

201329022A

別添 1

## 厚生労働科学研究費補助金

### 化学物質リスク研究事業

化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）

構造活性相関およびカテゴリーアプローチの実用化に関する研究

（H24-化学-指定010）

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成26（2014）年 3月



## 目 次

## I. 総括研究報告書 (別添 3)

化学物質のヒト健康リスク評価における

(定量的) 構造活性相関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 1 5

本間 正充/ 森田 健/ 山田 雅巳

反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究 7 3

広瀬 明彦/ 長谷川 隆一

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 8 7

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 1 0 3

吉田 緑

カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究 1 1 5

西村 哲治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5) 1 2 5IV. 研究成果の刊行物・別冊 1 2 9



I. 総括研究報告書

平成 25 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）  
総括研究報告書

化学物質のヒト健康リスク評価における(定量的)構造活性相関および  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究（H24-化学-指定-010）

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 部長

研究要旨

本研究では、構造活性相関やカテゴリーアプローチ手法の化学物質のヒト健康リスク評価における実用化に向けた改良と、得られた成果を基にしたストラテジーの提案を行う。本年度は以下の研究結果を得た。

A) 遺伝毒性の予測に関する研究

エームス試験に関しては、予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行っている。今年度は安衛法エームス試験データ約 2 万物質を入手し、データベース化に着手した。約 1 万 4 千の入力可能物質のうち、約 7 千化合物をデータ入力した。染色体異常試験において、試験最高濃度を低減させた場合の発がん性物質予測率に及ぼす影響を、従来濃度、医薬品適用濃度 (ICH-S2R1)、現行 OECD (1997-OECD) 改訂 OECD (r-OECD) 濃度と比較評価した結果、r-OECD ガイドライン適用による *in silico* 評価に与える影響は小さいと考えられた。ブルガス大学との共同研究により変異原性カテゴリー予測のためのメカニズムベースのサマリーワークフローを導入した。Mode of Action (MoA) に基づくワークフローは、*in vivo* 試験での知識と統合することにより現実の結果を反映する手法となった。MoA パスウェイは、統合的な試験戦略として実用的な価値をもち、未試験の化学物質の遺伝毒性結果を予測する際の不確実性を減らすことができる。ラーサ社との共同研究により、知識ベースの *in vivo* 遺伝毒性の予測モデル (DEREK) の開発を行った。これまで、既存の *in vitro* アラートの拡張により 17、新規の *in vivo* アラートとして 4 個の *in vivo* 染色体異常のアラートを開発した。新たなアラートの開発によって、当初わずか 4%の感度が、今年度のプロジェクト終了時には 32%までの著しい改善が認められた。さらに感度の著しい改善を図るためには、今後は新規の *in vivo* アラートの開発に集中すべきである。

B) 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究：

肝毒性については、新規アラートの適用、修正等を行った。これにより、トレーニングセット化合物群に対する肝毒性の予測精度は、感度が 45.4%、特異性が 75.4%となり、昨年に比べて予測精度の向上が認められた。統計的モデリング・ソフトウェア Sarah を用いた肝毒性予測モデルの構築を試みた。Sarah で構築したモデルは Derek NEXUS とほぼ類似した予測精度を示したが、不一致である割合が 37%と比較的高かった。このことは、これらのシステムを併合することによって感度の向上が得られることを示唆している。

C) 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

化審法既存点検により反復投与毒性試験実施済みの化合物について昨年度実施した構造プロファイリング結果より毒性の強さとの関連が示された特徴部分構造を選択して決定木型の毒性強度評価モデルを構築するとともに外部データセットの判定を行うことにより、構築したモデルの評価を行った。同モデルを用いて外部データセットとして Munro らによる Cramer rules の検証に用いられた化学物質データセットを用いて外部検証を行った結果、最大で 72.5% の一致率を得た。構築したモデルでの判定結果について Cramer rules による判定結果と比較した結果、構築したモデルでは疑陽性率が高いものの毒性物質の抽出における有用性が示唆された。

#### D) 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

化学構造から神経毒性が懸念されるカーバメイト系、有機リン系、16 員環マクロライド系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系の 5 系統について、各系で共通する毒性プロファイル、想定される mode of action、種差、神経毒性発現用量と許容 1 日摂取量(ADI) 設定根拠無毒性量等、多角的な比較を行った。有機リン系・カーバメイト系、16 員環マクロライド系については構造による神経毒性が予測できる可能性が考えられた。それ以外の系および単発的に神経毒性が認められた剤については種差が大きく、構造による神経毒性に関する共通項目は見出すことは困難であった

#### E) カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

有機リン系殺虫剤を対象物質群として、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性阻害を指標とした神経系への毒性に関して、作用と構造の関係を検討した。構造の類似に基づくカテゴリー化による化学物質の類別化が毒性の発現予測に有効であり、作用の強弱の推測が可能であることを示唆する例を提示することができた。

#### 研究分担者

広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 室長

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

山田 雅巳

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

吉田 緑

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

森田 健

国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部 室長

長谷川 隆一

国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員

西村 哲治

帝京平成大学 薬学部 教授

#### A. 研究目的

本研究では、化学物質のヒト健康リスク評価の効率化や動物愛護の観点から(定量的)構造活性相関((Q)SAR)手法やカテゴリーアプローチの化学物質評価における実用化を目的として、それぞれについて規制へ適用可能な手法を構築および改良を行うとともに、最終的に得られた成果をもとにした評価戦略の提案を行うことを目的としている。数万種に及ぶ安全性評価未評価の既存化学物質のリスク管理は、世界的な課題となっており、カテゴリーアプローチや(Q)SAR の利用については、OECD を始めとして EC 諸国および米国 EPA においても検討されているが、実際のヒト健康リスク評価における利用は未だ限定的であ

る。医薬品においては、変異原性不純物の評価に QSAR やカテゴリーアプローチが本格的に利用されつつあり、この流れは一般化学物質の評価・管理に波及することが予想される。我々は、これまでにヒト健康影響に関するスクリーニング試験の内、変異原性、染色体異常について 3 種のプログラムを用いた予測システムの開発を、反復毒性については肝毒性と腎毒性をターゲットとしたアラート開発等により有用性に関する知見を得ている。

本研究では、得られたシステムのリスク評価への実用化に向けて、予測精度の向上を目指す。遺伝毒性に関してはエームス試験、染色体異常試験、小核試験の大規模データベースを再構築し、適切かつ多数の遺伝毒性アラートを抽出し、遺伝毒性の予測精度の格段の向上を行う。一方、反復毒性については、これまでのところ国際的に認められる信頼性の高い手法は提案されていない。本研究では、病理変化や生化学的変化などの毒性変化の組み合わせにより毒性の機序分類を行い、一方で化学構造面の類似性と毒性機序の類似性について相関性について解析を行う。これにより、高精度の予測モデルやカテゴリー候補物質群の構築および OECD で検討されている毒性パスウェイ (AOP) 候補となる情報を得ることが可能となる。さらに、同様の取り組みを行っている米国 EPA や EU および OECD における取組について情報収集を行い、国際強調に対応した利用法について検討し、最終的に、実際の評価過程でカテゴリーアプローチや、QSAR を用いるストラテジーを国際的に提案することで日本の国際貢献へも寄与することを目的とする。

## B. 研究方法

### エームス試験データベースの再構築と、TIMES のバリデーションに関する研究

労働安全衛生法に従って報告された約 20,000 化学物質の試験データを精査しデータベース作成ソフト JChem に入力した。また、ブルガリアブルガス大学で開発された QSAR モデルである TIMES の機能の改良を行った。

### 染色体異常 (CA) 試験における最高濃度低減に伴う発がん性予測率の推移に関する研究

In vitro CA 試験の齧歯類発がん性との感受性および特異性を解析するために、カーランドデータベース (CGX DB) からの 435 物質のデータセット (CA 陽性 267 物質、CA 陰性 168 物質；発がん性 317 物質、非発がん性 118 物質) を用い、各ガイドラインの最高濃度限界を適用させた。また、CA 陽性物質について、分子量分布を調査した。

### 遺伝毒性エンドポイント予測のための段階的アプローチ：化学物質の変異原性を予測するためのパスウェイベースのワークフロー

各遺伝毒性試験結果を基に、1) 能力、2) in vitro か in vivo か、3) エンドポイントの種類 (遺伝毒性か変異原性か)、4) 身体部位 (主要代謝組織 [肝臓] か、代謝から離れた組織 [骨髄など] か) といった基準に基づき、異なるレベルの生物学的構造 (1、2、3) と異なる能力 (A、B、C) から構成されるパスウェイを、変異原性に至る様々

な Mode of Action (MoA)について作成し、単一のワークフローとして表示する。さらに、ワークフロー内のレベルと能力に関する実験結果を調べ、パスウェイを Weight of Evidence (WoE)スキームの中で評価した。

#### In vivo 遺伝毒性の知識ベース SAR モデルの改良に関する研究

これまでに使用した in vivo の小核(MN)試験データのうち、以下の 3 つのデータセットを本研究で使用した。

- MMS データセット - 日本の哺乳動物試験 (MMS) 研究会により編集され、提供されたデータセット。このデータセットには in vivo の小核試験データと関連がある計 255 個の化合物が含まれている。

- FDA データセット - FDA genetox データベース (2010 年版) を含む Leadscope Inc. のデータベースから抽出されたデータセット。このデータセットには in vivo の小核試験データと関連がある計 956 個の化合物が含まれている。

- Vitic Nexus データセット - オンラインデータベース Vitic Nexus (1.75 版データベース) から抽出されたデータセット。このデータセットには in vivo の小核試験データと関連がある計 804 個の化合物が含まれている。

これら複合データセットから、in vivo MN に適用可能なアラートを検索した。

#### 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究

反復投与毒性試験データについては詳細な肝毒性データを解析した。ChemIDPlus、PubMed および Google を用いて、化合物の

肝毒性データを調査した。ChemIDPlus のサブストラクチャーによる調査で発見された化合物の毒性データも探索した。また、公表されているデータセットである Liver Toxicity Knowledge base (FDA)、Fourches data set [Fourches et al., 2010]、および NITE により作成された HESS DB 内の毒性データも検索した。

Sarah のプロトタイプ版を使用して反復投与毒性試験データセットにより肝毒性モデルを構築した。Sarah の設定/パラメータを様々に変化させ、良好な適用範囲、高い感度および高い特異性が得られる最適な組み合わせを特定した。各モデルの構築を実施するため、5-fold cross-validation (5 倍の交差検証) を用い、またモデルの性能の計算を使用してモデルに対するこれらの設定の変更の影響を比較した。

#### 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

毒性部分構造を指標とした毒性強度判別手法の検討のために、部分構造クラスタリングによる毒性部分構造の選択、毒性関連部分構造を指標とした毒性強度判別モデルの作成、毒性強度判別モデルの外部検証を行った。脾臓毒性をターゲットとした判別分析評価法の検討のために、脾臓毒性所見の整理し、パラメータの生成と抽出を行い、モデルを作成した。その後、脾臓毒性評価精度の検討を行った。

#### 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

2003 年から 2011 年まで食品安全委員会で評価され評価書として公表された 201 農



薬の毒性データを用いた。同一の農薬で複数の評価書がある場合は最新版から評価し、神経毒性物質を選択した。分類された個々の剤について、神経毒性に関連する変化(コリンエステラーゼ(ChE)活性阻害等)を検索し、それらの変化が認められた試験、動物種、その試験における神経毒性の無毒性量(NOAEL)を抽出した。

#### カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を示す化学物質として、有機リン系農薬に関する既報の結果を収集し、カテゴリー化による手法(カテゴリーアプローチ)を検討した。

### C. 研究結果

#### エームス試験データベースの再構築と、TIMES のバリデーションに関する研究

エームス試験データの内訳は以下のとおりで、CAS#無の6,521のうち、70-80%が今後の作業で入力できるものと推定される。したがって12,000-13,000のデータ数を持つ信頼性の高いAmes試験のデータベースが構築できるものと考えている。

- ・ 入手したデータ数 : 20,761
- ・ 物質名から入力可としたデータ数 : 14,392
- ・ 構造式が描けないと判断したデータ数 : 6,369
- ・ 日化辞サイト・職場の安全サイトから情報入手できるとしたデータ数 : 13,453
- ・ そのうちCAS#有 : 6,932 → 入力済んでいるデータ数 : 6,932
- ・ CAS#無 : 6,521 → うち構造情報が入手でき、入力できたデータ数 : 126

- ・ 入力保留中のデータ数 (CAS#に関わらず) : 136

入手データの中で、陽性判定物質の割合は約13%で、そのうち3分の1が強い陽性とされるものであった。85%以上が陰性判定物質であった。

#### 染色体異常試験における最高濃度低減化に伴う発がん性予測率の推移に関する研究

染色体異常試験において、試験最高濃度を低減させた場合の発がん性物質予測率に及ぼす影響を、従来濃度、医薬品適用濃度CGX DBからのCA陽性267物質(発がん物質210、非発がん物質57)についての再評価を行った。CGX DBにおいてCA陽性とされている267物質については、10 mM超での陽性が19物質含まれていた(10の発がん物質と9の非発がん物質)。10の発がん物質の中にはIARCのグループ2A物質も含まれていた。CA陽性物質は1997-OECD、r-OECDあるいはICH TGの適用で267物質からそれぞれ248、248あるいは176物質に減少し、CA陰性物質は168物質からそれぞれ187、187あるいは259物質に増加した。これらの数値から算出した感受性は、1997-OECD、r-OECDあるいはICH TGの適用で66.2%からそれぞれ63.1%、63.1%、45.4%に減少し、特異性は51.7%からそれぞれ59.3%、59.3%、72.9%に増加した。r-OECD TGの適用による感受性・特異性は、1997-OECD TGによるものと変わらなかったが、ICH TGでは感受性が約15%減少し、一方、特異性は約15%増加した。

#### 遺伝毒性エンドポイント予測のための段階



## 的アプローチ：化学物質の変異原性を予測するためのパスウェイベースのワークフロー

### 二

特定の遺伝毒性試験を生物学的構造の様々なレベル（*in vitro* 対 *in vivo*、肝臓対遠隔組織）で一覧にした。細菌を用いた *in vitro* 変異原性に関する「レベル 1A」は、ラット肝 S9 の外因性活性化系存在下での Ames 試験による評価である。「レベル 1B」は *in vitro* の変異原性に関するもので、哺乳類の染色体異常試験と、マウスリンフォーマ試験において評価される。「レベル 2」は A、B、C のサブグループに細分される。グループ A は *in vivo* の肝臓における遺伝毒性、B は *in vivo* の TRM に関するもの、C は、哺乳類の染色体異常試験において評価される。「レベル 3」には、唯一のカテゴリの *in vivo* 変異原性が含まれ、骨髄小核試験が唯一の試験である。この試験により、変異原性の化学物質の主要な代謝活性化が行われる肝臓から、離れた部位での染色体異常誘発性が検出される。

## In vivo 遺伝毒性の知識ベース SAR モデルの改良

*In vivo* 遺伝毒性のアラートとして検討された 3 つのアラートのうちの 2 つが *in vivo* 活性と関連があると考えられたので拡張された。各々のケースで、これらのアラートは十分に *in vivo* データの予測に役立つ、活性のメカニズムは *in vitro* および *in vivo* のエンドポイントの両方で同一であると考えられた。アラート 674 では、*in vivo* データがこのアラートを拡張する裏付けとならないと判断され、コメントを改定してこのクラスの *in vivo* 活性が認められない

と記述した。Derek の 2014 年版の知識ベースでこの修正されたアラートをインプリメントした。2 つのアラートの拡張により、感度が 39.3% から 40.2% まで若干上昇した。これは実験で陽性の結果が得られた追加の化合物が正しく予測されたためであった。しかし、特異性と一致率の低下も認められた。

## 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究

5 つの Rapid Prototype (RP) を検討し、そのうちの 1 つが修正され、4 つを非アクティブ化とした。また、RP001 由来の化合物の毒性を記述する 1 つの新規のアラートがインプリメントされ、既存の 3 つの肝毒性アラートが修正され (RP 010、014、026 の適用範囲に入る化合物を含めるため)、1 つの RP アラート (002) が非アクティブ化されたが、知識ベースのそれ以上の変更は行わなかった。新規の知識の検討とインプリメントの結果として、反復投与毒性試験データセットに対する肝毒性エンドポイントの予測性能が変化した。肝毒性エンドポイントのすべてのアラートを用いてこのエンドポイントの評価を行った。ラーサ社で開発された新しい統計型 QSAR モデルである Sarah よる予測と Derek による予測を比較した。両システムにおける個々の化合物予測結果が不一致である割合が比較的高かった (37%)。

## 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

昨年度の検討から無毒性量と分子量に相関が認められたことから、評価基準として

無毒性量を分子量で除した値を用い、内部検証で 90%以上の精度（一致率）を得た。同モデルを用いて外部データセットとして Munro らによる Cramer rules の検証に用いられた化学物質データセットを用いて外部検証を行った結果、最大で 72.5%の一致率を得た。構築したモデルでの判定結果について Cramer rules による判定結果と比較した結果、構築したモデルでは疑陽性率が高いものの毒性物質の抽出における有用性が示唆された。これまでにモデル構築の検討を行ってきた肝臓・腎臓以外に脾臓及び消化管における障害が低用量で比較的多くの物質に認められることが明らかとなったことから、本年度は脾臓毒性に対する評価モデルを構築して検証を実施した。しかしながら、内部検証では、一致率 100%のモデルを得ることに成功したものの、外部検証における一致率は最大で 0.62 であり、特に感度については最大で 0.33 であり、偽陰性判定される物質が多いことが明らかとなった。一方、特異度はいずれのモデルでも 80%前後であった。

#### 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

化学構造から神経毒性が懸念されるカーバメイト系、有機リン系、16員環マクロライド系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系の 5 系統について、各系で共通する毒性プロファイル、想定される mode of action、種差、神経毒性発現用量と許容 1 日摂取量(ADI)設定根拠無毒性量等、多角的な比較を行った。構造により神経毒性は有機リン系・カーバメイト系では全ての剤でコリンエステラーゼ(ChE)阻害作用が認め

られ、種差もなく且つ ChE 阻害作用に基づいて ADI が設定されている等、構造による神経毒性に多くの共通項目が認められた。また GABA アゴニスト作用のある 16 員環マクロライド系の剤にも種差のない共通な神経毒性が認められたものの ADI の設定根拠としてはばらつきが認められた。

#### カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

有機リン系殺虫剤を対象物質群として、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性阻害を指標とした神経系への毒性に関して、作用と構造の関係を検討した。ホスフェート型の 6 種では、対象農薬数が少ないこともあり、ADI 値と In vitro 試験法から得られた IC<sub>20</sub> 値の間には相関性は認められなかった。一方、側鎖が長くかつ立体構造が大きくなると、毒性が低くなる傾向がみられた。AChE の結合部位に結合する能力として側鎖の構造が寄与していると考えられた。チオノ型やジチオ型 17 種の中で、フェントロチオンとフェンチオンでは、側鎖の立体的大きさや電子吸引性に基づく相違が阻害作用に影響していると推測された。これらの結果から、構造の類似に基づくカテゴリー化による化学物質の類別化が毒性の発現予測に有効であり、作用の強弱の推測が可能であることを示唆する例を提示することができた。

#### D. 考 察

エームス試験に関しては、QSAR による予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行っている。これら試験データを QSAR のトレーニングセットに組み入れることにより、

格段の予測精度の向上が期待できる。今年度から、安衛法エームス試験データ約 2 万物質を入手し、データベース化に着手した。2 万物質のうち、約 1 万 4 千物質が、分子量 500 以下の化学物質データとして入力可能で有り、これまで、約 7 千化合物をデータベース化した。

染色体異常試験において、試験最高濃度を低減させた場合の発がん性物質予測率に及ぼす影響を、従来濃度、医薬品適用濃度 (ICH-S2R1)、現行 OECD (1997-OECD) 改訂 OECD (r-OECD) 濃度と比較評価した。r-OECD で提案されている最高濃度限界の 10 mM または 2 mg/mL のいずれか低い方は、げっ歯類発がん物質に対する感受性および特異性に影響を与えず、このことは OECD ガイドラインの有用性を示している。したがって、OECD ガイドライン適用による *in silico* 評価に与える影響も小さいものと考えられる。しかしながら、r-OECD は 1997-OECD による CA 陽性物質数をほとんど削減せず、偽陽性低減への効果はない。用いる細胞、細胞毒性測定方法、非生理的条件や代謝活性化系についての考慮など、他のアプローチによる偽陽性の削減方法が必要と考えられる。

ブルガス大学との共同研究により変異原性カテゴリー予測のためのメカニズムベースのサマリーワークフローを導入した。このワークフローを用いて、化学物質が変異原性カテゴリーに分類される。このようなアプローチにより、DNA のみと化学物質との相互作用により得られる有害作用 (Ames 試験、Comet 試験など) を、DNA 及び蛋白質との相互作用により生じる作用 (染色体異常試験 [CA] 及び小核試験 [MNT]

など) から区別することができる。Mode of Action (MoA) に基づくと、ここに示しているワークフローは、*in vivo* 試験での知識と統合することにより現実的な手法となる。具体的には、特定の *in vitro* 変異原性の主要イベントパスウェイ、及び *in vivo* での肝臓での代謝は、一部の事例において、*in vivo* の遠隔組織での作用へと拡張される。得られた MoA パスウェイは、統合的な試験戦略として実用的な価値をもち、未試験の化学物質の遺伝毒性結果を予測する際の不確実性を減らすことができる。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースの *in vivo* 遺伝毒性の予測モデル (DEREK) の開発を行った。NIHS により提供された *in vivo* 小核試験のデータからなる 1 つのデータセットと Vitic Nexus および FDA Genetox (Leadscope) から得られた 2 つの追加データセットを用いて、*in vitro* と *in vivo* の染色体異常との相関性の有無を評価することによって *in vivo* の染色体異常のアラートを検索した。これまで、既存の *in vitro* アラートの拡張により 17、新規の *in vivo* アラートとして 4 個の *in vivo* 染色体異常のアラートを開発した。新たなアラートの開発によって当初、わずか 4% の感度が今年度のプロジェクト終了時には 32% までの著しい改善が認められた。しかしながら、既存の *in vitro* アラートの拡張をさらに検討することによって感度の著しい改善が得られるとは考え難い。さらに感度の著しい改善を図るためには、今後は新規の *in vivo* アラートの開発に集中すべきである。

反復毒性については、これまでのところ国際的に認められる信頼性の高い *in silico*



評価手法は提案されていない。今年度の結果として5つの Rapid Prototypes (RP) アラートが検討され、既存の3つの肝毒性アラートを修正し、1つの新規のアラートをインプリメントした。1つのクラスが検討され、これらの化合物が肝損傷を生じる前に急性毒性を引き起こす可能性があるというエビデンスが得られたため非アクティブ化した。既存のアラートの拡張と、類似の生物学的活性（アラート 547 および 691）および/または共通のメカニズムを呼び出すことができたアラート（アラート 547 および 669）を有するクラスに基づき実施する外挿に関して、今年度の詳細な病理学的データは有用であった。ラーサ社で開発された新しい統計型 QSAR モデルである Sarah よる予測と Derek による予測を比較した。両システムにおける個々の化合物予測結果が不一致である割合が比較的高く（37%）、このことは、これらのシステムを併合することによって感度の向上が得られることを示唆している。両システムから得られた予測を併合することによって、感度の改善が得られた（63%）が、特異性が低下した（59%）。今後、特異性を低下させずにこの感度を維持すると思われる2つのシステムから得られた予測を併合する方法をさらに検討することが必要である。

化学物質の構造や物性の類似性から化学物質をグループ化して、グループの化学物質に類似する毒性を解析し、特定の化学構造に由来する毒性変化の解析、および毒性試験で認められた毒性フェノタイプからの評価モデル構築について検討を進めている。個々の毒性フェノタイプを評価対象とした評価モデルを構築して、その評価精度や有

用性についても検討を進めている。本年度は、脾臓毒性に対する評価モデルを構築して検証を実施した。しかし、内部検証では、一致率 100%のモデルを得ることに成功したものの、外部検証における一致率は最大で 0.62 であり、特に感度については最大で 0.33 であり、偽陰性判定される物質が多いことが明らかとなった。一方、特異度はいずれのモデルでも 80%前後であった。本モデルの外部検証には、新規化学物質データセットを用いたことから本研究でモデル構築に用いた既存化学物質セットでは、脾臓毒性を惹起する化学構造の一部のみしか含まれていない可能性が示唆された。今後は、外部検証セットで偽陰性判定される化学構造について検討を行う必要がある。今回の結果から、特定のフェノタイプ（少なくとも脾臓毒性）を対象とした評価モデル構築においては、より広範な化学構造を含むデータセットが必要であると考察された。

構造別の農薬の毒性プロファイル解析においては、有機リン系およびカーバメイト系の構造を有する剤については ChE 活性阻害作用をエンドポイントとする神経毒性を予測することが可能であると考えられ、ChE 活性阻害の NOAEL は ADI を予測可能と考えられた。16 員環マクロライド系の剤についても構造的に GABA 様神経毒性の予測が可能であると考えられたが、ADI の予測は難しいと考えられた。ネオニコチノイド系およびピレスロイド系については構造から神経毒性を予測することは難しいと考えられた。それ以外の系および単発的に神経毒性が認められた剤については種差が大きく、構造による神経毒性に関する共通項目は見出すことは困難であった。

さらに、有機リン系殺虫剤を対象物質として、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした神経系への毒性に関して、作用と構造の関係を検討した結果、構造の類似に基づくカテゴリー化による化学物質の類別化が毒性の発現予測に有効であり、構造の相違から作用の強弱の推測が可能であることを示唆することができた。今後、カテゴリー化をするために多種多様な化学物質の中から抽出する方法を確立する。また、カテゴリー化の対象とする毒性の選択、毒性作用の発現に寄与する構造と毒性の寄与に対する数値化の手法の確立などの課題に取り組みたい。

## E. 結 論

本研究では、構造活性相関やカテゴリーアプローチ手法の化学物質のヒト健康リスク評価における実用化に向けた改良と、得られた成果を基にしたストラテジーの提案を行う。本年度は計画通りの研究結果を得た。今後の方向性としては、エームス試験に関しては、既存の QSAR ツールの予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行う。公開可能なデータを公開すると共に、独自の予測システムを開発しこの分野で国際的イニシアティブを取る。染色体異常試験については、OECD ガイドラインの変更を鑑み、予測モデルを改良し、実用化に貢献する。In vivo 遺伝毒性試験に関しては、肝代謝と遺伝毒性 AOP を考慮した新しい毒性発現モデルを構築し、新たな QSAR モデルの開発を行う。このことは動物愛護にも貢献できる。また、遺伝毒性はヒト健康リスク評価の第一ステップであることから、国民の

健康確保の迅速化と、産業育成に大きく貢献することができる。反復毒性については、予測対象の毒性指標を毒性学的な観点から整理してデータベース化し毒性機序の分類を行い、化学構造面の類似性と毒性の類似性について相関解析を行うことで、高精度の予測モデルやカテゴリー評価法を構築することで実用化に貢献する。毒性エンドポイントに関しては、これまでの肝毒性、腎毒性だけでなく、血液毒性、脾臓毒性、神経毒性にも目を向けた。ここでの蓄積データについては、OECD 等で提案される手法の評価等に再利用可能な既知見情報になり得る。本研究成果をもとに OECD や諸外国との情報交換を行い、最終的に実際の評価過程で、カテゴリーアプローチや QSAR を使うための評価ストラテジーを提案し、国際貢献に寄与したい。

## F. 研究発表

### 誌上発表

1. Hironao Takasawa, Rie Takashima, Akiko Hattori, Kazunori Narumi, Kazufumi Kawasako, Takeshi Morita, Makoto Hayashi, Shuichi Hamada: Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats (II), Further investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene, Mutation Research, 751, 12-18 (2013)
2. Hayashi M, Honma M, Takahashi M, Horibe A, Tanaka J, Tsuchiya M, Morita T, Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related

- Chemicals. Food Safety 1, 32-42 (2013)
3. Matsumoto, M., Yamaguchi, M., Yoshida, Y., Senuma, M., Takashima, H., Kawamura, T., Kato, H., Takahashi, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Yokoyama, K., Hirose, A., An antioxidant, N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD), affects labor and delivery in rats: A 28-day repeated dose test and reproduction/developmental toxicity test. Food Chem Toxicol. 56, 290-296 (2013)
  4. Takahashi, M., Ishida, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Hirose, A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats. J Toxicol Sci. 39, 97-108 (2014)
  5. Y. Mirokuji, H. Abe, H. Okamura, K. Saito, F. Sekiya, S. Hayashi, S. Maruyama, A. Ono, M. Nakajima, M. Degawa, S. Ozawa, M. Shibutani & T. Maitani ; The JFFMA assessment of flavoring substances structurally related to menthol and uniquely used in Japan.; Food Chem Toxicol, 64, 314-321 (2013)
  6. T. Yamada, R. Hasegawa, S. Nishikawa, Y. Sakuratani, J. Yamada, T. Yamashita, K. Yoshinari, Y. Yamazoe, E. Kamata, A. Ono, A. Hirose & M. Hayashi ; A new parameter that supports speculation on the possible mechanism of hypothyroidism induced by chemical substances in repeated-dose toxicity studies.; J Toxicol Sci, 38,(2) 291-299 (2013)
  7. 小野 敦 ; 化学物質の安全性評価におけるin silico評価手法の利用について; ILSI Japan, 115,8-14 (2013)
  8. 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 平田睦子, 小野 敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 2013. OECD 化学物質対策の動向 (第23報) - 第2回 OECD 化学物質共同評価会議 (2012年パリ) 化学生物総合管理. 9, 241-247.
  9. 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, 中嶋徳弥, 小野 敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 2013. OECD 化学物質対策の動向 (第22報) - 第1回 OECD 化学物質共同評価会議 (2011年パリ) 化学生物総合管理. 9, 112-118.
  10. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 2013. OECD 化学物質共同評価プログラム : 第1回化学物質共同評価会議概要 化学物質総合管理. 9, 92-99.
  11. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 広瀬明彦, 2013. OECD 化学物質共同評価プログラム : 第2回化学物質共同評価会議概要 化学物質総合管理. 9, 100-111.
  12. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 小野 敦, 広瀬明彦, 2013. OECD 化学物質共同評価プログラム : 第3回化学物質共同評価会議概要 化学物質総合管理. 9, 222-231.



13. 松本真理子, 大久保貴之, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 2013. OECD 化学物質共同評価プログラム: 第 4 回化学物質共同評価会議概要 化学物質総合管理. 9, 232-240.

#### 学会発表

1. Morita T., Analysis of Japanese CSCL (Chemical Substances Control Law) Database and ISHL (Industrial Safety and Health Law) databases, ECVAM Workshop: How can in vitro mammalian cell genotoxicity tests reduce the need for in vivo follow-up testing with compounds positive in the Ames test?, 23-25 January 2013, Ispra, Italy.
2. 森田健: ECVAM ワークショップ報告 Ames 陽性のフォローアップとして in vitro 哺乳類細胞試験は利用可能か? JEMS・MMS 研究会 第 62 回定例会、下諏訪、2013 年 5 月.
3. Morita T, Kojima H, Hayashi M: General Principles of Chemical Selection for in vivo Validation Studies, The XIII International Congress of Toxicology, June 30 to July 4, 2013, Seoul, Korea.
4. Morita T, Hatano A, Honma M: Effects of Reduction of the Top Concentration Limit Used in the In Vitro Chromosomal Aberration Test, 49th Congress of the European Societies of Toxicology, September 1-4, 2013, Interlaken, Switzerland.
5. Hamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Takasawa H, Narumi K, Wako Y, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus Assay with 22 Chemicals Using Young Adult Rats (III): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, Environmental Mutagenesis and Genomics Society, 44th Annual Meeting, Monterey, California, 2013/09/21-25.
6. Morita T: Micronucleus test other than bone marrow/peripheral blood and liver, 6th IWGT, 31 October 2013, Iguassu, Brazil
7. Morita T, Hatano A, Honma M: New top concentration limit will not improve positive ratio in the in vitro chromosomal aberration test, resulting in small improvement of false positives, 11th ICEM, Iguassu, Brazil, November 3-8, 2013.
8. Hamada S, Takashima R, Shimada K, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Matsumoto H, Nakai T, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Takasawa H, Narumi K,

- Ohyama W, Wako Y, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Hayashi M, Honma M.: Evaluation of Repeated-Dose Liver Micronucleus Assay with 22 Chemicals Using Young Adult Rats, Iguassu, Brazil, 11th ICEM, November. 3-8, 2013.
9. Honma M.: Risk Assessment and Management of Genotoxic impurities in Pharmaceuticals. Iguassu, Brazil, 11th ICEM, November. 3-8, 2013.
  10. 森田健、幡野晶子、本間正充：改訂 OECD TG で提案された最高上限濃度では偽陽性の削減は期待できない、日本環境変異原学会第 42 回大会、2013 年 11 月 29-30 日、岡山
  11. S Canipa, A Cayley, W Drewe, R V Williams, S Hamada, A Hirose, T. Morita, M Honma: Using Existing In Vitro Structural Alerts For Chromosome Damage To Predict In Vivo Activity And Direct Future Testing, 日本環境変異原学会第 42 回大会、2013 年 11 月 29-30 日、岡山
  12. Hirose, A., 2013. Risk assessment methodology for chemicals and contaminants in foods. ILSI HESI Workshop: Risk Assessment in the 21st Century, Tokyo, 2013.7.
  13. Hirose, A., Fujii, S., Suzuki, T., Kato, H., Kawamura, T., Matsumoto, M., Takahashi, M., Hirata-Koizumi, M., Nishimura, T., Ema, M., and Ono, A. 2014. Combined Repeated-Dose Toxicity Studies with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Tests for Perfluorotetradecanoic Acid and Perfluorohexadecanoic Acid in Rats. 第 53 回米国トキシコロジー学会 (2014.3)(Phoenix, Arizona, USA).
  14. Ono, A., Hirata-Koizumi, M., Ise, R., Kato, H., Matsuyama, T., Ema, M., Hirose, A., 2013. Gender-related difference in the toxic susceptibility of rats to an ultraviolet absorber, 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butyl phenyl) benzotriazole: a role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha. The 49th EUROTOX2013 (2013.9) (Switzerland, Interlaken).
  15. Ono, A., Takahashi, M., Yabe, K., Kato, H., Kawamura, T., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., 2013. The Japanese Existing Chemical Safety Survey Program: Reproductive Toxicity of 3-Cyanopyridine In Rats. XIII International Congress of Toxicology, COEX (韓国ソウル市)、2013.7.
  16. Ono, A., Honma, M., Masumori, S., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., and Hirose, A. 2014. An In Vivo Mutagenicity Test of Hydroquinone Using the lacZ Transgenic Mice. 第 53 回米国トキシコロジー学会(2014.3) (Phoenix, Arizona, USA).
  17. Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamada, J., Yoshinari, K., Yamazoe, Y., Ono, A., Hirose, A., Hayashi, M., 2014.

- Hazard Evaluation Support System (HESS) -Proposal of in vitro assays useful for predicting repeated-dose toxicity of chemical substances. FutureTox II: In Vitro Data and In Silico Models for Predictive Toxicology (2014.1) (Chapel Hill, North Carolina, USA).
18. 広瀬明彦, 2013. 食品等に含まれる化学物質のリスク評価の経験とそこから見えてきた課題. 日本リスク研究学会第26回シンポジウム (2013.6.14 東京).
  19. 広瀬明彦, 2013. 毒性学的懸念の閾値 (TTC) を利用した食品中化学物質のリスク評価 <ワークショップ 3 食品中の化学物質についてのリスク評価法の現状と問題点>, 第40回日本毒性学会学術年会 (2013.6 千葉)
  20. 小野敦, 平田睦子, 加藤寛人, 伊勢良太, 広瀬明彦, 2013. 2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole による肝毒性メカニズムのトランスクリプトーム解析. 第40回日本毒性学会学術年会 (2013.6 千葉)

G. 知的所有権の取得状況  
(該当なし)



## II. 分担研究報告書

平成 25 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）

報告書

化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）構造活性相関およびカテゴリーアプローチの実用化に関する研究（H24-化学-指定-010）

－遺伝毒性の予測に関する研究－

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・部長
研究分担者	山田 雅巳	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部・第一室長
研究分担者	森田 健	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部・第四室長
研究協力者	宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部第二室室長
研究協力者	北澤 愛莉	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第一室
研究協力者	幡野 晶子	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室
研究協力者	O. Mekenyan	ブルガス大学数学化学研究室・教授
研究協力者	P. Petkov	ブルガス大学数学化学研究室
研究協力者	S. Canipa	ラーサ研究所
研究協力者	A. Cayley	ラーサ研究所
研究協力者	L. Fisk	ラーサ研究所

研究要旨

本研究では、化学物質の遺伝毒性を従来の試験によらず、データベース検索や(Q)SARの利用により、迅速、且つ正確に予測するシステムの構築と、その実用化を目指す。本研究は最終的に化学物質のヒト健康リスク評価の効率化や動物愛護に貢献する。

エームス試験に関しては、予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行っている。今年度は安衛法エームス試験データ約 2 万物質を入手し、データベース化に着手した。2 万物質のうち、約 1 万 4 千物質が、分子量 500 以下の化学物質データとして入力可能で有り、これまで、約 7 千化合物をデータベース化した。このデータベースの利用により多くの QSAR 予測モデルの精度を上げることが可能になることが期待できる。

染色体異常試験において、試験最高濃度を低減させた場合の発がん性物質予測率に及ぼす影響を、従来濃度、医薬品適用濃度（ICH-S2R1）、現行 OECD（1997-OECD）改訂 OECD（r-OECD）濃度と比較評価した。r-OECD で提案されている最高濃度限界の 10 mM または 2 mg/mL のいずれか低い方は、げっ歯類発がん物質に対する感受性および特異性に影響を与えず、このことは OECD ガイドラインの有用性を示している。したがって、OECD ガイドライン適用による in silico 評価に与える影響も小さいものと

考えられる。しかしながら、r-OECD は 1997-OECD による CA 陽性物質数をほとんど削減せず、偽陽性低減への効果はない。用いる細胞、細胞毒性測定方法、非生理的条件や代謝活性化系についての考慮など、他のアプローチによる偽陽性の削減方法が必要と考えられる。

ブルガス大学との共同研究により変異原性カテゴリー予測のためのメカニズムベースのサマリーワークフローを導入した。このワークフローを用いて、化学物質が変異原性カテゴリーに分類される。このようなアプローチにより、DNA のみと化学物質との相互作用により得られる有害作用（Ames 試験、Comet 試験など）を、DNA 及び蛋白質との相互作用により生じる作用（染色体異常試験 [CA] 及び小核試験 [MNT] など）から区別することができる。Mode of Action (MoA) に基づくと、ここに示しているワークフローは、in vivo 試験での知識と統合することにより現実的な手法となる。具体的には、特定の in vitro 変異原性の主要イベントパスウェイ、及び in vivo での肝臓での代謝は、一部の事例において、in vivo の遠隔組織での作用へと拡張される。得られた MoA パスウェイは、統合的な試験戦略として実用的な価値をもち、未試験の化学物質の遺伝毒性結果を予測する際の不確実性を減らすことができる。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースの in vivo 遺伝毒性の予測モデル (DEREK) の開発を行った。NIHS により提供された in vivo 小核試験のデータからなる 1 つのデータセットと Vitic Nexus および FDA genetox (Leadscope) から得られた 2 つの追加データセットを用いて、in vitro と in vivo の染色体異常との相関性の有無を評価することによって in vivo の染色体異常のアラートを検索した。これまで、既存の in vitro アラートの拡張により 17、新規の in vivo アラートとして 4 個の in vivo 染色体異常のアラートを開発した。新たなアラートの開発によって当初、わずか 4% の感度が今年度のプロジェクト終了時には 32% までの著しい改善が認められた。しかしながら、既存の in vitro アラートの拡張をさらに検討することによって感度の著しい改善が得られるとは考え難い。さらに感度の著しい改善を図るためには、今後は新規の in vivo アラートの開発に集中すべきである。

キーワード：エームス試験、染色体異常試験、小核試験、(Q) SAR、アラート、代謝