±476	B
Phenyl Phosphates (副腎脂質代謝障害)	4	70±34	C
Anilines (溶血性貧血)	18	72±40	A
4,4'-Methylenedianilines/Benzidines (胆管毒性)	5	75±156	B
Aliphatic/Alicyclic hydrocarbons (α 2u-グロブリン腎症)	6	76±100	C
Aromatic Hydrocarbons (肝毒性)	9	83±51	C
N-Alkyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (溶血性貧血)	2	100	B

nite

17

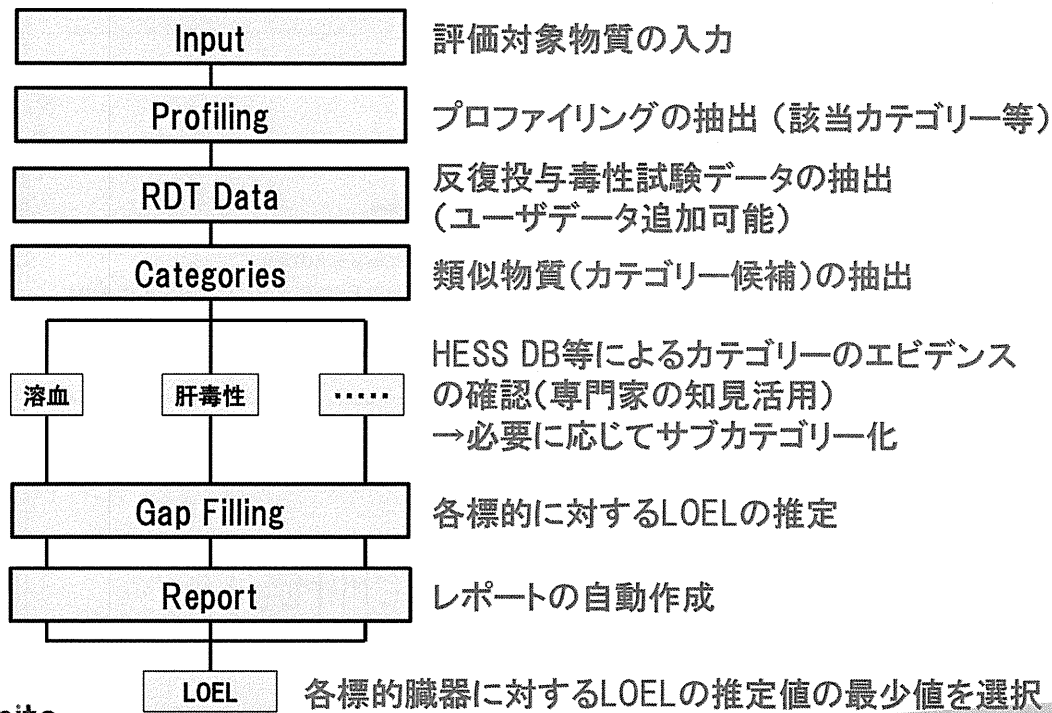
作成したカテゴリー (2)

カテゴリー (影響)	物質数	各影響のLOEL (mg/kg/day)	信頼性ランク
Halobenzenes (腎毒性)	9	101±79	A
Nitrobenzenes (肝毒性)	12	108±96	C
Ethyleneglycol Alkylethers (溶血性貧血)	5	110±192	A
Organophosphates (神経毒性)	7	116±98	A
Anilines (肝毒性)	18	146±70	C
Aliphatic amines (粘膜刺激)	6	148±202	C
Halobenzenes (肝毒性)	9	151±129	A
Benzene or Naphthalene sulfonic acid (Less susceptible)	13	223±355	C
Ethyleneglycol Alkylethers (精巢毒性)	2	231±2077	B
Nitrobenzenes (精巢毒性)	4	237±278	C
p-Alkylphenols (肝毒性)	7	250±381	A
o-/p-Aminophenols (溶血性貧血)	3	254±606	B
Benzain sulfonamide (尿路障害)	2	310±2414	B
Nitrophenols/Halophenols (ミトコンドリア機能障害)	13	314±218	C
Phenols (粘膜刺激性)	25	405±231	C
Halogenated Aliphatic Compounds (肝毒性)	17	533±756	C
Phthalate esters (精巢毒性)	3	886±1466	C

nite

18

HESSによる反復投与毒性のデータギャップ補完のワークフロー(OECD (Q)SAR Toolboxに準拠)



nite

19

反復投与毒性試験データの表示

Structure					
☑ Substance Identity		評価対象物質	類似物質	(ニトロベンゼン溶血性貧血カテゴリー)	
☑ Repeated Dose Toxicity					
☑ LOEL					
☑ Blood Chemical Examination (9/56)			M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 5 mg/kg/day, 20...	M: 192 mg/kg/day, ...
☑ General Signs (6/37)				M: 100 mg/kg/day, ...	M: 385 mg/kg/day, ...
☑ Hematological Examination					
☑ Blood Cell (2/3)			M: 15 mg/kg/day, 5...	M: 60 mg/kg/day	
☑ Blood Cell (Coagulation) (1/3)					
☑ Blood Cell (Erythrocyte)			赤血球数の低下に対するLOEL		
☑ RBC↓ (9/16)			M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day, ...
☑ HGB↓ (10/17)			M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day, ...
☑ HTC↓ (10/17)			M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day, ...
☑ MCV↑ (4/7)			M: 50 mg/kg/day, 1...		M: 769 mg/kg/day, ...
☑ MCH↑ (3/5)			M: 50 mg/kg/day, 1...		M: 769 mg/kg/day, ...
☑ MCHC↓ (4/6)			M: 170 mg/kg/day, ...		M: 769 mg/kg/day, ...
☑ Reticulocyte↑ (10/14)			M: 50 mg/kg/day, 5...	M: 60 mg/kg/day	M: 385 mg/kg/day, ...
☑ Methemoglobin↑ (5/9)				M: 20 mg/kg/day	M: 192 mg/kg/day, ...
☑ Blood Cell (Leukocyte) (5/12)			M: 170 mg/kg/day	M: 25 mg/kg/day, 1...	
☑ Blood Cell (Platelet) (3/4)			M: 170 mg/kg/day		
☑ Histopathological Findings					
☑ Adrenal (2/2)			M: 170 mg/kg/day		
☑ Bone Marrow (3/6)			M: 50 mg/kg/day, 5...	M: 5 mg/kg/day, 20...	

483の項目で表現

カテゴリーレポートの表示

Repeated dose (HESS) (Toxicological) - Profiling Scheme Browser

Advanced

Profile Description

Nitrobenzenes (Hemolytic anemia with methemoglobinemia) Rank A

I. Toxicity Information

The mechanism of hemolytic anemia induced by nitrobenzenes is considered to be the following.

- 1) Nitrobenzenes are metabolized to anilines by intestinal bacterial flora^{1,2}.
- 2) Anilines are metabolized in hepatocytes by oxidases such as P450 to N-hydroxyl anilines.
- 3) N-hydroxyl anilines react with hemoglobin (Hgb) in erythrocytes to produce nitrosoaniline and methemoglobin (Met-Hgb)^{1,2}. As a result, increased concentration of Met-Hgb is observed upon hematological examination in an RDT test.
- 4) Erythrocytes are degenerated (peroxidation of lipid membrane, etc.) by reactive oxygen species (ROS) produced in the above reaction³.
- 5) Phagocytosis of degenerate erythrocytes, mainly in the spleen, results in hemolysis⁴.
- 6) As a result, decrease of red blood cell (RBC), decrease of Hgb, decrease of hematocrit (Hct) and increase of reticulocytes (Ret) are observed upon hematological examination in the RDT test. In addition, pigmentation of hemosiderin and congestion are observed in the spleen upon histopathological examination⁵.
- 7) As a compensatory response of anemia, extramedullary hematopoiesis, mainly in the spleen, is observed upon histopathological examination⁴.

This mechanism of toxicity is common to experimental animals and humans.

nite

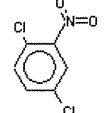
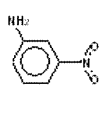
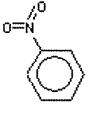
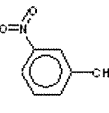
21

詳細情報へのリンク

Filter endpoint tree...	1 (Target)	2	3	4
Structure				
Substance Identity				
Repeated Dose Toxicity				
LOEL	(11/140) Min	M: 15 mg/kg/day	M: 5 mg/kg/day	M: 48.1 mg/kg/day
NOEL	(12/263)	M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 5 mg/kg/day, 5 ...	M: 96.2 mg/kg/day, ...
Profile				
Study No. (Link to SSRDT)		5	499 642	296
Chemical No. (Link to HESS DB)		5	473	286
RDT Report No.		5	477 535	289
CSCL Class		Designated (Type II...	Designated (Type II...	
Rat Liver Metabolism Database	N/A	Root of map No. 6 Metabolite in map ...	Root of map No. 593 Root of map No. 594	Root of map No. 228 Root of map No. 229
Repeated dose (HESS)	Nitrobenzenes (Hem... Nitrobenzenes (Hep...	Anilines (Hemolytic... Anilines (Hepatotox... Nitrobenzenes (He... Nitrobenzenes (Hep...	Nitrobenzenes (He... Nitrobenzenes (Hep... Nitrobenzenes (Tes... Nitrobenzenes (Hep...	Nitrobenzenes (He... Nitrobenzenes (Hep... Nitrobenzenes (Tes... Nitrobenzenes (Hep...

各物質からHESS DB、ToxBay等にリンクし、詳細情報を参照することができる。評価者は、これらの情報を基にデータギャップ補完に用いる類似物質を確定する。

データの確認

Structure				
<input checked="" type="checkbox"/> Substance Identity <input type="checkbox"/> Repeated Dose Toxicity <input type="checkbox"/> LOEL <input checked="" type="checkbox"/> Blood Chemical Examination <input type="checkbox"/> Hematological Examination <input type="checkbox"/> Blood Cell (Erythrocyte) <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> RBC↓ (9/16) <input type="checkbox"/> HGB↓ (10/17) <input type="checkbox"/> HTC↓ (10/17) 	Min (3/4)	M: 15 mg/kg/day	M: 5 mg/kg/day M: 20 mg/kg/day	M: 48.1 mg/kg/day
		M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day,
		M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day,
		M: 15 mg/kg/day, 1...	M: 20 mg/kg/day, 2...	M: 769 mg/kg/day,

Study [HessDB_Search]

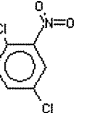
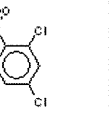
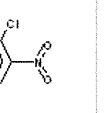
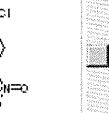
Chem_No. 5 Chemical Data [Cas_No.] 99-09-2 [Name] 3-Nitroaniline

Test Result | Test Method | Measured Data

Test Item: Hematology_Male Actual

DOSE	mg/kg	Admin...														
		0	15	50	170											
Experiment number		5	5	5	5											
		mean	SD	si...	F1	F3	mean	SD	si...	F1	F3	mean	SD	si...	F1	F3
RBC	x10 ⁴ /μl	934	39.2				868	12	**	▽		781	16.8	**	▽	
HCT(PCV)	%	52.5	2.5				48.9	0.8	**	▽		48.2	1.1	**	▽	
HGB	g/dL	15.6	0.23				14.5	0.21	**	▽		14.4	0.31	**	▽	


データギャップ補完(結果)

Structure				
<input type="checkbox"/> LOEL	(11/140) Min	M: 8 mg/kg/day	M: 25 mg/kg/day	M: 20 mg/kg/day

Descriptors | Prediction

Read across prediction of LOEL, taking the average from the nearest 5 neighbours, based on 3 data points from 3 neighbour chemicals, Observed target value: N/A, Predicted target value: 17.7 mg/kg/day

3種類のジクロロニトロベンゼン異性体は、ほぼ同程度の用量で溶血性貧血に関連する所見が認められていることを確認。



Descriptor X: log Kow

Accept prediction

Return to matrix

Select/filter data

- Subcategorize
- Mark chemicals by descriptor value
- Filter points by test conditions
- Mark focused chemical
- Mark focused points
- Remove marked chemicals/points
- Clear existing marks

Selection navigation

- Gap filling approach
- Descriptors/data
- Model/(Q)SAR
- Calculation options
- Visual options
- Information
- Miscellaneous

HESSの公開と運用

当機構のホームページからスタンドアロン版を無料で一般公開した(2012年6月)。

<http://www.safe.nite.go.jp/kasinn/qsar/hess.html>

“NITE HESS”で検索してください。

現在、国内約300件、海外約100件のユーザ登録を得ている。

操作方法に関する講習会の実施(年3回)。定期的なデータ更新(年2回)、システムの改良等を実施。

国内ユーザの現状の主な利用方法は、化学品開発のスクリーニングや毒性試験実施の参考情報(ユーザデータの内部利用可)。

データやツールの一部はOECD QSAR Toolboxへ搭載されている。ECHAではREACH登録物質の評価に内部利用している。

まとめ

化学物質審査規制法の試験データを基に反復投与毒性をカテゴリーアプローチにより評価するための手法とその評価支援システム“HESS”を開発し公開した。

現在は、国内外でのシステムの普及活動と共に、ユーザ様(花王様、田辺三菱様)のご協力を頂きシステムの適用範囲の拡大に取り組んでいる。



化学物質による肝毒性の予測に向けた 核内受容体のインビトロ・インシリコ研究

吉成 浩一
東北大学大学院薬学研究科
薬物動態学分野

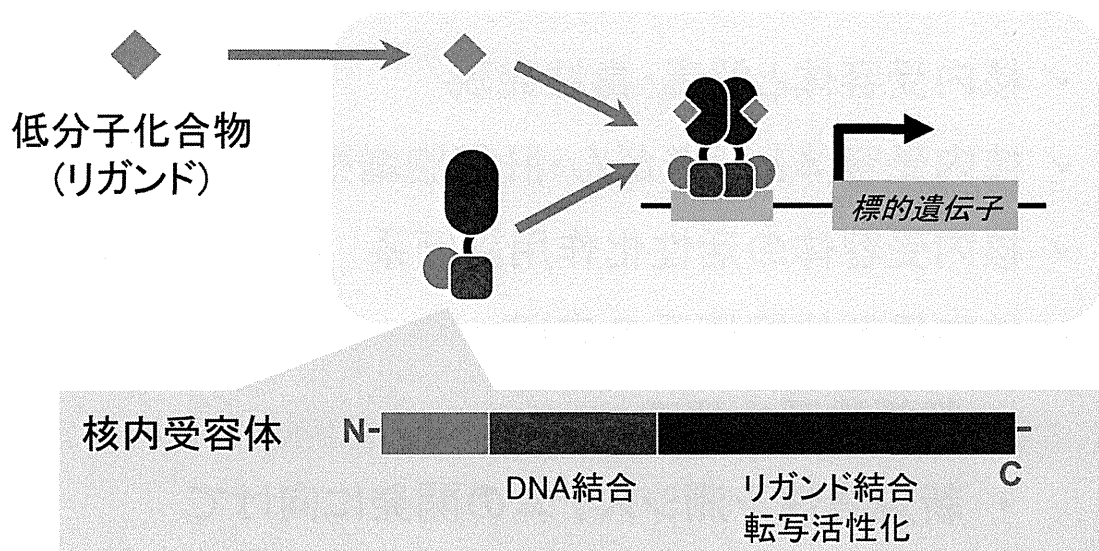
本日の内容



- ✓ 核内受容体と解毒・毒性発現
- ✓ 核内受容体と肝発がん・肝細胞増殖
- ✓ 核内受容体の活性化作用評価系
- ✓ 核内受容体評価系の応用
 - 肝細胞肥大研究
 - 新規毒性予測システムの開発に向けて

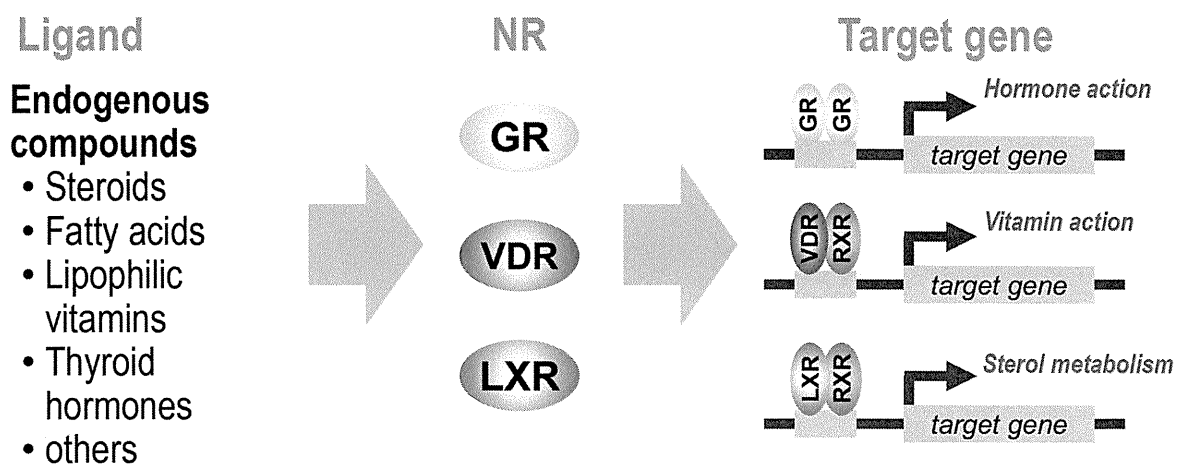
- ✓ 核内受容体と解毒・毒性発現
- ✓ 核内受容体と肝発がん・肝細胞増殖
- ✓ 核内受容体の活性化作用評価系
- ✓ 核内受容体評価系の応用
 - 肝細胞肥大研究
 - 新規毒性予測システムの開発に向けて

核内受容体の構造と作用機序: 概略



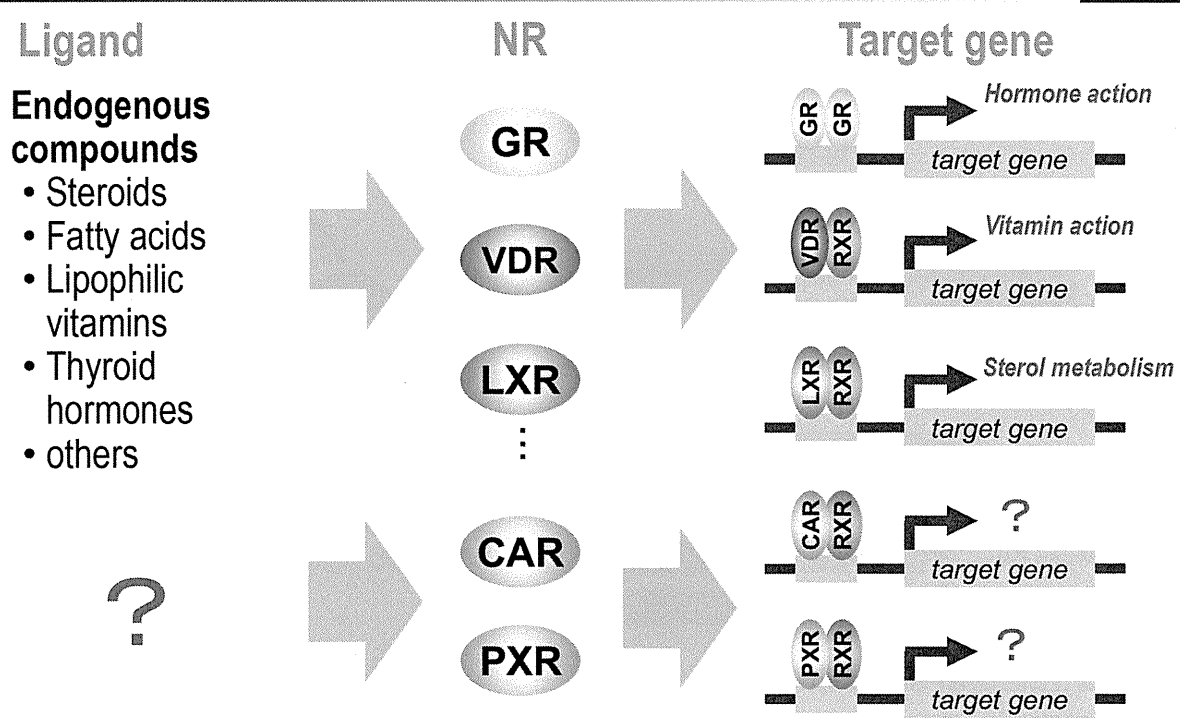
- 核内受容体は、低分子化合物に応答し、遺伝子の発現調節を介して細胞応答を引き起こす。

核内受容体の種類と機能



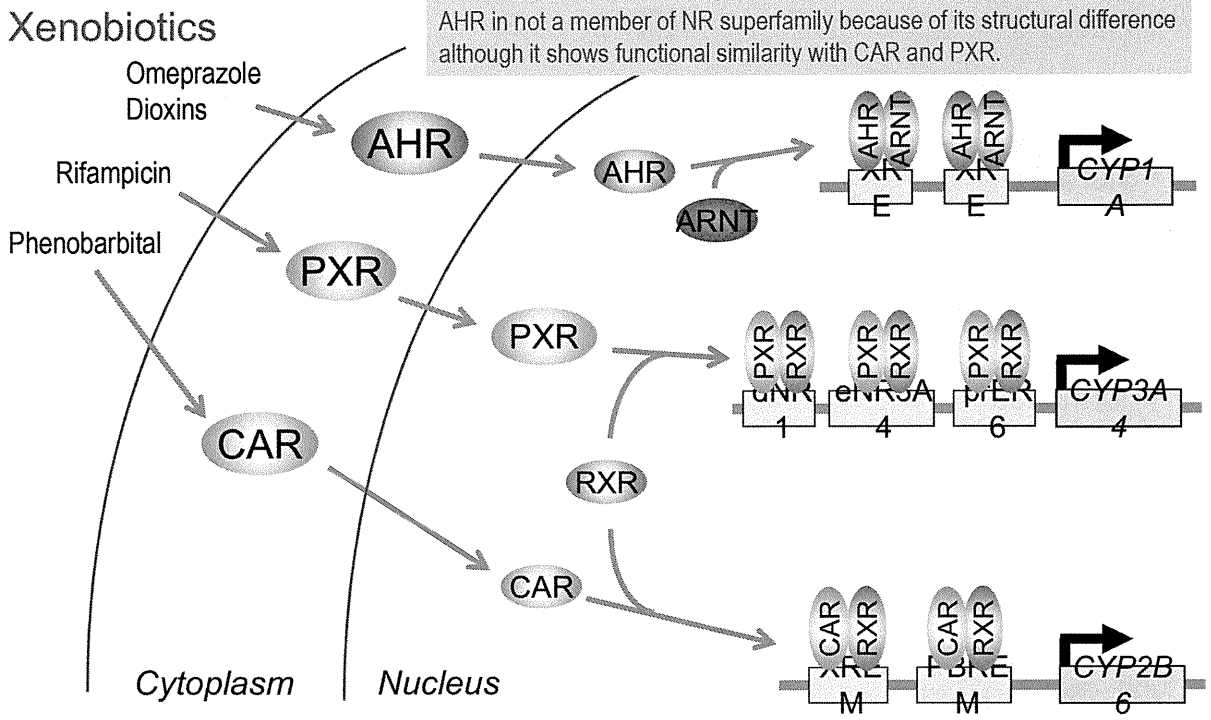
GR: Glucocorticoid receptor
 VDR: vitamin D receptor
 LXR: liver X receptor

核内受容体の種類と機能



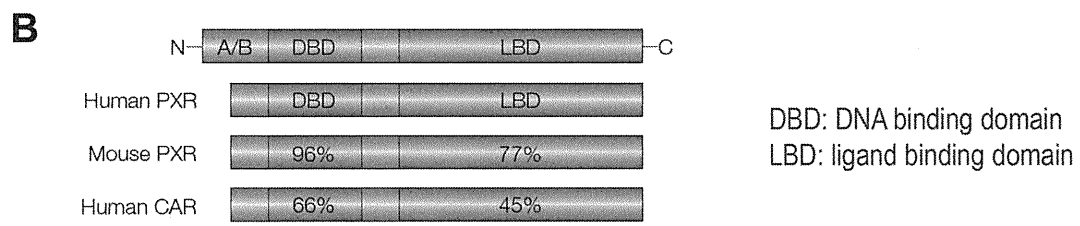
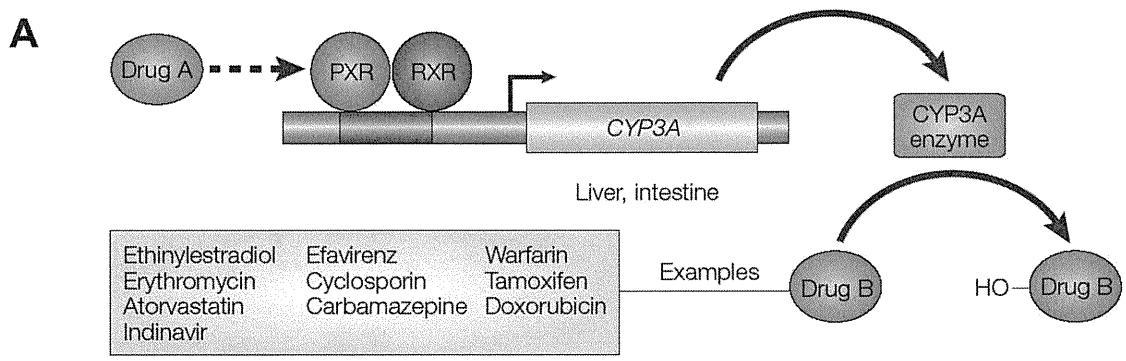
There are 48 members identified in an NR superfamily.

核内受容体は異物代謝に重要な役割を果たす



PAH; polycyclic aromatic hydrocarbons, XRE; xenobiotic-responsive element, dNR1; distal nuclear receptor-binding element 1, prER6; proximal everted repeat 6, XREM; xenobiotic-responsive enhancer module, PBREM; phenobarbital-responsive enhancer module,

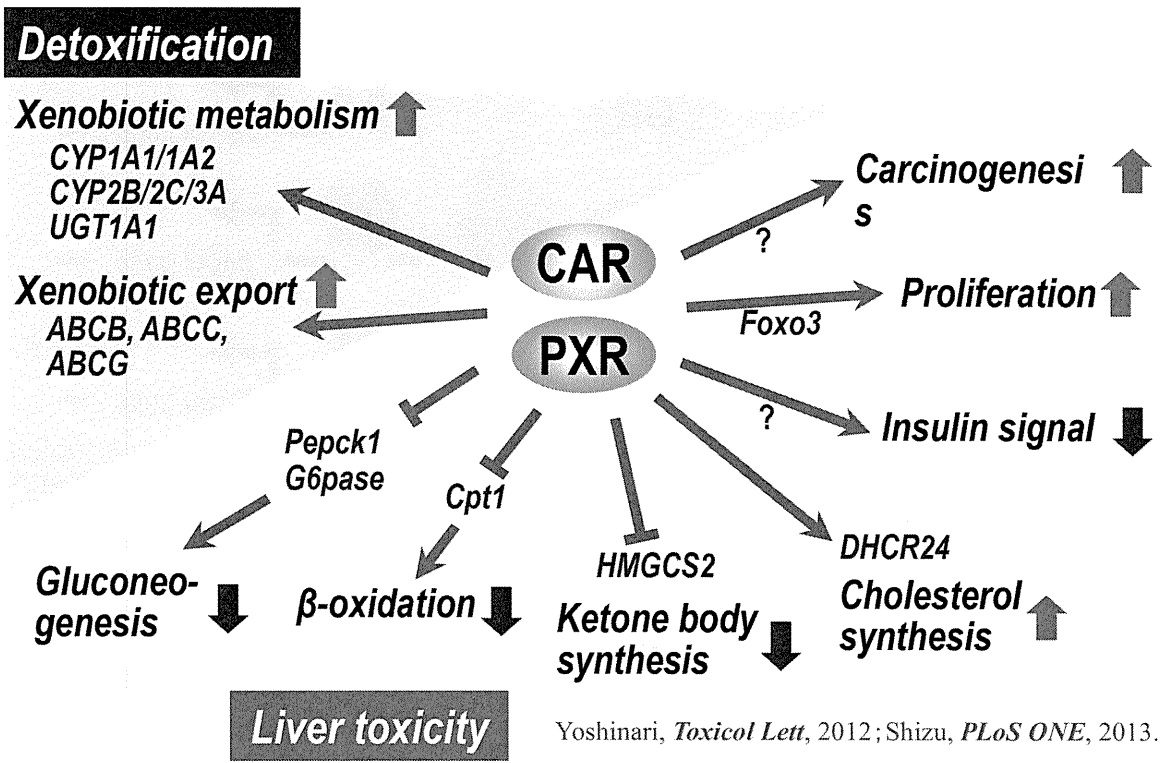
PXRによるCYP3A4誘導と薬物間相互作用



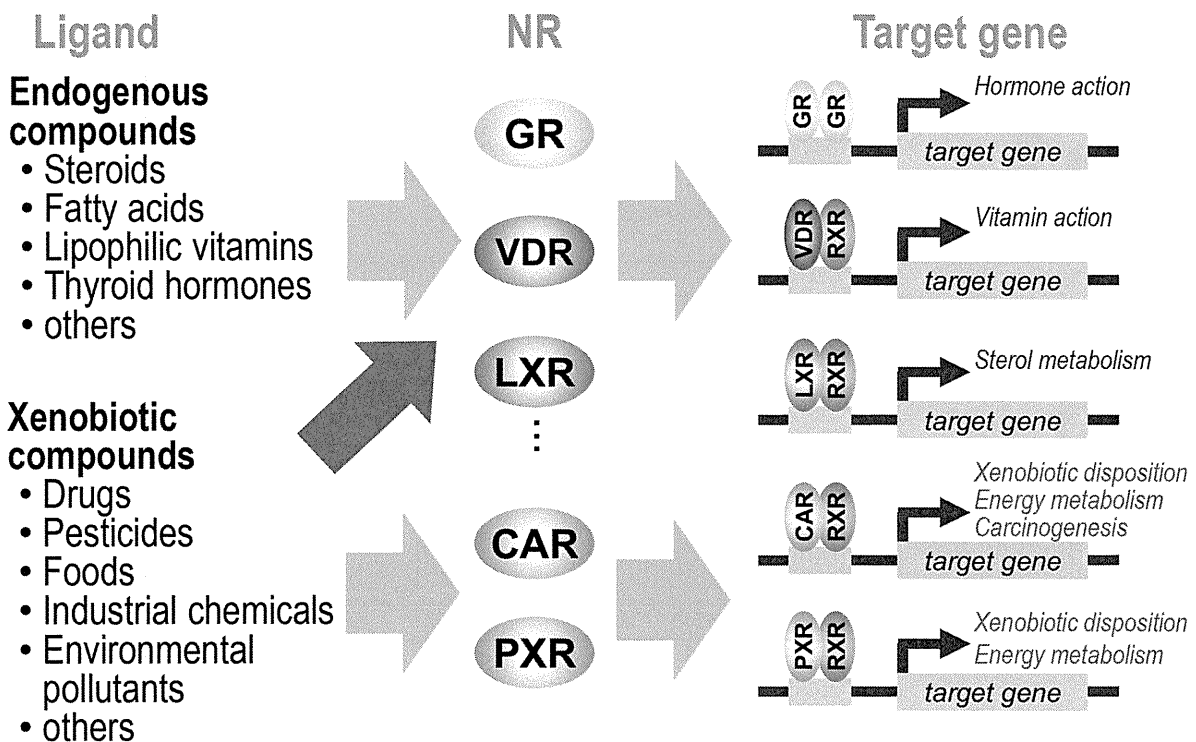
➤ Structural differences in LBD cause species differences in the chemical-mediated NR activation and enzyme induction.

Nature Rev Drug Discov, 1: 259 (2002)

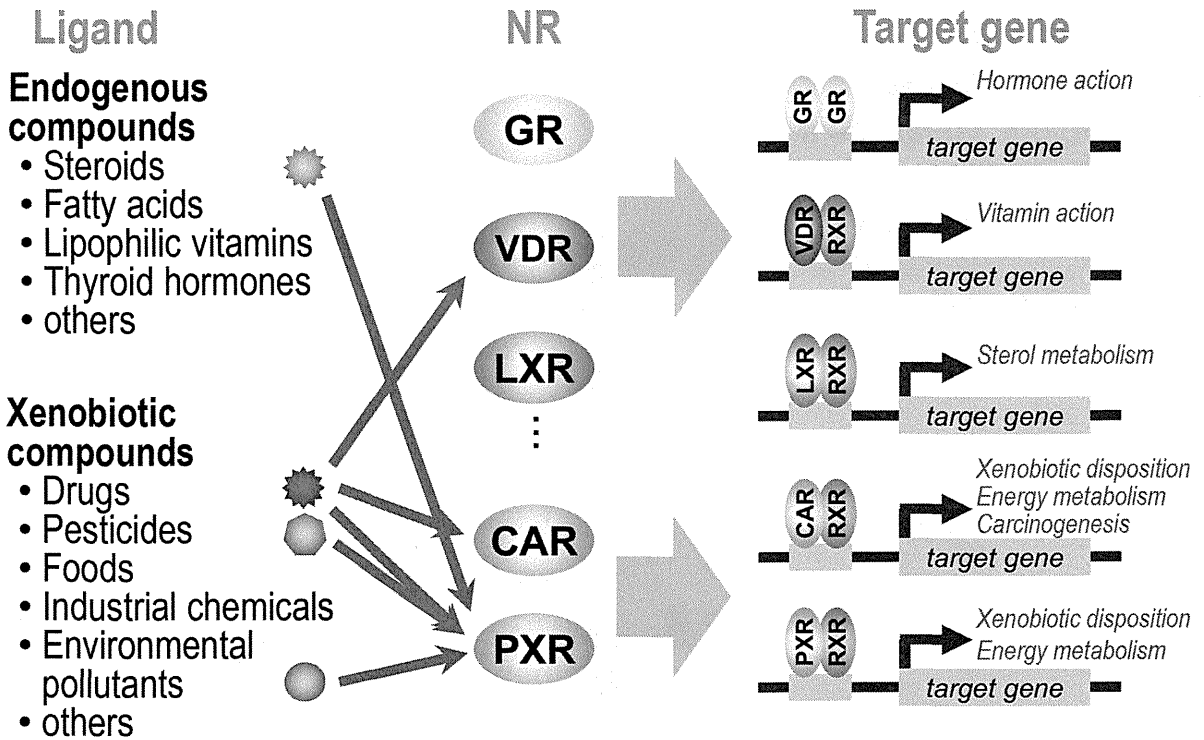
CAR and PXR play key roles in xenobiotic disposition (detoxification) and liver toxicity



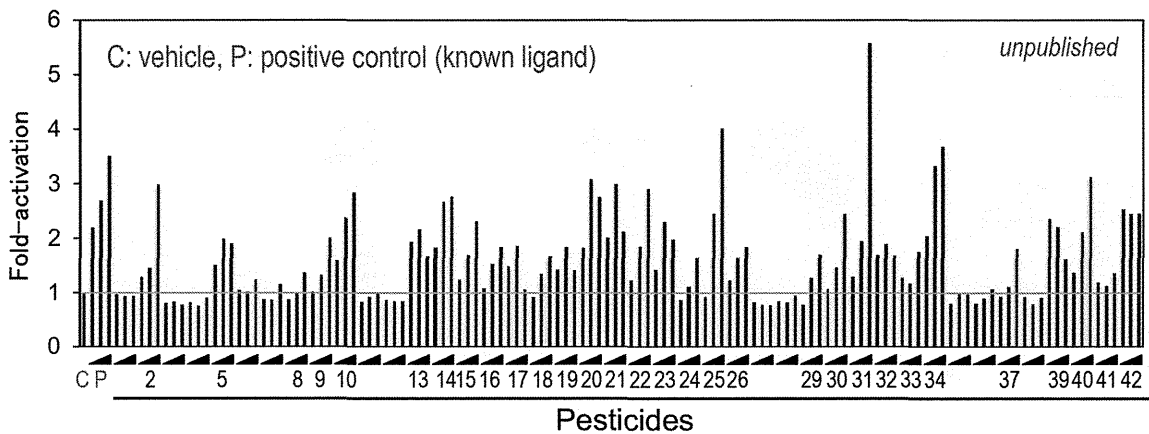
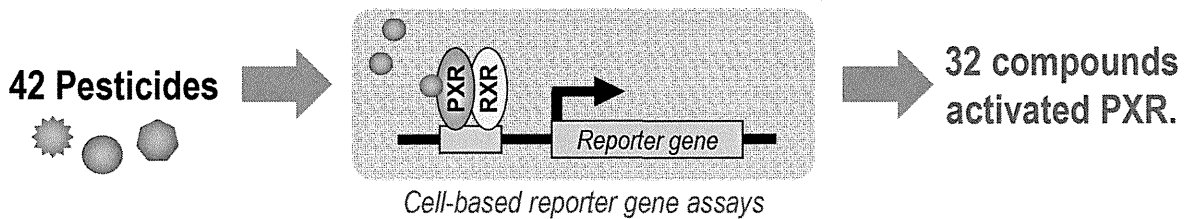
核内受容体の種類と機能



核内受容体の種類と機能

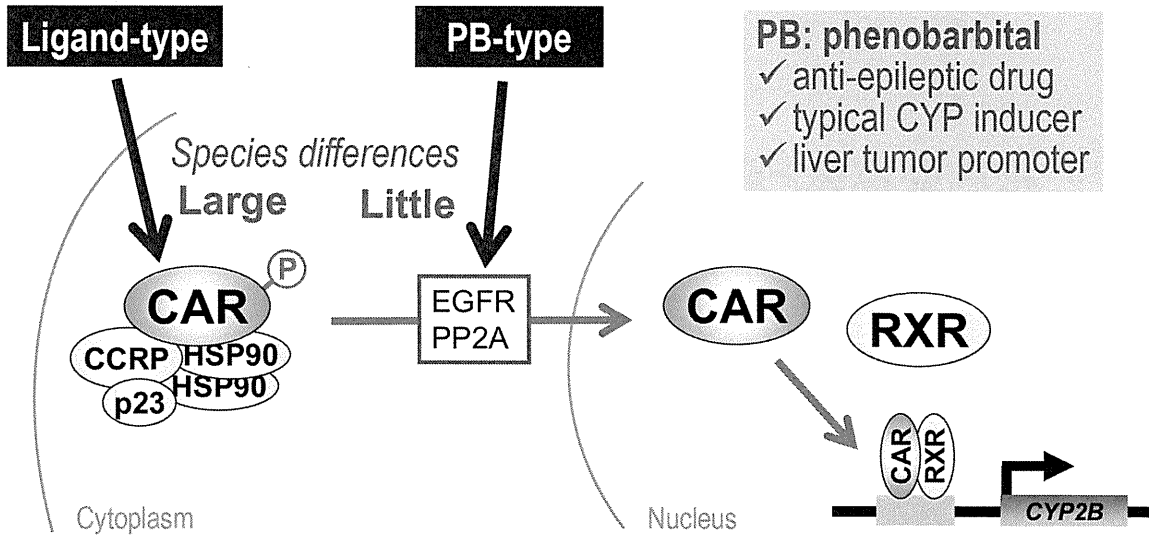


PXR and CAR accommodate structurally diverse chemical compounds showing low ligand selectivity.



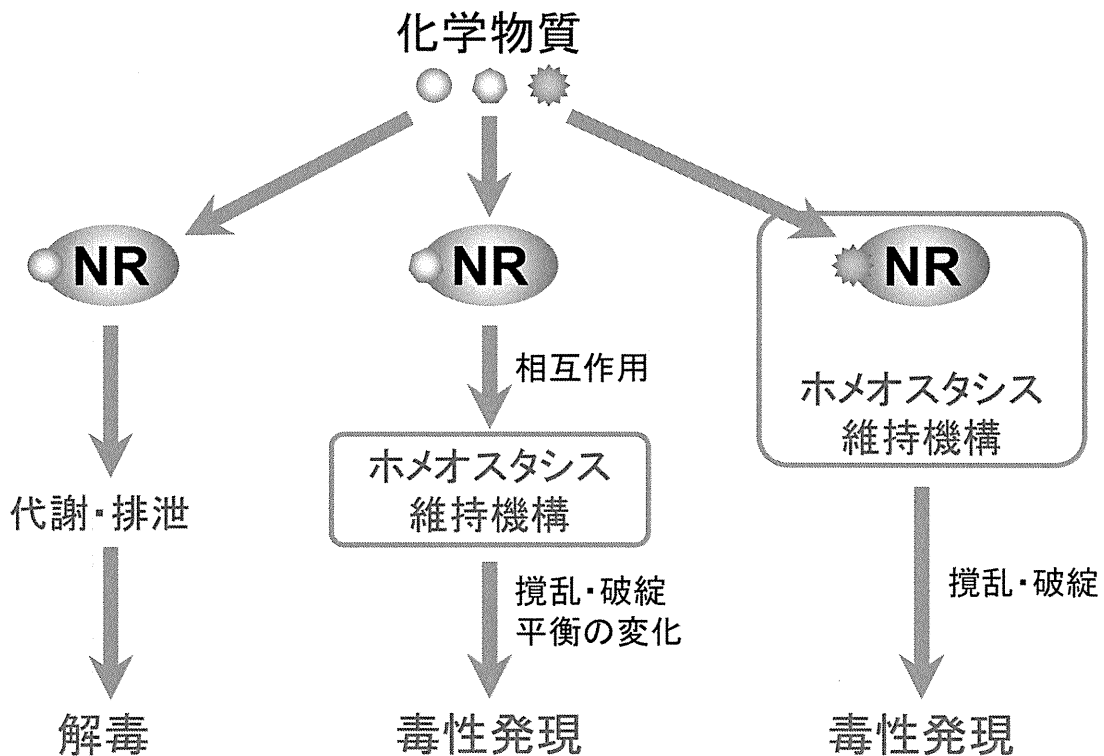
➤ PXR and CAR act as “xeno-sensors” in the liver.

CARの活性化機構と活性化物質の種類



- ✓ CAR is constitutively active transcription factor, and its activity is regulated by cellular localization (nuclear translocation by xenobiotics).
- ✓ Nuclear translocation is regulated de-phosphorylation and phosphorylation by PP2A, PKC and EGFR signals.
- ✓ PB does not bind to CAR, but indirectly activates CAR.

核内受容体による毒性制御





- ✓ 核内受容体と解毒・毒性発現
- ✓ 核内受容体と肝発がん・肝細胞増殖
- ✓ 核内受容体の活性化作用評価系
- ✓ 核内受容体評価系の応用
 - 肝細胞肥大研究
 - 新規毒性予測システムの開発に向けて

Is phenobarbital a carcinogen in human?



IARC report

Evaluation

- ✓ There is inadequate evidence in humans for the carcinogenicity of phenobarbital.
- ✓ There is sufficient evidence in experimental animals for the carcinogenicity of phenobarbital. (liver and thyroid tumors)

Overall evaluation

Phenobarbital is possibly carcinogenic to humans (Group 2B).
(cf. clofibrate is classified in Group 3)

Group	Classification	# of agents
Group 1	Carcinogenic to humans	107
Group 2A	Probably carcinogenic to humans	59
Group 2B	Possibly carcinogenic to humans	267
Group 3	Not classifiable as to its carcinogenicity to humans	508
Group 4	Probably not carcinogenic to humans	1

マウスにおけるphenobarbitalの肝発がんプロモーション作用にはCARが必要である

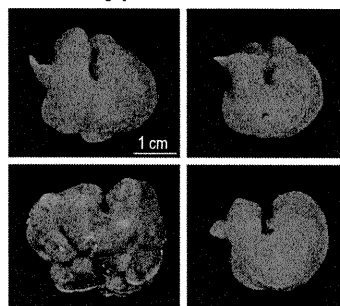


Liver histology

Diethylnitrosamine
(90 mg/kg, ip)

Diethylnitrosamine + phenobarbital
(500 ppm, 32 wk)

Wild-type Car-null



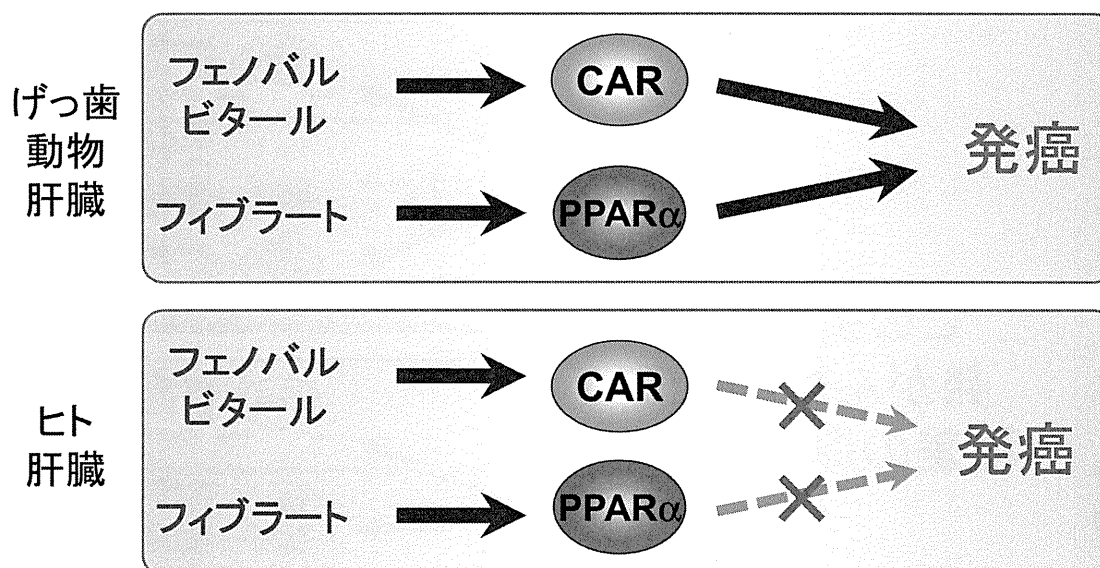
Incidences of proliferative liver lesions after 32 weeks of PB treatment

Genotype	Treatment	(n)	Carcinoma/adenoma	Carcinoma	Eosinophilic adenoma	Other adenoma*
Wild-type	DEN	20	4/20	1/20	0/20	4/20
Wild-type	DEN + PB	20	20/20	8/20	19/20	8/20
Car-null	DEN	20	3/20	0/20	0/20	3/20
Car-null	DEN + PB	19	0/19	0/19	0/19	0/19

*Basophilic, mixed, clear cell, or amphophilic adenoma. DEN, diethylnitrosamine; PB, phenobarbital.

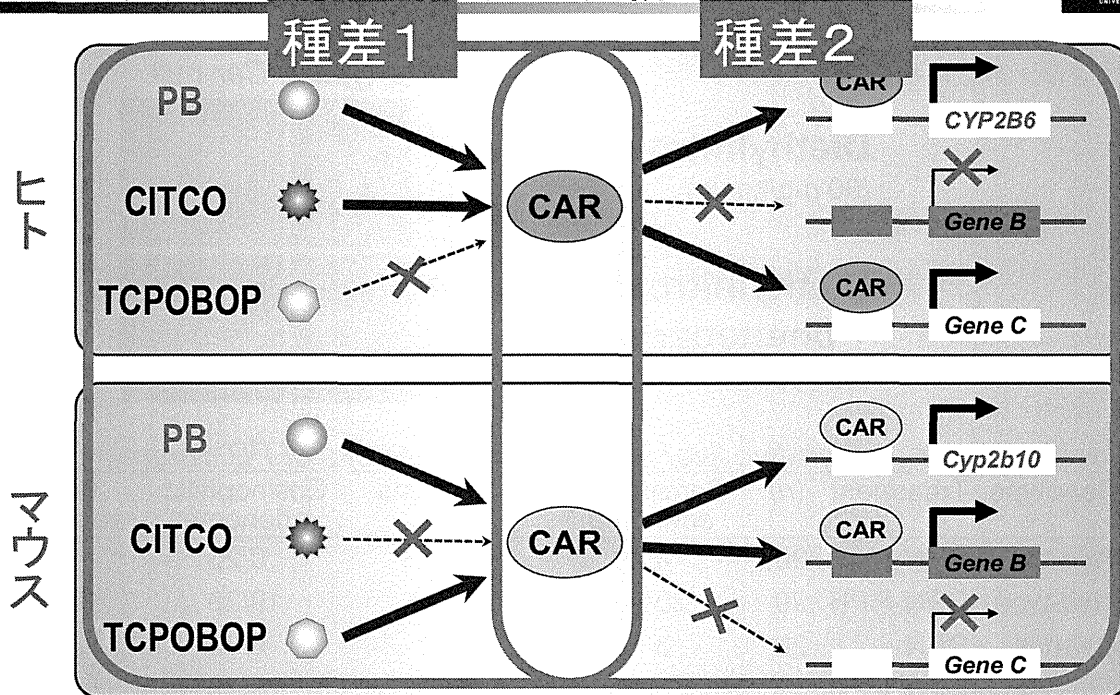
Yamamoto *et al.*, *Cancer Res* 2004;64:7197.

核内受容体を介した肝化学発癌の種差



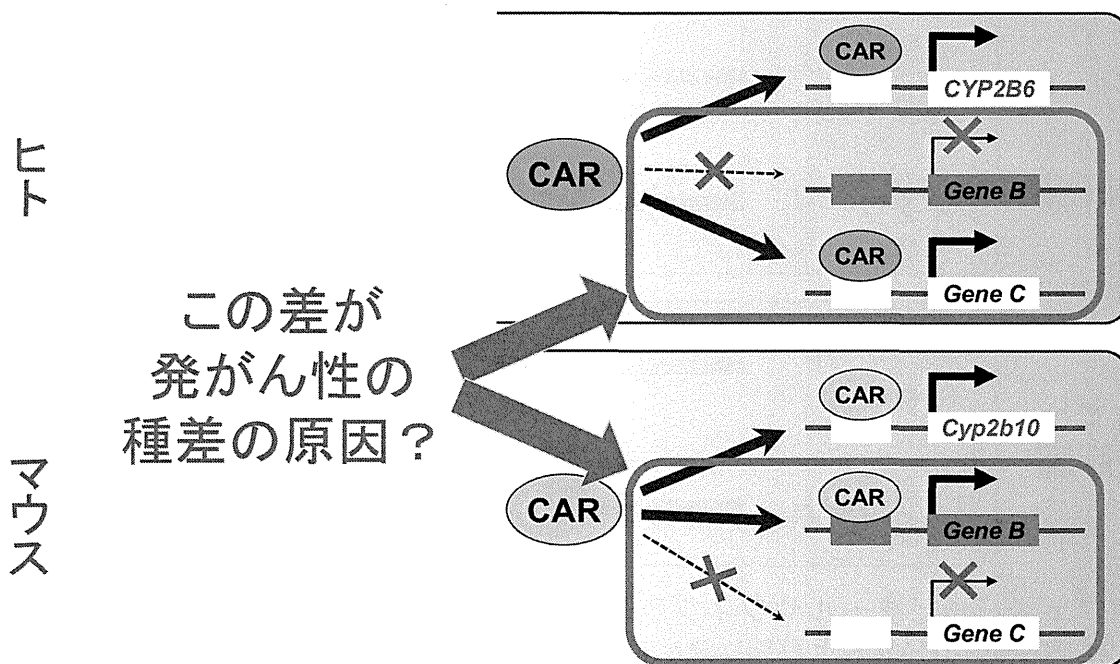
- ✓フェノバルビタールやフィブラートによる、げっ歯動物の肝発がんには、核内受容体CARおよびPPAR α が必要である。
- ✓これら化学物質は、ヒトとげっ歯動物のCARおよびPPAR α を共に活性化するが、ヒトでは肝発癌を起こさないと考えられている。

CARの種差を生じる2つの要因： 活性化物質の種類と機能発現機構



ヒト・マウスに共通のCAR活性化物質であるフェノバルビタールを投与した際にマウスで認められるCAR依存的な転写は、必ずしもヒトで認められるとは限らない。

CAR機能の種差の原因は？



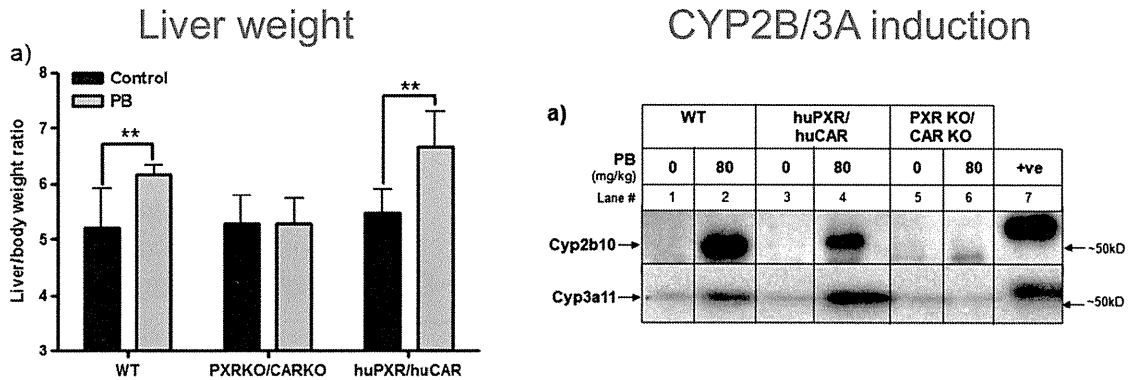
ヒト・マウスに共通のCAR活性化物質であるフェノバルビタールを投与した際にマウスで認められるCAR依存的な転写は、必ずしもヒトで認められるとは限らない。

Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) and Pregnane X Receptor (PXR) Support the Hypertrophic but not the Hyperplastic Response to the Murine Nongenotoxic Hepatocarcinogens Phenobarbital and Chlordane *In Vivo*



Jillian Ross,* Simon M. Plummer,* Anja Rode,† Nico Scheer,† Conrad C. Bower,‡ Ortwin Vogel,§ Colin J. Henderson,‡ C. Roland Wolf,* and Clifford R. Elcombe*¹

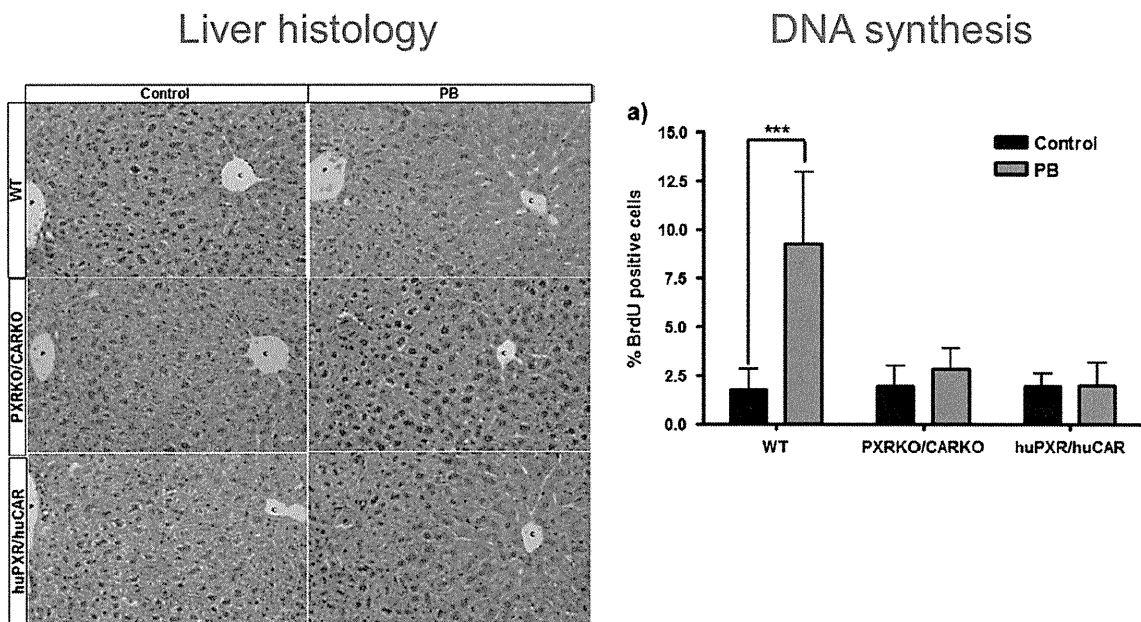
*CXR Biosciences Ltd, 2 James Lindsay Place, Dundee DD1 5JJ, UK; †TaconicArtemis, Newather Ring 1, Köln 51063, Germany; ‡Cancer Research UK, Molecular Pharmacology Unit, Biomedical Research Institute, University of Dundee, Dundee DD1 9SY, UK; and §Toxicologic Pathology Consultancy, Goethestrasse 26, Kiel D-24116, Germany



Mice were treated with phenobarbital (80mg/kg) or vehicle (saline) intraperitoneally for 4 days, and sacrificed 24 hr after the last dose.

Toxicol Sci, 116:452-466, 2010.

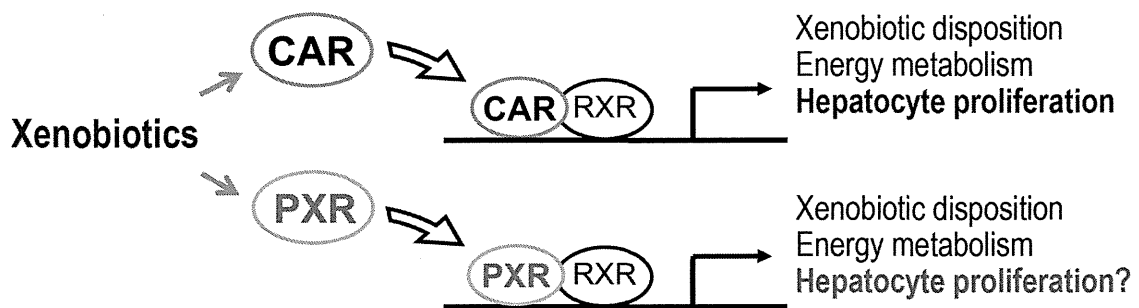
Phenobarbital treatment does induce hypertrophy but not proliferation of hepatocytes in CAR/PXR-humanized mice



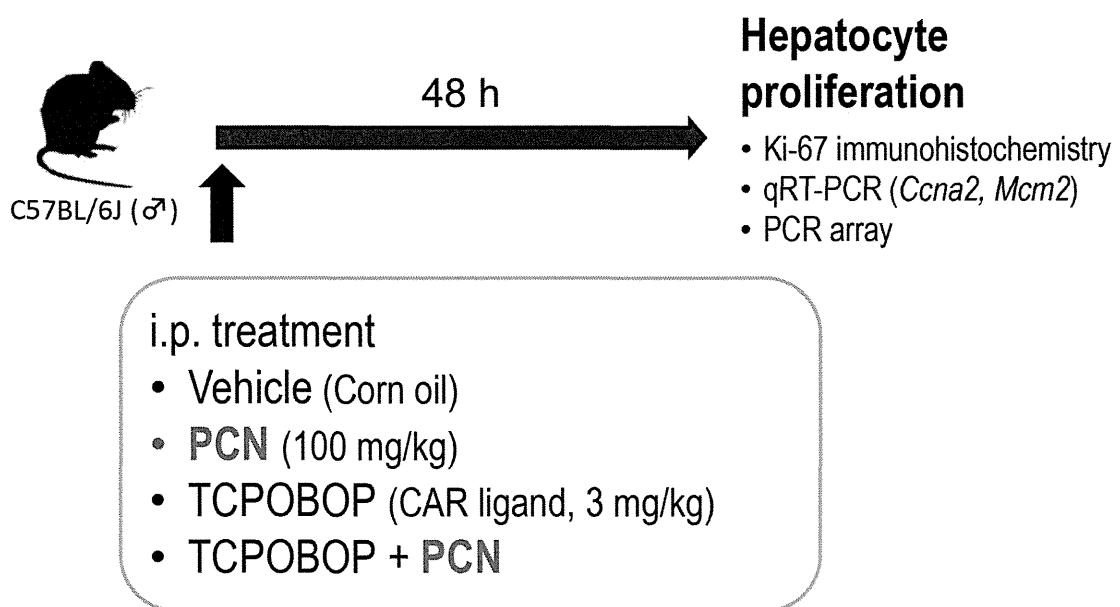
Ross et al., *Toxicol Sci*, 116:452-466, 2010.

PXR and hepatocyte proliferation

- ✓ PXR and CAR are the member of the same NR11 subfamily, and highly expressed in the liver.
- ✓ They share numbers of target genes, which are associated with xenobiotic disposition and energy metabolism.
- ✓ It remains unknown whether PXR activation is associated with hepatocyte proliferation and hepatocarcinogenesis.



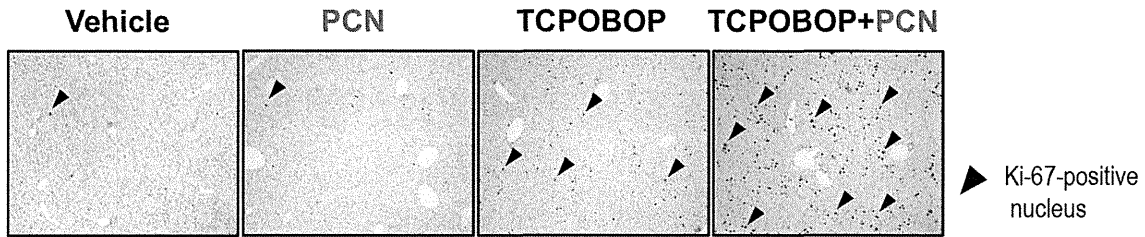
Does PXR activation influence on the CAR-mediated hepatocyte proliferation?



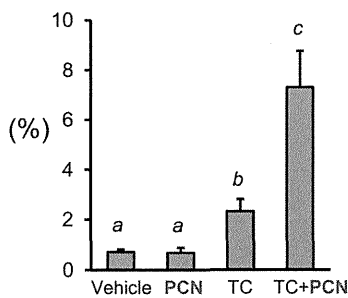
PXR activation enhances the CAR-mediated hepatocyte proliferation.

Shizu, *PLoS ONE*, 2013.

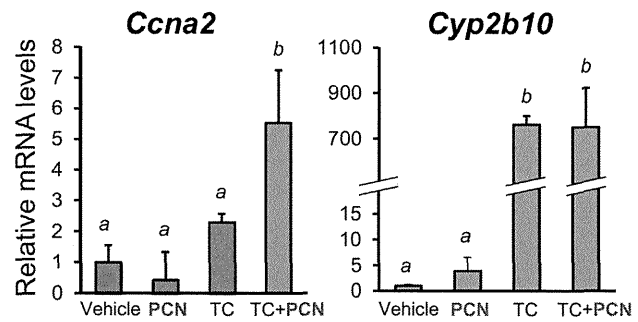
Immunohistochemistry (Ki-67)



Ki-67-positive/total nuclei



mRNA levels

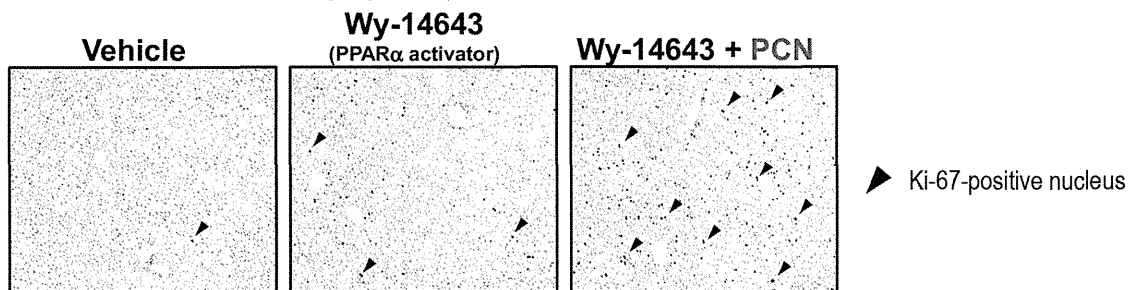


TC, TCPOBOP. Columns not sharing a common letter (a, b, c) differ significantly with each other ($P < 0.05$; Tukey-Kramer test).

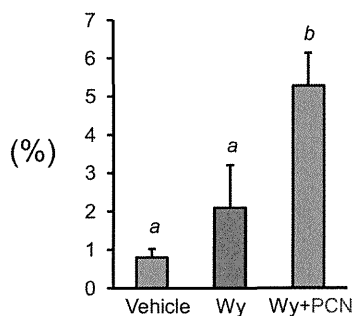
PXR activation also enhances the PPAR α -mediated hepatocyte proliferation

Shizu, *PLoS ONE*, 2013.

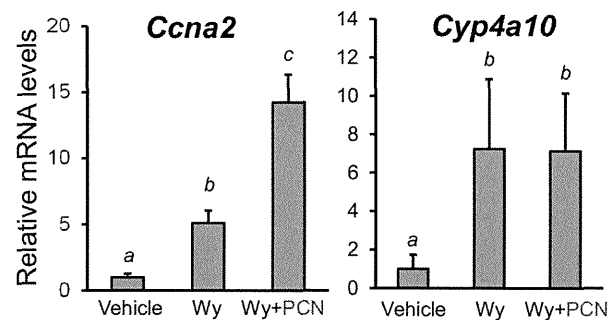
Immunohistochemistry (Ki-67)



Ki-67-positive/total nuclei



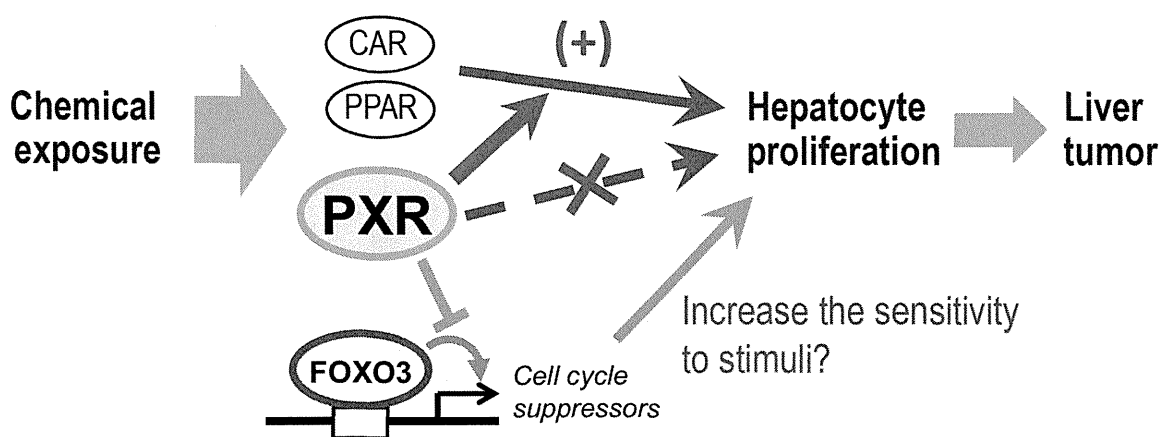
mRNA levels



Wy, Wy-14643. Columns not sharing a common letter (a, b, c) differ significantly with each other ($P < 0.05$; Tukey-Kramer test).

小括

- CARやPPAR α の活性化はげっ歯動物で肝がんを生じる。
- PXR活性化は、それ自身では肝細胞増殖作用を示さないが、CARやPPAR α 依存的な肝細胞増殖を増強する。
- この増強作用には、転写因子FOXO3が関与している可能性がある。



本日の内容



- ✓ 核内受容体と解毒・毒性発現
- ✓ 核内受容体と肝発がん・肝細胞増殖
- ✓ 核内受容体の活性化作用評価系
- ✓ 核内受容体評価系の応用
 - 肝細胞肥大研究
 - 新規毒性予測システムの開発に向けて