

図 4. Ames 試験陰性化学物質のワークフロー全体における結果の内訳

IV. 既存遺伝毒性試験データを用いた *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

-*In vivo* の染色体損傷のエンドポイントの適用範囲を改善するための Derek Nexus アラートの開発- (研究分担: 本間正充)

IV-1. 研究目的

Derek Nexus (DX) は Lhasa Limited UK により作成された毒性を予測するためのエキスパートシステムである。その知識ベースはアラート、例証および推論規則からなり、その各々がこのシステムにより作成される毒性の予測に寄与する。現在のプロジェクトは Lhasa Limited と日本の国立医薬品食品研究所 (NIHS) との間の共同プロジェクトであり、その中で NIHS により提供されたデータを利用して新規のアラートの開発、またはアラートの修正が行われ、Derek における知識ベースがさらに改善されている。ここでは、本年度のプロジェクトのために NIHS により提供されたデータにより、*in vivo* の染色体異常のエンドポイントについて記載する。

以前実施された NIHS とラーサ社との共同プロジェクトの一部として、Derek 内の *in vivo* の染色体損傷の適用範囲を発展させた。ここでのアプローチは個々の *in vitro* 染色体異常アラートと *in vivo* 活性との関連性を評価することであった。*in vitro* のアラートが *in vivo* データ (主として *in vivo* の小核試験と染色体異常試験の結果を用いて評価された) の予測に

十分に役立つ場合、また両エンドポイントのメカニズムが同一であると考えられる場合、そのアラートは *in vivo* 活性の予測に拡張された。拡張されたアラートは同じ範囲を用いて *in vitro* および *in vivo* の染色体損傷の両者を予測したが、場合によっては異なるエンドポイントが異なる推論で予測された。予測性能が悪い場合、または別のメカニズムが *in vivo* 毒性の原因であると考えられる場合は *in vitro* のアラートを拡張しなかった。そのクラスの *in vivo* 活性が認められないと記述するためにアラートの記述を改定した。*in vitro* のアラートが *in vivo* データの予測に役立たない場合もあったが、この検討によって新規の *in vivo* のアラートが特定された。続いてこの新規のアラートが知識ベースに装着された。現在までに計 29 の *in vitro* のアラートが検討されている。表 1 に示すように、NIHS の 4 年目、5 年目および 6 年目のプロジェクトの一部として解析された 19 のアラートのうちのほとんど (18/19) が *in vivo* 活性の予測に拡張されるか (14)、または新規の *in vivo* アラートが開発されることになった (4)。

表 1. NIHS の 4 年目、5 年目および 6 年目のプロジェクトの一部および Derek 2011 プロジェクトで検討されたアラートの数

年	調査アラート数	Vivo への拡張可	Vivo への拡張付加	新規 Vivo アラート
Derek 2011	10	3	7	0
NIHS Year 4	7	5	1	1
NIHS Year 5	7	4	0	3
NIHS Year 6	5	5	0	0
Total:	29	17	8	4

IV-2. 研究方法

2.1. データセットの組み合わせ

前プロジェクトで使用した *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た。
- 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た。
- 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た。

これら 3 つの小規模のデータセットと各化合物のすべての活性から得られた併合データセットの作成については、過年度の報告書の中に記載されている。この併合データセットを用いて *in vitro* のアラートのその後の解析が実施された。この併合データセットには 1544 化合物が含まれている。各化合物は以下のような全般的結果のうちの 1 つに割り当てられている。陽性 (484 化合物)、陰性 (977 化合物)、わずかに陽性 (1 化合物)、どちらとも云えない (31 化合物)、不確定 (43 化合物)、データなし (8 化合物) である。

2.2. アラートの候補の特定

前年度の研究の一部として、Derek (Derek for Windows (DfW)、14 版) 内の *in vitro* の染色体異常アラートに対してこれらの併合データを処理し、各アラートの陽性予測度 (PP) の値を算出した。全般的予測結果が「わずかに陽性」、「どちらとも云えない」、「不確定」および「データなし」であった化合物はこの解析から除外した。すべての染色体損傷アラートの PP の計算値の表を付録 I に示す。上述したように、PP が 50% を上回るアラートおよびアクティブ化合物の合計が 3 個以上のアラート、または 20 個を超える化合物がアラートをアクティブにしたケースを、その後の解析の良好な候補として特定した。前プロジェクトの一部として検討したこれらのアラートと、すでに *in vivo* 活性が予測されているアラートを

フィルター処理することによって、3つのアラートが特定されるに至った（表2）。

表2. PP およびアクティブにする化合物の総数に基づき、検討するために選定されたアラート

番号	アラート名	陰性	陽性	系	感度
531	Hydroxylated anthraquinone	2	7	9	78
674	Allylbenzene	1	2	3	67
328	Halogenated methane	3	5	8	63

2.3. in vivo の染色体損傷の予測の開発

特定された3つのアラートの各々の in vivo データを詳細に検討し、可能な場合、元の引用を検索した。併合データセットから得られたデータに加えて、公表されている科学文献からの特別なデータの検索を実施した。In vivo 小核試験と染色体異常試験のデータを収集した。可能であれば、同一化合物の矛盾する結果を試験計画書（例えば、投与量、サンプル採取時点、組織、投与経路など）の相違に基づいて正当であると理由付けた。利用できるすべてのデータを用いて、in vitro のアラートと in vivo 活性との関連性に関する決定を下した。In vitro のアラートが in vivo 活性の予測に役立つと考えられる場合、両者のエンドポイントを予測するためそのアラートを拡張した。新規の推論規則をそのアラートに追加し、裏付けとなるエビデンスの強度に応じて尤度を「可能性が高い」または「どちらとも云えない」のいずれかに設定した。アラート

のコメントを改定し、裏付けとなる参考文献と例証を必要に応じて付け加えた。

IV-3. 結果および考察

表3に示すように、検討した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ち、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（本文書で Derek KB 2014 & NIHS Yr 7_1.0 と命名した）でこの修正されたアラートをインプリメントした。これらの修正されたアラートの各々について、作成された報告の写しを付録IIに示す。

表3. アラートの検討結果

番号	アラート名	結果	ルール	判定
328	Halogenated methane	Alert extended to in vivo	New reasoning rule added	Equivalent
531	Hydroxylated anthraquinones	Alert extended to in vivo	New reasoning rule added	Equivalent

674	Allylbenzene	Comments updated	N/A	N/A
-----	--------------	------------------	-----	-----

3.1. in vivo 染色体損傷アラートの予測性能

修正されたアラートを含む新規の知識ベース (Derek KB 2014 & NIHS Yr 7_1.0) の予測性能を、MMS データセットを用いて評価した (表 5)。比較のため、このデータセットに対する標準的な 2014 年公開の Derek KB の性能も示す (表 4)。

表 4. MMS データセットに対する 2014 年公開の Derek KB の性能

	予測 陽性	予測 陰性
試験 陽性	44	68
試験 陰性	23	105

Sensitivity = $44/112 = 39.3\%$; Specificity = $105/128 = 82.0\%$; Concordance = $(44+105)/241 = 61.8\%$

表 5. MMS データセットに対する Derek KB 2014 & NIHS Yr 7_1.0 の性能

	予測 陽性	予測 陰性
試験 陽性	45	67
試験 陰性	28	102

Sensitivity = $45/112 = 40.2\%$; Specificity = $102/130 = 78.5\%$; Concordance = $(45+102)/242 = 60.7\%$

表 4 および表 5 に示すように、in vivo 活性を予測するために検討した 2 つの in

vitro 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。次に、併合したデータセットを用いて新規の知識ベースの予測性能を評価した (表 7)。比較のため、NIHS の 6 年目の研究を含む標準的な 2012 年公開の Derek KB のこのデータセットに対する性能も示す (表 6)

表 6. 併合したデータセットに対する Derek KB 2012 & Yr 6_1.0 の性能

	予測 陽性	予測 陰性
試験 陽性	141	343
試験 陰性	79	898

Sensitivity = $141/484 = 29.1\%$;
Specificity = $898/977 = 91.9\%$;
Concordance = $(141+898)/1461 = 71.1\%$

表 7. 併合したデータセットに対する Derek KB 2014 & NIHS Yr 7_1.0 の性能

	予測 陽性	予測 陰性
試験 陽性	153	331
試験 陰性	84	893

Sensitivity = $153/484 = 31.6\%$;
Specificity = $893/977 = 91.4\%$;
Concordance = $(153+893)/1461 = 71.6\%$

MMS データセットを用いた場合と同様、in vivo 活性を予測するための 2 つの in vitro アラートの拡張により併合データセットに対する感度が上昇した。MMS データセットの測定基準と比較して、規模がさらに大きいこのデータセットを用いた

ときの感度の上昇がさらに著しく、この作業を実施する前には 29.1%であったものが実施後には 31.6%に上昇した。感度の上昇に伴い、特異性の若干の低下と一致率のわずかな上昇が認められた。

IV-4. 結論

前 NIHS プロジェクトと同様、この研究により Derek 内の *in vivo* 染色体損傷の適用範囲の改善に成功した。しかし、昨年度の報告書で考察したように、得られた感度の増加は以前に得られた増加と比較してわずかであった。これを図 1 および表 8 で例証し、NIHS の 4 年目のプロジェクトの前、および NIHS の 4 年目、5 年目、6 年目のプロジェクトの後に編集した知識ベースについて、併合データセットを用いて測定した感度、特異性および一致率を示す。認められた変化は主として、これらの共同プロジェクトの一部として装着された、修正されたアラートと新規のアラートの結果である。しかし、一部の变化は Derek 知識開発プロジェクトの一部として装着された修正によるものである。

図 1 に示すように、この研究開始以来、2010 年における 4%から今年度のプロジェクト終了時の 32%まで感度の著しい改善が認められている。しかし、各 NIHS プロジェクトの継続に伴い感度の上昇率は低下している。これは、ある程度は各プロジェクトのエンドポイントに関して費やした時間の量のためと思われるが、そのせいとして認められる感度の増加の先細りを適切に説明することはできない。一方、多数の陽性化合物が適用範囲に含

まれる *in vitro* アラートが NIHS の 4 年目および 5 年目のプロジェクトの一部として最初に検討されたという事実から、これが説明されると思われる。これらのアラートの拡張が感度に大きな影響を及ぼした。しかし、まだ検討されていない残りのアラートの多くは陽性予測度が低い（したがって拡張の機会が少ない）か、あるいは比較的少数の陽性化合物によりアクティブにされたかのいずれかであった。結果として、本プロジェクトの一部としての 3 つのアラートの拡張は感度にほとんど影響を及ぼしていない。

これを念頭に置けば、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。実際、未検討のすべての *in vitro* アラートが拡張されたとしても（アラートに関する以前の検討に基づけばこれは考え難いが）、併合データセットに対して得ることができる最も高い感度は（既存の即時プロトタイプアラートの拡張を含めて）43%になると思われる。これが純粋に既存の *in vitro* アラートを改定することによって得られた場合、特異性も著しく低下すると思われる。

このことは、さらに感度の著しい改善を図るためには本研究で利用した方法を用いるよりは、今後の研究で新規の *in vivo* アラートの開発に集中すべきであることを示唆している。これらのアラートは *in vitro* および *in vivo* の染色体損傷の両者または *in vivo* 活性のみを予測する可能性があり、また、現在は適用範囲に入らないデータセット内の残りの 57%の *in vivo* で陽性な化合物を予測する可能性が

ある。これを達成すると、現在 Derek 内の *in vitro* アラートまたは *in vivo* アラートをアクティブにしていない併合データセット内の *in vivo* で陽性な化合物を解析できる可能性がある。併合データセット内の全般的な結果が陽性または陰性の 1461 化合物のうち、1028 化合物が既存の *in vitro* アラートまたは *in vivo* アラートをアクティブにしていない。これらのうちの 256 個が陽性の化合物、718 個が陰性の化合物である。

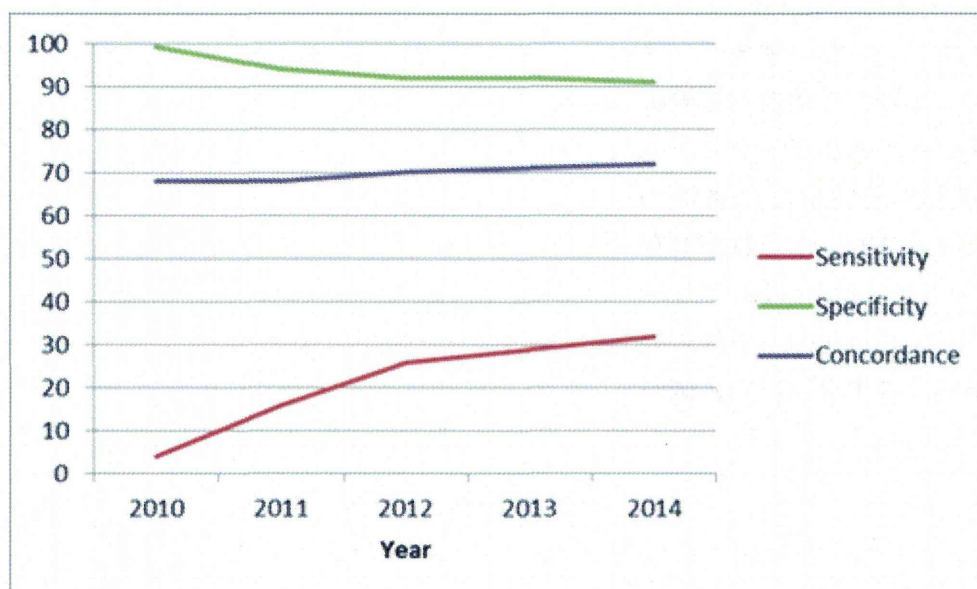


図 1. Derek により得られた併合データセットに対する予測性能

表 8. Derek により得られた併合データセットに対する予測性能

年	知識ベース	感度 (%)	特異性 (%)	一致率 (%)
2010	DfW version 13 (before NIHS Y4)	4	99	68
2011	DfW version 14 (after NIHS Y4)	16	94	68
2012	Derek KB 2012 (after NIHS Y5)	26	92	70
2013	Derek KB 2012 & NIHS Yr 6_1.0 (after NIHS Y6)	29	92	71
2014	Derek KB 2014 & NIHS Yr 7_1.0 (after NIHS Y7)	32	91	72

付録 I.

Positive predictivity values for all chromosome damage alerts in DfW 14 calculated using combined *in vivo* data set

Alert Number	Alert name	Status	Outcome	Likelihood	Project	-ve	+ve	Total	PP
7	N-Nitro or N-nitroso compound	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	Derek 2011	6	12	18	67
19	Epoxide	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	NIH SY5	10	10	20	50
23	vic-Dihalide	No				6	3	9	33
27	Alkylating agent	Investigated	Comments updated. New alert implemented (755)	N/A	NIH SY5	34	27	61	44
28	Mono- or di-alkylhydrazine	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivalent	NIH SY4	2	3	5	60
33	Hydrazine or monoacyl- or monosulphonyl-hydrazine	No				1	1	2	50
39	Arylhydrazine	No				0	0	0	0
51	Azirine or aziridine	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	NIH SY4	0	5	5	100
61	alpha-Halo carbonyl compound	<i>In vivo</i> -ve mentioned in comments				3	1	4	25
69	Nitrogen or sulphur mustard	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	NIH SY4	1	9	10	90
304	Isocyanate or isothiocyanate	No				2	2	4	50
306	Alkyl aldehyde or precursor	Investigated	Comments updated	N/A	Derek 2011	15	13	28	46
308	Alkyl carbamate	<i>In vivo</i> alert			N/A	5	4	9	44
309	alpha,beta-Unsaturated ketone	<i>In vivo</i> -ve mentioned				15	5	20	25

		d in comments							
310	alpha,beta-Unsaturated ester or thioester - class I	Deactivated				n/a	n/a	n/a	n/a
311	alpha,beta-Unsaturated amide or thioamide	No				2	2	4	50
313	alpha,beta-Unsaturated nitrile	No				2		2	0
314	Thiuram disulphide or dithiocarbamate	No				4	1	5	20
323	Aryldialkyltriazene	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	NIH SY5	0	1	1	100
325	Aromatic azoxy compound	No				0	1	1	100
328	Halogenated methane	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal	NIH SY7	3	5	8	63
329	Aromatic nitro compound	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal	Derek 2011	35	17	52	33
332	Aromatic hydroxylamine or ester derivative	No				0	0	0	0
333	Chromium compound	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	Derek 2011	5	8	13	62
334	Alkyl nitrite, nitrous acid or nitrite salt	Investigated	Comments updated	N/A	Derek 2011	1	2	3	67
339	Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	Investigated	Comments updated. New alert implemented (747)	N/A	NIH SY4	1	5	6	83
341	Pyrroline ester, pyrroline N-oxide ester or pyrrole ester	No				1	1	2	50
345	alpha,beta-Unsaturated sulphone	<i>In vivo</i> -ve mentioned in comments				2	0	2	0
349	Glycidyl ether, amine, ester or	<i>In vivo</i> -ve				7	5	12	42

	amide	mentioned in comments							
350	Carbodiimide	<i>In vivo</i> alert			N/A	0	2	2	100
358	Hydroperoxide	Investigated	Comments updated	N/A	Derek 2011	2	1	3	33
361	alpha,beta-Unsaturated ester or thioester	<i>In vivo</i> -ve mentioned in comments				19	7	26	27
362	Vinyl carbamate	<i>In vivo</i> alert			N/A	0	1	1	100
365	Acridine or analogue	Investigated	Comments updated	N/A	Derek 2011	1	1	2	50
470	Phenol	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal	NIH SY4	0	3	3	100
471	Quinolone-3-carboxylic acid or naphthyridine analogue	Investigated	Comments updated	N/A	Derek 2011	3	0	3	0
493	Polynitrophenol or precursor	No				0	0	0	0
494	Halophenol	No				2		2	0
513	Imidazole nucleoside analogue	<i>In vivo</i> alert			N/A	0	1	1	100
515	Flavonoid	No				2	0	2	0
516	Triarylmethane salt	No				4	2	6	33
517	2,4-Diaminopyrimidine or analogue	Investigated	Comments updated	N/A	NIH SY4	1	4	5	80
518	Halogen oxyacid salt	No				4	3	7	43
519	Aminocarbazole analogue	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	NIH SY5	0	3	3	100
521	N-Polyhaloalkylthio compound	Investigated	Comments updated	N/A	Derek 2011	0	1	1	100
522	Psoralen	No				0	2	2	100
523	Alkylphenol	No				14	3	17	18
529	Xanthine	Investigated	Alert	Equivocal	NIH	0	3	3	10

		ted	extended to <i>in vivo</i>	cal	S Y6				0
530	Inorganic arsenic compound	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	NIH S Y5	2	6	8	75
531	Hydroxylated anthraquinone	No	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equival	NIH S Y7	2	7	9	78
532	O-Allyl compound	No				11	3	14	21
533	Di- or tri-phenylethylene	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equival	NIH S Y6	1	3	4	75
575	Isothiazolinone	No				4	0	4	0
576	Thymine, cytosine or derivative	Investigated	Comments updated. New alert implemented (759)	Plausible	NIH S Y5	2	7	9	78
577	Purine base	Investigated	Comments updated. New alert implemented (758)	Plausible	NIH S Y5	5	10	15	67
578	5-Fluoropyrimidine	No				2	2	4	50
579	Bipyridinium compound	No				1	1	2	50
580	Aryl N-alkylcarbamate	No				2	2	4	50
581	Vinca alkaloid	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible	NIH S Y6	0	5	5	100
582	4-Hydroxystilbene	No				1	0	1	0
584	Halovinyl phosphate ester	Investigated	Comments updated	N/A	Derek 2011	1	0	1	0
585	Indole or benzotriazole	No				0	0	0	0
623	Mercury compound	No				1	0	1	0
624	para-Phenylenediamine	No				3	0	3	0
625	Catechol	No				18	2	20	10
626	Aromatic hydrocarbon	No				2	2	4	50
627	Inorganic cadmium compound	Investigated	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equival	NIH S Y4	2	1	3	33
628	Tetrahydroisoquin	No				0	1	1	10

	oline								0
638	Hydroxy-urea, -guanidine or -carbamate	No				0	1	1	10 0
639	Spirocyclopropane	No				0	1	1	10 0
640	Platinum compound	No				0	2	2	10 0
641	Podophyllotoxin or analogue	<i>In vivo</i> +ve mentione d in comment s				0	2	2	10 0
642	Bisdioxopiperazine	<i>In vivo</i> alert			N/A	0	1	1	10 0
643	Inorganic selenium compound	Investiga ted	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivo cal	NIH S Y6	0	3	3	10 0
644	Camptothecin or analogue	<i>In vivo</i> alert			N/A	0	2	2	10 0
657	Taxane derivative	<i>In vivo</i> alert			N/A	0	2	2	10 0
671	Aromatic thioamide	No				0	0	0	0
674	Allylbenzene	No	Comment s updated	N/A	NIH S Y7	1	2	3	67
699	Colchicinoid	<i>In vivo</i> alert			N/A	0	1	1	10 0
700	Diarylalkylamine	<i>In vivo</i> -ve mentione d in comment s				2	0	2	0
701	Benzimidazole derivative	<i>In vivo</i> alert			N/A	1	3	4	75
702	Thiazole nucleoside analogue	No				0	0	0	0
703	Furan	<i>In vivo</i> -ve mentione d in comment s				4	1	5	20
704	5-Azacytidine or analogue	<i>In vivo</i> alert			N/A	0	1	1	10 0
705	Azaphenanthrene	<i>In vivo</i> -ve mentione				1	0	1	0

		d in comment s							
706	Dimethyl phosphorothiolate ester	Investiga ted	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivo cal	NIH S Y6	1	2	3	67
717	alpha,beta-Unsatu rated pyridine, pyrimidine or 1,3,5-triazine	No				0	0	0	0
718	2-Thio-benzimidaz ole or -benzothiazole	<i>In vivo</i> -ve mentione d in comment s				2	0	2	0
747	Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	New alert	Imple nted to extend 339	Plausib le	NIH S Y4	0	4	4	10 0
755	Alkyl sulphate or sulphonate	New alert	Imple nted to extend 027	Plausib le	NIH S Y5				
758	Purine base	New alert	Imple nted to extend 577	Plausib le	NIH S Y5				
759	Thymine or cytosine derivative	New alert	Imple nted to extend 576	Plausib le	NIH S Y5				

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)

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, Terashima Y, Takasawa H, Narumi K, Wako Y, Kawasako 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, 6th ICEM, November. 3-8, 2013.
9. Honma M.: Risk Assessment and Management of Genotoxic impurities in Pharmaceuticals. Iguassu, Brazil, 6th 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

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）

分担研究報告書

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)

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

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
研究分担者 長谷川 隆一 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員
研究協力者 高橋 美加 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
研究協力者 松本 真理子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員
研究協力者 川村 智子 国立医薬品食品衛生研究所 研究員

研究要旨

本研究では肝毒性について、これまでに開発した **Rapid Prototypes** アラートのうち更に調査すべきアラートの優先順位付けを行い、必要に応じて正式な肝毒性アラートとするための検討を行ってきている。本年度は、昨年度検討されなかったアラートに対して、前年度と開発した方法と同様の様式優先順位付けに **Fourches** らのデータセットも加えた。その後、詳細な病理組織学的データや **HESS** データベースならびに公表論文の調査から得られた情報を用いて、選定されたアラートの各々をアクティブにする化合物の活性とその根拠を詳細に検討した。その結果、肝毒性の 3 エンドポイントが改良され、1 アラートが新規にインプリメントされた。さらに、4 つの **Rapid Prototypes** アラートが非アクティブ化され、1 つの **Rapid Prototypes** アラートが修正された。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、昨年比べて予測精度の向上が認められた。今年度は、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、両システムにおける個々の化合物予測結果の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。

A. 研究目的

本研究に先立つ研究において、反復投与毒性試験結果をもとに肝毒性評価のための

Rapid prototype (RP) アラートの構築を進めてきた。本研究班では、これらの **RP** をさらに検討すること、どちらとも云えな

いと推論される RP や Derek 知識ベース内の限られた文献とメカニズム的裏付けの数を減らすこと、また可能性として、裏付けとなる参考資料、例証、メカニズム的な根拠などを有する完全なアラートの数を増加させることである。優先順位付けの後、昨年度のプロジェクトにおいて多数の RP アラートが検討され、必要に応じ完全なアラートが開発された。本年度は、前年度と同様な様式で検討するため、残りの RP アラートに対して優先順位を付けたが、さらにもう 1 つの手順を付け加えた。

RP の優先順位づけの後に各クラスの検討を実施した。活性の理論的根拠が見出され、選択的トキシコフォアが確認された場合は新規の肝毒性アラートを作成した。RP により記述される化学的クラスと既存のアラートとの間に裏付けとなるデータがある場合はアラートの修正を検討した。

また、今年度は肝毒性データを用いて、統計的モデリング・ソフトウェア Sarah によるモデル作成を試みた。作成したモデルの予測度に対するモデル構築に使用した変数の影響に関して、これらの変数の変化を調査した。

B. 研究方法

データセット

昨年度と同様の反復投与毒性試験結果データのうち、より詳細な病理組織学データを含む 197 化合物のデータセットを使用した。

RP の優先順位付け

RP の優先順位付けに関しては、当該アラートの裏付けとなる反復投与毒性試験結果データセットから得られた化合物と当該

アラートをアクティブにする肝毒性データを含む Vitic から得られた化合物の数を考慮に入れた。もう 1 つの手段として、公表されている毒性データと各クラスのメカニズムデータを評価した。これに基づき、RP アラートの最終的優先順位付けの一覧表を作成した。

以下の因子の数を考慮に入れてそのスコアを割当てた後に、得られた各 RP のスコアに基づいて RP アラートの優先順位付けを行った。1) 反復投与毒性試験結果データ (N)、Vitic 肝毒性データセット (V) および Fourches データセット (F) [Fourches et al., 2010(951 化合物のヒトおよび動物の肝毒性(陽性)データを含む。)] から得られた当該アラートをアクティブにする陽性化合物の総数、2) 各データセットに対する当該アラートの陽性予測度 (PP) (当該アラートをアクティブにする真の陽性と偽陽性の数に基づく)。RP の優先順位付けのスコアは、この情報および次式を用いて得られた。

$$\text{Data Prioritisation} = ((\text{No. Pos. N}) + (\text{No. Pos. V}) + (\text{No. Pos. F})) * ((\text{PP N}) + (\text{PP V}))/2 / 100$$

上記の手順はデータの利用可能性と各 RP の性能を正確に反映していると考えられたが、しかし、RP から完全なアラートを開発するうえで重要なもう 1 つの因子によって当該アラートのメカニズム的根拠が確立されている。そのため、上記の方法により優先順位付けされた上位 10 個のアラートについての利用できる文献の簡易調査に着手した。次にこれらのアラートをこのような解析に基づいてさらに優先順位付けした。

肝毒性アラートの開発

優先順位付けの後、優先度リスト上の優先度が最も高い RP から検討を開始した。さらに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も解析した。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 によるモデル構築

Sarah の プロトタイプ版 (SARAH_05_09_13_NL) 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。

C. 研究結果

5 つの 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 (表 1)。

表 1 知識ベースの変更の要約

Alert number	Alert name old	Alert name new	KB changes
547	2,4-Dihalophenethyl-1-imidazole or analogue	Phenylalkyltriazole or analogue	Alert modified
669	Allyl alcohol, acrolein or derivative	O-Allyl compound or acrolein	Alert modified
691	Phenyl or thiadiazole sulphonamide	Aromatic sulphonamide or analogue	Alert modified
802	-	2-Halopyridine	New alert implemented
RP001	alpha-Chloro-N-heteroaromatic compound	No change	Enabled (exclusion pattern, new alert 2-halopyridines implemented)
RP002	Aliphatic nitrile	-	RP deactivated (acute toxicity alert)
RP010	Aromatic sulphonamide	-	RP deactivated, modified alert 691
RP014	O-Allyl compound	-	RP deactivated, modified alert 669
RP026	1,2,4-Triazole-1-ethanol or derivative	-	RP deactivated, modified alert 547

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。

表 2. 反復投与毒性試験データセット内の化学物質に対する肝毒性エンドポイントを予測する Derek KB 2012 & NIHS Yr 6 1.0 の性能 (新規の知識をインプリメントする前)

Derek Nexus \ Experimental	+ve	-ve	Total
	+ve	238	308
-ve	226	691	917

Sensitivity = 238/546 = 43.6%;

Specificity = 692/917 = 75.4%;

Concordance

= (238+691)/(546+917) = 63.5%

B-accuracy = (43.6+75.4)/2 = 59.5%

表 3. 反復投与毒性試験データセット内の化学物質に対する肝毒性エンドポイントを予測する新規知識ベース Derek KB 2014 & NIHS Yr 7 1.0 の性能 (新規の知識をインプリメント後)

Derek Nexus \ Experimental	+ve	-ve	Total
	+ve	248	298
-ve	225	692	917

Sensitivity = 248/546 = 45.4%;

Specificity = 692/917 = 75.5%;

Concordance

= (248+692)/(546+917) = 64.3%

B-accuracy = (45.4+75.5)/2 = 60.5%

本研究における検討により変更された各 RPs の調査結果の詳細について以下に示す。
RP001:“alpha-Chloro-N-heteroaromatic

compound”

優先順位付けにおいて特定されたように、これらの化合物は細胞内タンパク質の求核基と反応することができる求電子種の N-酸化を介して肝毒性を誘発する可能性がある。公表論文にヒトにおける肝毒性のデータは認められないが、動物で肝損傷を示すいくつかの報告がある。例えば、2-クロロピリジン [Gehring et al] および 2-クロロ-5-トリクロロメチルピリジン [著者不明] の蒸気の吸入投与により、齧歯類で小葉中心性壊死を含む様々な病理組織学的損傷が引き起こされた。肝毒性の原因となる潜在的メカニズムは、求核性芳香族置換反応において求核基と反応するこれらの求電子化合物の能力と結び付けて考えることができると思われる。[Clayden et al] いくつかの 2-クロロピリジンがグルタチオンを枯渇させ [Ionoue et al]、酸化的ストレスに対する細胞の防御に影響を及ぼすことが示されている (図 1)。

他のハロゲン化ピリジンも求電子的であり、また 2-クロロピリジンと同様に細胞内タンパク質と共有結合付加体を形成することができると考えられたので、我々の検討の結果として、2-ハロピリジンの肝毒性を記述するアラートがインプリメントされた。このアラートの範囲に関して行われた近似を考慮に入れて、メカニズム的データを含め肝毒性データは少ないものの一貫性があることから、推論レベルを「どちらとも云えない」に設定した。対応する RP アラートを修正し、2-ハロピリジンの肝毒性アラートの適用範囲に含まれる化合物のサブセットを除外した。この修正によって反復投与毒性試験データセットに対する RP アラ