

毒学会総会（2014年7月25-26日、板橋、東京）

13. Morita, T, Kasuga, F.: Comparison of GHS classification of CMR substances in EU and Japan, 2014 EuroTox, The 50th Congress of the European Societies of Toxicology (September 7-10, 2014, Edinburgh)
14. Hamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada S, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Sui H, Shimada Y, 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, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus Assay Using Young Adult Rats (IV): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS., Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS), 45th Annual Meeting 2014: Hilton Orlando Lake Buena Vista, Orlando, Florida September 13-17, 2014.
15. 森田健、小宮佐知子：EU、ドイツおよび日本における生殖細胞変異原の分類比較、日本環境変異原学会第43回大会、2014年12月4-5日、東京

知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 26 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）

分担研究課題：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  
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 (RP) 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た。昨年度までは、病理組織学的データや公知のデータセット、公表論文の調査結果から優先選定を行い、各アラートの活性とその根拠を詳細に検討してきたが、今年度は、残された 21 種の RP のすべてについて専門家による簡易評価を行った。その結果、フルアラートへの変更の可能性の高い 2 アラートをフルアラートとして作成した。一方、8 つの RP は活性の理論的根拠を確立することができないか、同定された toxicophore と活性とに関連性がないと判断されこれらのアラートを無効化した。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、肝毒性の予測において感度 39.5%、特異性は 77.9%となった。昨年と比べて感度が落ちているが、特異性は向上しており、根拠の低いアラートを無効とした結果であると考えられた。本年度の検討により、既存の構造アラートを効果的に利用して関連する毒性メカニズムに基づいた新たなエンドポイントに関するアラートの構築を迅速化できることが実証された。また、RP を正確に優先順位付けすることがフルアラート構築の効果的な出発点となることが示された。

#### A. 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。前年度までの研究においては、病理組織学的データや公知のデータセット、公表論文の調査結果から優先選定を行い、各アラートの活性とその根拠を詳細に検討し、適切であると判断された場合にはフルアラートへと変更した。ただし、この方法はフルアラートに変更できる可能性のある RP アラートを特定するために有用であることが証明されたが、優先順位の低いアラートも含めてすべての RP アラートを検証するには時間のかかることが想定された。そこで、今年度は、残りの肝毒性に関する 21 種の RP アラートのすべてについて簡易評価を行い、検討すべき RP アラートの分類を行うこととした。

## B. 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 の優先順位付けには、昨年度と同様に、データセットに含まれているアラートの裏付けとなる化合物数および Vitic に収録されているアラートをアクティブ化する肝毒性データを含む化合物数を考慮した。追加的な手順として、残されている RP のそれぞれについて簡易評価を行った。この分析には、残されている 22 種の RP アラートの各クラスに関する公開毒性データおよびメカニズムデータの解釈を含めた。これ

をもとに RP アラートの最終的なスプレッドシートを作成し、検討結果に基づいて各 RP アラートを以下のように分類した。

クラス 1 – フルアラート構築の可能性のあるアラート

クラス 2 – 保留 (有効な toxicophore、フルアラート構築に利用できる公開データはあるが不十分、またはメカニズムに基づいた根拠が不十分) するアラート

クラス 3 – 無効化すべきアラート (公開文献中にデータなし、および/または活性に当該 toxicophore との関連なし)

### 肝毒性アラートの開発

上記 RP アラートの分類後、まず、フルアラートへの変更に適していると考えられるクラス 1 のアラートから検討を始め、NIHS より入手した肝毒性の詳細データを分析した。続いて、原型となる RP アラート作成の根拠となった化合物に関する肝毒性データを ChemIDPlus、PubMed および Google を用いて検索した。ChemIDPlus ではサブストラクチャーによる検索で見つかった化合物に関する肝毒性データを収集した。さらに、公開データセットである Liver Toxicity Knowledge base (FDA)、Fourches のデータセット (Fourches et al.) および NITE が作成した HESS DB でも毒性データを検索した。

## C. 結果

簡易評価によるクラス分類の結果、クラス 1 には 9 アラート、クラス 2 は 5 アラート、クラス 3 には 8 アラートに分類することができた。

今年度は、クラス 1 のうち 2 つのアラート（「2-アミノピリミジン」、「スチレンまたはその誘導体」）についてフルアラートへの変更を行うことができた。さらに、フルアラートに変更することができないと思われるクラス 3 の 8 種の RP すべてを無効化することができた。以下にこれらの解析の概要を記す。

#### 新たなフルアラート

##### RP008 「2-アミノピリミジン」

この RP はデータセット内の 2 種の陽性化合物を捕捉したものであり、陽性予測率は 50% である。また、Vitic 内の陽性化合物 1 種および Fourches のデータセット内の陽性化合物 4 種が、このアラートをアクティブ化した。公開されている毒性データの綿密な分析においては、RP アラートの対象となる化合物に起因する肝毒性には異なるメカニズムが関与している可能性が示された。図 1 に示すように、トリメトプリムが代謝活性化を受けると、ピリミジンパライミノキノンメチドが生成される可能性がある。分離した肝ミクロソーム中でトリメトプリムをインキュベートした場合に、これがタンパク質付加体を形成することが明らかにされている (Lai et al)。

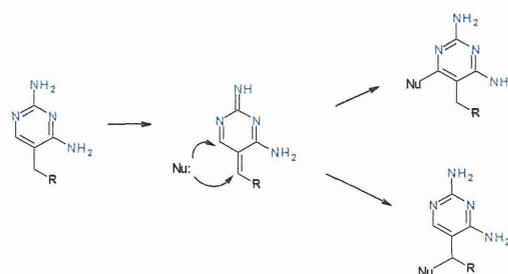


図 1. Mechanism of bioactivation of trimethoprim (adopted from Damsten et al) .

イサキシニンの場合も、ミクロソームタンパク質付加体の形成が認められていることから、代謝過程で共有結合付加体を形成し得る反応種が生成されることが示唆された (Letteron et al, Martinat et al)。このとき形成される付加体の正確な構造は同定されていないが、イサキシニンの主要な代謝物は 5-ヒドロキシイサキシニン (5-hydroxyisaxonine) であることから、この化合物に起因する肝障害には 4,5-エポキシド (図 2) が関与していることが示唆される (Martinat et al)。

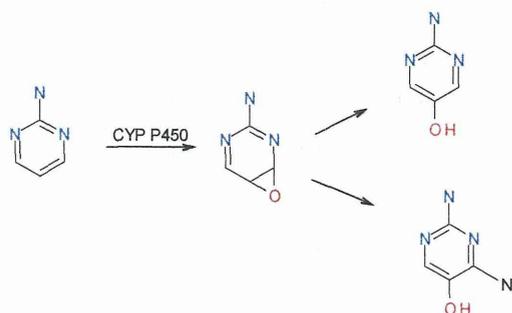


図 2 . Activation of isaxonine

イサキシニンに起因する肝障害の症例報告は多数発表されており、肝毒性は広範な肝細胞壊死および肝機能酵素の顕著な上昇として現れることが示されている (Baud et al., Alcabes et al., Zarski et al., Espinoza et al., Mallet et al.)。特異体質性の免疫応答がイサキシニンによる肝毒性のメカニズ

ムであることが示唆されているが、肝障害は1日用量750 mg~2.25 gにて治療を受けた患者で観察されている点に注意が必要である (Baud et al., Alcabes et al., Zarski et al., Espinoza et al., Mallet et al.)。

本検討の結果として、2-アミノピリミジンの肝毒性を記述した新たなフルアラートが追加された (これに伴い、対応する RP アラートを無効化)。イサキソニン (図2) は肝毒性に関するエビデンスが最も多い化合物クラスであることから、このアラートの適用範囲はイサキソニンによる毒性に関与するメカニズムに基づいて定義した。トリメトプリム (図1) の生体内活性化によっても肝毒性が生じるが、このメカニズムはNIHSの陽性化合物には該当しないと考えられるため、本共同研究プロジェクトではこのクラスを検討対象にしないこととする。この新たなアラートが対象とする主な部分構造は、1) 無置換のピリミジン環5位、および2) 環外窒素上に少なくとも1個以上の水素をもつことである。このアラートの適用範囲を定義するメカニズムに基づいた根拠は単一の化合物 (イサキソニン) の代謝データのみを基にしたものであり、データセット中の陽性化合物を含めるためにはさらに推量が必要であることから、このアラートの推論レベルは「不確か」とした。この変更により、この新たなアラートではNIHS データセットに対する陽性予測率がRP アラートに比べて向上した。

#### **RP024 「スチレンまたはその誘導体」**

この RP アラートの NIHS データセットに対する陽性予測率は、80%と極めて高い。

このクラスに関して公開されている肝毒性データを検索した結果、スチレンは生体内活性化によりスチレン-7,8-オキシドを生成することが確認された (Sumner and Fennell)。この反応種は、細胞高分子と反応して付加体を形成することが明らかにされている (Yuan et al.)。このアラートの適用範囲も、他の共役アルケン、1,3-ブタジエンおよびその類似体を含めるよう拡張した。この拡張は、それぞれエポキシブテン (Kirman et al.)、(1-クロロエチル) オキシラン (Munter et al.) およびイソプレンオキシド/2-イソプロペニルオキシラン (Hurst) に変換されることが明らかにされている。1,3-ブタジエン、クロロブレンおよびイソプレンが同様の代謝活性を示すことに基づいたものである。スチレンおよび1,3-ブタジエンの生体内活性化を図3に示す。

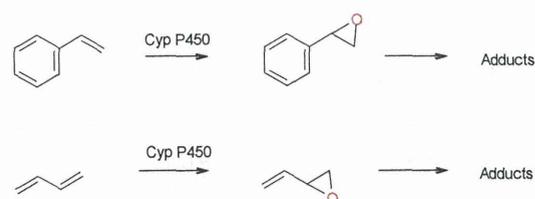


図3. Metabolic activation of styrene and 1,3-butadiene.

実験動物 (ラットおよびマウス) において、数多くの共役アルケンが出血性小葉中心性肝細胞壊死および肝酵素の上昇を引き起こす (Vainio et al., Morgan et al 1993, NTP 1984, NTP 1998)。また、ヒトにおいては、スチレンへの職業暴露により肝機能酵素に変化が生じることが複数の研究で報告されている (Harkonen et al.)。動物種間で、求電子性エポキシドへの活性化の速度および解毒作用に有意差が認められて

いる (Cruzan et al.)。

このアラートに必須の主な部分構造の基本となるのはエポキシ化部位であり、1) 無置換の末端炭素、および 2) 2 番目のアリル炭素のみに限定された置換を含む。ハロゲンで置換された化合物の生体内活性化はスチレンと同様であることが示されていることから (Chung et al.)、このアラートでは原型となる RP アラートと異なり、スチレンのベンゼン環上の置換にハロゲン (F、Cl、Br) を含めるよう拡張されている。新規のフルアラート 819 では化学的空間の適用範囲を拡大したため、原型である RP アラート 024 に比べて陽性予測率が低下した。また、このアラートは NIHS データセット中の 1 種の陰性化合物によってもアクティブ化されたが、真の陽性化合物が陰性とみなされることはなかった。

#### 無効化した RP アラート

##### RP003 : ヒダントインまたはその誘導体

データセットにおける陽性予測率が 50% である。フェニルヒダントインの肝毒性に対するアラートはあるが、このアラートが対象とする部分構造はフェニル環 (アレノキシドの生成を介して生体内活性化に関与すると考えられる) の存在のみである。フェニル環をもたない化合物の肝毒性のメカニズムは同定できなかった。データセットの陽性化合物数が少ないこと、公開されている肝毒性データの不足、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

##### RP004 : チオテトラゾールまたはその誘導体

データセットにおける陽性予測率が 25%

である。データセット中に陽性化合物は 1 種のみ。陽性化合物と構造的に類似する陰性化合物が 1 種みられる。公開データセット (Fourches および Vitic) 中でこの RP アラートをアクティブ化した陽性化合物はチオテトラゾール部分を有する  $\beta$ -ラクタム系抗生物質であり、これらの陽性化合物の肝毒性は  $\beta$ -ラクタム環によるものであることが示唆される。陽性予測率が低いこと、データセットの陽性化合物数が少ないこと、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

##### RP006 : チアゾリジノンまたはその誘導体

データセット中 1 種の化合物のみがこのアラートをアクティブ化。公開文献中に、類似化合物に関する肝毒性データなし。データセットの陽性化合物数が少ないこと、公開されている肝毒性データの不足、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

##### RP009 : 硫化ジフェニル、スルホキシドまたはスルホン

データセットにおける陽性予測率が 57% である。この toxicophore の肝毒性メカニズムは不明。明確なメカニズムは同定できなかったが、いくつかの陽性化合物は、活性に関与する可能性のある他の官能基を有している。公開されている肝毒性データの不足、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

##### RP018 : ピロリジンまたはその誘導体

データセットにおける陽性予測率が 57% である。公開データセット (Fourches および Vitic) 中でこの RP アラートをアクティブ化する陽性化合物は、「N-アシルピロリジ

ン、ピペリジンおよび類似体」に対する肝毒性アラート 614 もアクティブ化する。その他の陽性化合物については、肝毒性のメカニズムは不明である。メカニズムデータの不足により、この RP アラートを無効化した。

**RP022 : フルオロキノロン-3-カルボン酸**

データ中 1 種の化合物のみがこのアラートをアクティブ化。この化合物は、肝毒性アラート 471 「キノロン-3-カルボン酸およびナフチリジン類似体」もアクティブ化する。このような化合物による肝障害は既存の知識ベースにおいてカバーされているため、この RP アラートを無効化した。

**RP028 : 第三級アルコールまたはエーテル**

データセットにおける陽性予測率が 57.9%である。毒性データに一貫性なし。Vitic および データセットの双方で単純な例証化合物 (t-ブタノールなど) が不活性である。このクラスではメカニズムが不明。肝障害に関与する可能性がある他の官能基をもつ化合物が含まれる。公開されている肝毒性データの不足、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

**RP031 : O-tert-ブチルエステルまたはカルバメート**

データセットにおける陽性予測率は 100%であり、データセット化合物 5 種がこのアラートをアクティブ化するが、このうち 2 種は「カルバメート」に対する既存の肝毒性アラート 692 もアクティブ化する。この化合物によって引き起こされる肝障害に「O-tert-ブチルエステル (O-Tertiary butyl ester) またはカルバメート」部分が

関与していることを示すメカニズムに基づいたエビデンスはない。メカニズムデータの不足により、この RP アラートを無効化した。

以上、10 種の RP アラートを検討した結果、2 種の新規アラートを実行し、10 種の RP アラートを無効化した結果、データセットにおける Derek の肝毒性エンドポイント予測性能の変化を表 1 に示す。

表 1. 予測性能比較

	Hepatotoxicity		
	感度%	特異性%	一致率%
昨年度	45.4	75.5	64.3
今年度	39.5	77.9	63.6

<参考文献>

- Alcibes G, Vankeerberghen L, Opolon P, Hecketsweiler P and Levy VG. Fatal hepatitis caused by isaxonine. Presse Medicale, 1983, 12, 2696-2697, pmid: 6228823.
- Baud F, Bernuau J, Benmami N, Pariente EA, Bouygues M, Guillan J, Roche-Sicot J, Degott C, Rueff B, Pessayre D and Benhamou JP. Acute hepatitis caused by isaxonine phosphate ( Nerfactor ) . Gastroenterologie Clinique et Biologique, 1983, 7, 352-354, pmid: 6307799.
- Cruzan G, Cushman JR, Andrews LS, Granville GC, Miller RR, Hardy CJ, Coombs DW and Mullins PA. Subchronic inhalation studies of styrene in CD rats and CD-1 mice.

- Fundamental and Applied Toxicology, 1997, 35, 152-165, doi: 10.1006/faat.1996.2273.
- Chung JK, Shen S, Jiang Z, Yuan W and Zheng J. Structure-toxicity relationship study of para-halogenated styrene analogues in CYP2E1 transgenic cells. *Toxicology Letters*, 2012, 210, 353-359, doi: 10.1016/j.toxlet.2012.02.008.
- Damsten MC1, de Vlieger JS, Niessen WM, Irth H, Vermeulen NP and Commandeur JN. Trimethoprim: novel reactive intermediates and bioactivation pathways by cytochrome p450s. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21, 2181-2187, doi: 10.1021/tx8002593.
- Espinoza P, Pelletier G, Attali P, Sinico M and Ladouch A. Acute hepatitis caused by isaxonine phosphate. 2 cases. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1983, 7, 936-937, pmid: 6689158.
- Fourches D, Barnes JC, Day NC, Bradley P, Reed JZ and Tropsha A. Cheminformatics analysis of assertions mined from literature that describe drug-induced liver injury in different species. *Chemical Research in Toxicology*, 2010, 23, 171-83, doi: 10.1021/tx900326k.
- Hurst HE. Toxicology of 1,3-butadiene, chloroprene, and isoprene. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 189, 131-179, doi: 10.1007/978-0-387-35368-5\_6.
- Kirman CR, Albertini RJ, Sweeney LM and Gargas ML. 1,3-Butadiene: I. Review of metabolism and the implications to human health risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 2010, 40 (Suppl 1), 1-11, doi: 10.3109/10408444.2010.507181.
- Lai WG, Zahid N and Utrecht JP. Metabolism of trimethoprim to a reactive iminoquinone methide by activated human neutrophils and hepatic microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999, 291 (1), 292-299, pmid: 10490916.
- Letteron P, Fouin-Fortunet H, Tinel M, Danan G, Belghiti J and Pessayre D. Mechanism for isaxonine hepatitis. I. Metabolic activation by mouse and human cytochrome P-450. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1984, 229 (3), 845-850, pmid: 6547179.
- Mallet L, Priollet P, Renaudin JM, Petite JP, Vayssairat M and Camilleri JP. Hepatotoxicity caused by isaxonine phosphate. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1983, 7, 429-430, pmid: 6307801.
- Martinat C, Amar C, Dansette PM,

- Leclaire J, Lopez-Garcia P, Cao TD, N'Guyen HN and Mansuy D. *In vitro* metabolism of isaxonine phosphate: formation of two metabolites, 5-hydroxyisaxonine and 2-aminopyrimidine, and covalent binding to microsomal proteins. *European Journal of Pharmacology*, 1992, 228 (1), 63-71, doi: 10.1016/0926-6917 (92) 90013-3.
- Munter T, Cottrell L, Ghai R, Golding BT and Watson WP. The metabolism and molecular toxicology of chloroprene. *Chemico-Biological Interactions*, 2007, 166, 323-331, doi: 10.1016/j.cbi.2006.05.017.
- National Toxicology Program (NTP) . Toxicology and carcinogenesis studies of chloroprene (CAS No. 126-99-8) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies) . National Toxicology Program Report, 1998, available at "http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt\_rpts/tr467.pdf".
- National Toxicology Program (NTP) . Toxicology and carcinogenesis studies of 1,3-butadiene (CAS No. 106-99-0) in B6C3F1 mice (inhalation studies) . National Toxicology Program Report, 1984, available at "http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt\_rpts/tr288.pdf".
- Sumner SJ and Fennell TR. Review of the metabolic fate of styrene. *Critical Reviews in Toxicology*, 1994, 24 ( Suppl 1 ) , 11-33, doi: 10.3109/10408449409020138.
- Yuan W, Jin H, Chung JK and Zheng J. Evidence for cellular protein covalent binding derived from styrene metabolite. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 186, 323-330, doi: 10.1016/j.cbi.2010.05.004.
- Zarski JP, Dentant L, Grauer JL, Piton JL, Cabanel G and Rachail M. Acute hepatitis caused by isaxonine: a case report with reintroduction. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1983, 7, 430, pmid: 6688231.

#### D. 考察

前年度までの検討ではデータセットに対する Derek の知識ベースの感度は上昇または変化なしであったのに対し、今年度の更新後、予測の感度および一致度が低下した。一見これらの予測精度の低下は望ましくない傾向であると思われたが、今年度は、公開文献から得られる利用可能な肝毒性データおよびメカニズムデータが限られているために多くの RP アラートを無効化したことを考慮すると、それほど不良な結果であるとは考えられない。例示化合物またはメカニズムが明らかにされていない等の裏付け情報のないアラートは、対象としている化合物と毒性の関連性が評価できないことから、あまり有用ではないと考えられる。

このため、フルアラートに変更することができない RP アラートを無効化することとは今年度の成果の一部であると考えられる。このようなアラートは、多くの場合、同定された官能基は偶然一致した可能性があり、活性への関与を示すものではないかもしれない。したがって、このような RP は、トレーニングデータセットがカバーしている化学的ドメインの外では良好に機能しないと考えられる。

今後の研究課題において、既存の Derek 知識ベースのみならず、より幅広い文献から得た知識情報も用いて、肝毒性のエンドポイントに対するこのようなモデルを作成する。最初に作成するモデルは、肝毒性のエンドポイントの詳細な予測ではなく、この毒性を生じる可能性のある官能基を当該化合物が有するか否かの警告を与えるに留まる可能性がある（したがって、特異度が低下するかわりに感度が非常に高くなると考えられる）。しかし、このような高感度の粗雑なモデルを構築することができれば、別のモデルを用い、*in vivo*での活性を減弱させる可能性がある物理化学的特性に基づいたフィルタリングを行うことにより、将来的には特異度を改善することができるであろう。*in vitro*染色体損傷のエンドポイントについては、比較的良好に機能するモデルおよびこれに用いるために開発された複数の MIE モデルが既に構築されている他、Lhasa でもこのような研究の基盤ともなる別の共同プロジェクトが既に進行中であり、今後の肝毒性モデルの構築時に役立つと考えられる。

## E. 結論

本研究では肝毒性について、これまでに開発した RP 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。今年度は、未解析 22 種の RP アラートのすべてについて専門家による簡易評価を行った。その結果、フルアラートへの変更の可能性の高い 2 アラートをフルアラートとして作成した一方、8 つの RP は活性の理論的根拠を確立することができないか、同定された *toxicophore* と活性とに関連性がないと判断してアラートを無効化した。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、肝毒性の予測において感度 39.5%、特異性は 77.9%となった。昨年と比べて感度が落ちているが、特異性は向上しており、根拠の低いアラートを無効とした結果であると考えられた。本年度の検討により、既存の構造アラートを効果的に利用して関連する毒性メカニズムに基づいた新たなエンドポイントに関するアラートの構築を迅速化できることが実証された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ema, M., Endoh, K., Fukushima, R., Fujii, S., Hara, H., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Hojo, H., Horimoto, M., Hoshino, N., Hosokawa, Y., Imai, Y., Inada, H., Inawaka, K., Itoh, K., Katsumata, Y., Izumi, H., Kato, H.,

- Maeda, M., Matsumoto, K., Matsuo, S., Matsuoka, T., Matsuura, I., Mineshima, H., Miwa, Y., Nakano, N., Naya, M., Noyori, H., Ohta, T., Oku, H., Ono, A., Shimizu, T., Shimomura, K., Takakura, I., Tanaka, R., Tateishi, T., Tominaga, Y., Uesugi, T., Urakawa, C., Yabe, K., Yamashita, A., Yamauchi, T. and Yokoi, R., Historical control data on developmental toxicity studies in rodents. *Congenit. Anom. (Kyoto)* . 54, 150-161, 2014.
- 2) Kato, H., Fujii, S., Takahashi, M., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. and Hirose, A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluorododecanoic acid in rats. *Environ Toxicol* doi: 10.1002/tox.21996. [Epub ahead of print]
- 3) Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K. and Hirose, A., Evaluation of *in vivo* mutagenicity of hydroquinone in Muta™mice. *Mutat Res*, 775-776, 94-98, 2014.
- 4) Yamada T, Tanaka Y, Hasegawa R, Sakuratani Y, Yamazoe Y, Ono A, Hirose A, Hayashi M. Development of a category approach to predict the testicular toxicity of chemical substances structurally related to ethylene glycol methyl ether. *Regul Toxicol Pharmacol.* 70, 711-719, 2014.
- 5) 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, OECD 化学物質対策の動向 (第 24 報) - 第 3 回 OECD 化学物質共同評価会議 (2012 年ルツェルン), 化学生物総合管理, 10, 25-36, 2014.
- 6) 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, 小林克己, 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 25 報) - 第 4、5 回 OECD 化学物質共同評価会議 (2013 年パリ、ワシントン DC), 化学生物総合管理, 10, 46-57, 2014.
- 7) 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, OECD 化学物質共同評価プログラム: 第 5 回化学物質共同評価会議概要, 化学生物総合管理, 10, 37-45, 2014.

## 2.学会発表

- 1) Hirose, A. Fujii, S., Suzuki, T., Kato, H., Kawamura, T., Takahashi, M., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Nishimaki-Mogami, T.,

- Nishimura, T. and Ema, M.  
Combined repeated dose toxicity studies with the reproduction/developmental toxicity screening tests for long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国, エジンバラ)
- 2) Hirose, A., Kosugi, Y., Suzuki, T., Fujii, S., Kato, H., Takahashi, M., Kawamura, T., Matsumoto, M., Ono, A. and Hirata-Koizumi, M. Chain length-dependent difference in the toxic potency of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) in rats: Determination of the serum pfca concentrations. DIOXIN2014 (2014.8, スペイン, マドリッド)
- 3) Hirose, A., Kosugi, Y., Suzuki, T., Fujii, S., Ema, M., Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. Analysis of the serum perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) levels for repeated-dose toxicity studies conducted for long-chain PFCAs in rats, 第54回米国トキシコロジー学会 (2015.3) (San Diego, California, USA)
- 4) Ono, A., Kobayashi K., Matsumoto, M., Ema, M., Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A. Initial risk assessment of  $\beta$ -bromostyrene, 第54回米国トキシコロジー学会 (2015.3) (San Diego, California, USA)
- 5) Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamazoe, Y., Ono, A., Hirose, A. and Hayashi, M. Hazard evaluation support system (Hess): Category approach to screen chemicals which are metabolized to methoxy- or ethoxyacetic acid responsible for testicular toxicity. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国, エジンバラ)
- 6) 広瀬 明彦, 藤井 咲子, 鈴木 俊也, 加藤 日奈, 川村 智子, 松本 真理子, 高橋 美加, 平田 睦子, 西村 哲治, 江馬 眞, 小野 敦 : パーフルオロアルキル (C14, C16) カルボン酸の反復投与および生殖・発生毒性. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- 7) 山田 隆志, 長谷川 隆一, 三浦 稔, 櫻谷 祐企, 山添 康, 小野 敦, 広瀬 明彦, 林 真 : 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) - 精巣毒性に係わるアルコキシ酢酸を生成する化学物質のスクリーニング. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: 該当なし
2. 実用新案登録: 該当なし
3. その他: 該当なし

平成 26 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）

分担研究課題：構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究

研究分担者 小野 敦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官  
研究協力者 スイロイ ホセ (株)富士通九州システムエンジニアリング

### 研究要旨

本研究では、化学構造を指標にした *in vivo* 反復毒性評価手法について検討するため、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、特定の化学構造にひもづけられる毒性変化の解析、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。本年度は、毒性フェノタイプからの評価モデル構築の検討として、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、毒性試験における病理変化とあわせて血液化学及び血液生化学的变化のクラスタリング解析を行い、得られたクラスターのうち毒性学的に意味のあるパラメータセットの変動を示すエンドポイントクラスター化学物質群について共通部分構造の抽出を行い、科学的に妥当と考えられるに共通部分構造の抽出に成功した。しかし、構造記述子をパラメータとして構築した判別モデルでは、外部評価セットにおける一致率は、50% 台に留まった。一方、無毒性量の評価アプローチの検討においては、評価対象を特定の部分構造を有する化学物質群に限定することで精度の高い予測式の構築が可能であることが示唆された。さらに、化学構造全体の類似度と無毒性量との関係を解析した結果、類似度 70% 以上の化学物質について無毒性量が得られていれば無毒性量の評価がある程度可能であることが示され、結果をもとに類似度からの無毒性量の予測信頼限界を示す関係式が導出出来る可能性が示された。

#### A. 研究目的

現在、世の中には数万種に及ぶ既存化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、それら化学物質のリスク管理は、世界的な課題となっている。さらに、我が国の化学物質審査規制法では、良分解性物質や

10t 未満の物質（低生産量物質）については、ヒト健康影響に関するスクリーニング毒性試験の実施は不要とされているが、そうした物質であってもヒト健康リスクを把握し適切な管理を行うことが望まれる。

化学物質のヒト健康影響評価は、従来、

動物を用いた安全性試験により行われているが、評価の効率化や動物愛護の観点から、動物試験の削減が求められている。そうした背景から、特に構造が類似する化学物質群については、既に安全性評価が実施済みの、構造類似物質の評価結果をもとに類推評価するカテゴリーアプローチによる評価が検討されており、既に一部、実用化されている。しかし、カテゴリーアプローチによる化学物質の類似性評価には、合意された客観的な手法が存在するわけではなく、評価を行うエキスパートによりケースバイケースで妥当性が判断されるのが実情である。

本研究は、特に *in vivo* 反復投与毒性の評価における化学構造からの *in silico* 評価の実用化に向けて、有用性が期待される幾つかのアプローチによる評価モデル構築を行い、信頼性や適用範囲等についての検証を行い、化学物質の規制管理における実用的な利用法を検討することを目的としている。

本年度は、毒性フェノタイプからの評価モデル構築の検討として、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、毒性試験で認められた血液化学及び血液生化学的変化についての部分構造及び記述子からの特徴抽出及び判別モデル構築を試みた。一方、無毒性量の評価アプローチの検討においては、化学構造類似度と無毒性量との関係の解析及び評価対象構造を限定した評価予測性の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. *In vivo* 反復毒性試験における血液化学及び血液生化学的変化をフェノタイプとする構造活性相関モデル構築の検討

#### 1. 1 *In vivo* 反復毒性試験における血液化学及び血液生化学的変化のクラスタリング

*In vivo* 反復毒性試験における重要な毒性評価エンドポイントの一つである血液化学検査及び血液生化学的検査の変動を評価対象とした、化学構造からの予測モデル構築について検討を行うため、まず初めにこれまでの研究で整理した既存化学物質点検による試験結果データベースを用いて血液化学及び血液生化学的変化が有意に認められた用量分布についてパラメータごとに解析を行った。次に血液化学及び血液生化学的変化が有意に認められた最低用量及び病理変化が認められた最低用量をパラメータとしてフェノタイプ及び化学物質のクラスタリング解析を行った。クラスタリングでは  $\text{Log}(1,000/\text{最低用量})$  をパラメータとして使用し、変化が認められない項目は、デフォルトで 0 をパラメータとして用い階層化クラスタリング解析を実施した。

#### 1. 2 フェノタイプクラスター化学物質の共通部分構造解析及び構造活性相関予測モデル構築

上記のクラスタリング解析において得られたフェノタイプクラスターのうち毒性的に意味のあると考えられた2つのクラスターについてフェノタイプ変動が認められた化学物質群について共通する化学構造的な特徴について検討を行い、さらに構造記述子や部分構造セットを用いた判別モデルを構築して化学構造からの評価の可能性について検討を行った。本解析には KNIME 2.9.4 を用い、共通部分構造の抽出は、KNIME に搭載されている MoSS

(Molecular Substructure miner) を、判別モデルの構築は LibSVM をそれぞれ用いて実施した。

## 2. 化学構造類似度と *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の近似性の解析

これまでの研究で整理した既存化学物質点検による試験結果データベースを用いて化学物質間の構造類似度と無毒性量の近似度について解析した。構造類似度の指標として tanimoto 係数を用い、評価対象となるターゲット物質を選択して、その他の物質について構造類似度と毒性試験で報告された無毒性量の比較を行った。

## 3. 特定部分構造を有する化学物質群の *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の化学構造からの予測性の検討

これまでの研究から、化学物質の基本的な物性である logP や分子量と動物実験における無毒性量には、ある程度の関連があることが示唆されたものの、直接予測可能な相関式等を構築するにはいたらなかった。そこで、昨年度までに見出された毒性の強い化学物質群に共通する特徴部分構造の幾つかに着目して、特徴構造を有する化学物質群のみに限定して基本的物性と無毒性量の相関性について検討を行った。解析では各部分構造について 10 以上の化学物質について毒性試験結果が得られている部分構造を評価対象とした。

### C. 研究結果

#### 1. *In vivo* 反復毒性試験における血液化学及び血液生化学的変化をフェノタイプとする構造活性相関モデル構築の検討

##### 1. 1 *In vivo* 反復毒性試験における血液化学及び血液生化学的変化のクラスタリング

血液化学及び血液生化学的変化のクラスタリングを実施するに先立って、それらの変化が起こる投与量について確認する目的で、既存物質点検データベースをもとに血液学的検査及び血液生化学的検査のパラメータごとに変化が認められた被験物質投与量をプロットした結果を図 1、2 に示した。血液学的検査では、RBC, Hct, Hgb の変化が他に比べ低い用量域で認められた。一方、血液生化学的変化については、いずれにおいても同様の用量域で変化が認められた。

次に昨年度解析を行った病理変化も含め血液化学及び血液生化学的変化について、それぞれの化学物質で変化が認められた最低用量をパラメータとして化学物質と毒性変化の関係を階層クラスタリング解析した結果を図 3 に示した。クラスタリングの結果、幾つかのフェノタイプクラスターで特徴的に変化する化合物群があることが示唆された。

##### 1. 2 フェノタイプクラスター化学物質の共通部分構造解析及び構造活性相関予測モデル構築

上記のフェノタイプクラスタリング結果より、毒性学的に意味のあるフェノタイプの変動により特徴づけられる 2 つのフェノタイプクラスターを得た。そこでまず初めに、これらの 2 つのフェノタイプクラスターの変動が認められる化学物質群について、共通部分構造の抽出を試みた。図 4,5 にフェノタイプクラスターのみに絞って再クラスタリング結果と抽出された共通部分

構造をそれぞれ示す。図 4 のフェノタイプクラスターは、TP, Cho, Alb の上昇とともに肝肥大が認められ、脂質代謝への影響により肝肥大する化学物質を特徴づけるクラスターと判断された。特徴部分構造として、多種のアルキルベンゼン骨格が抽出された。一方、図 5 は RBC, Hct, Hgb の低下に特徴づけられる貧血を惹起する化学物質を特徴づけるクラスターと判断され、特徴部分構造として、アニリン骨格が抽出された。次にそれぞれのクラスターでパラメータ変動が認められた化学物質を陽性として、その他の化学物質を陰性として予測する判別モデルの構築を試みた。モデルの予測精度の判定のため、ランダムサンプリングにより一部 (20%) の物質を検証用として、残りの物質を学習セットとしてモデル構築を行い、検証用物質の評価を実施した。その結果、構築された判別モデルの予測率は学習セットについてはほぼ 100%であったが、評価用セットについては、50%程度の予測率に留まった。

## 2. 化学構造類似度と *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の近似性の解析

既存物質点検データベースからランダムに 1 物質を選択し、それを評価対象物質とした場合の他のデータベース登録物質の構造類似度と無毒性量の関係について解析を行った結果の代表例を図 6 に示した。図 6A, 6B の結果より類似度が 70% を超える物質の無毒性量は、評価対象物質と近似するのに対して、図 6C, 6D の結果より、構造類似度が 50% 以下の物質では、無毒性量の近似は認められず、構造類似度からの無毒性量の予測には利用出来ないことが示された。

## 3. 特定部分構造を有する化学物質群の *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の化学構造からの予測性の検討

これまでに研究から、毒性の強い化学物質群に共通する特徴部分構造を有する化学物質群について、化学物質の無毒性量と構造から計算される脂溶性指標である LogP との相関性の解析結果の代表例を図 7 に示す。結果は、解析を行った一部の部分構造についての結果ではあるが、これまでの解析では、多様な構造の化学物質について一括して評価を実施していたため明確な相関関係は得られなかったが、構造の絞り込みを行うことで LogP と無毒性量の相関性が示されたことから、これらの部分構造を有する化学物質については LogP からの無毒性量評価の可能性が示された。

## D. 考 察

本研究では、化審法におけるヒト健康影響評価で要求されるスクリーニング毒性試験のうち、特に反復投与毒性試験により評価される *in vivo* 毒性について化学構造から推定評価するための構造活性相関手法のリスク評価における実用化に向けて、有用性が期待されるアプローチについて検証を行い、有効な利用法について検討を進めた。

本研究に先立つ研究においては、既存化学物質点検で得られた毒性試験結果をもとに、多くの物質の毒性標的臓器である肝毒性や腎毒性など臓器ごとの毒性発現の有無を評価対象として評価モデルを構築して予測精度の検証を進めてきた。

一方、リスク評価における *in vivo* 反復毒性試験の目的はむしろ毒性の起きない用量

である無毒性量を明らかにし、毒性の強さに応じた化学物質の管理を行うことによりヒト健康被害を防止することにある。

そこで本研究では、反復投与毒性の化学構造からの評価について、毒性フェノタイプについての予測評価と無毒性量の予測評価の両面からのアプローチについて検討を進めてきた。

毒性フェノタイプの評価においては、これまで病理変化を対象とした解析を行い、肝臓の病理所見を分類した判別モデルの構築により精度の向上が示されたことから毒性メカニズムの分類による構造からの予測の可能性が示唆された。しかし、他の臓器では病理所見ごとの化合物数が少なく、予測モデル構築は難しい。そこで、本年度は血液化学検査や血液生化学検査における毒性変化の構造的特徴の抽出及びモデル構築について検討を行った。通常、血液化学検査や血液生化学的検査の検査項目の変動は、独立に統計検定が行われるものの、毒性評価においては多くの場合、関連する複数のパラメータの組み合わせにより毒性プロファイルの評価が行われる。そこでまず、構造活性相関モデル構築のターゲットとなる陽性及び陰性化学物質群を選択するため臓器を選択する目的で、これまでの研究で整理した既存化学物質点検による試験結果データベースを用いて血液化学及び血液生化学的变化を病理変化とあわせてクラスタリング解析を行った結果、毒性評価においてもそれぞれ関連する項目として評価される脂質代謝に関わる項目や貧血症状を示す項目がクラスターとして抽出された。これらをフェノタイプクラスターとして変動の認められた化学物質について共通部分構造の

抽出を行った結果、脂質代謝異常については、アルキルベンゼン骨格が、貧血についてはアニリン骨格が抽出された。これらの結果は、おおよそ既知ではあるが、本解析アプローチの妥当性及び有用性を示していると考察された。一方、これらのフェノタイプクラスターについて判別モデルを構築して評価を行った結果では、外部評価セットの一致率は、50%台に留まった。外部評価セット評価精度が高くない原因として、判別モデル構築に用いた構造記述子の不適合もしくは、データセットの不足なども考えられるが、血液化学的検査や血液生化学検査の結果を判別モデルで評価することは困難であり、むしろ関連する特徴部分構造による評価のほうが有用であると考察された。今後は、今回対象とした以外のフェノタイプクラスターについても検討を実施する。

一方、無毒性量の評価については、これまでに毒性の強い化学物質群に共通する部分構造が見出され、部分構造をもとに決定木型の判別モデルを構築することによりある程度の分類が可能であることが示されている。これまでの解析では、既存化学物質点検データベースとして整理を行った多様な化学物質全てを解析対象として検討を進めてきた。本年度の解析結果から、対象物質の無毒性量については、構造類似度が高い化学物質の情報からの予測評価の可能性及び特定の部分構造を有する化学物質に限定した予測評価式構築の可能性が示された。構造活性相関の原理は、類似物質について既知の情報から評価対象の物質について評価を行うことであり、今回の結果は構造類似物質の情報の無い化学物質についての化

学構造からの評価は難しいことを示すものであると考察される。これまでに得られた結果から、構造類似度からの評価や特定の部分構造からの評価モデルについて適用範囲を明確化し、それぞれの評価モデルの適用範囲であると評価された化学物質について評価を行うことで、適用範囲の化学物質についてのみではあるが、実用的な評価が可能になるとともに、さらに、適用範囲の異なる複数のモデルを構築し組み合わせることにより多くの化学物質についての評価を可能にする評価スキームの構築が可能であると考えられる。

## E. 結 論

本研究は、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リスク評価における実用化を目的として、それぞれについてレギュレーション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特色としている。反復毒性については、これまでのところカテゴリーアプローチによる評価例はあるものの、国際的に認められる信頼性の高い構造活性相関による評価手法は提案されていない。*in vivo*における毒性変化は様々なメカニズムにより引き起こされるためそれら全てを単一の評価モデルで評価を行うことが困難であるためと考えられる。

これまでの研究から反復毒性については、予測対象の化学物質に類似した化学物質について情報が得られていれば、ある程度、信頼出来る予測評価が可能であることが示

された一方、多様な化学構造の化学物質を一括して評価する予測モデルの構築は難しいことも示された。多くの化学物質に対して予測を行うためには、データベースに構造類似の化学物質が含まれていることの重要性を示しており、幅広い化学構造に対応したデータベースの拡充が今後の課題である。少なくとも現時点では、単一のモデルやルールで全ての化学物質について評価を行うアプローチよりも、化学物質ごとに入手可能な類似物質の情報をもとに適用可能な評価手法を選択して評価を行う評価スキームのほうが化学物質規制における実用性は高いと考えられる。また、類似構造や共通部分構造の化学物質について予測に十分な知見の得られていない化学物質については、化学構造のみで評価を行うのではなく、毒性発現メカニズムに立脚した *in vitro* 試験や少数例の動物試験との組み合わせによる評価手法の検討も重要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamazoe, Y., Ono, A., Hirose, A., Hayashi, M.: Development of a category approach to predict the testicular toxicity of chemical substances structurally related to ethylene glycol methyl ether., Regul Toxicol Pharmacol, 70:711–719, 2014.
- 2) Kobayashi, K., Pillai, K., Michael, M., Cherian, K., Ono, A.: Transition of Japan's statistical tools by decision tree for quantitative data obtained

- from the general repeated dose administration toxicity studies in rodents, *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3:507–520, 2014.
- 3) Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K., Hirose, A.: Evaluation of *in vivo* mutagenicity of hydroquinone in Muta™ mice., *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 775-776:94–98, 2014.
  - 4) Ema, M., Endoh, K., Fukushima, R., Fujii, S., Hara, H., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Hojo, H., Horimoto, M., Hoshino, N., Hosokawa, Y., Imai, Y., Inada, H., Inawaka, K., Itoh, K., Katsumata, Y., Izumi, H., Kato, H., Maeda, M., Matsumoto, K., Matsuo, S., Matsuoka, T., Matsuura, I., Mineshima, H., Miwa, Y., Nakano, N., Naya, M., Noyori, H., Ohta, T., Oku, H., Ono, A., Shimizu, T., Shimomura, K., Takakura, I., Tanaka, R., Tateishi, T., Tominaga, Y., Uesugi, T., Urakawa, C., Yabe, K., Yamashita, A., Yamauchi, T., Yokoi, R.: Historical control data on developmental toxicity studies in rodents., *Congenit Anom (Kyoto)*, 54:150–161, 2014.
  - 5) 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.
2. 学会発表
- 1) A. Hirose, M. Hirata-Koizumi, A. Ono, Y. Kosugi, T. Suzuki, S. Fujii, M. Ema and T. Nishimura :Analysis of the Serum Perfluoroalkyl Carboxylic Acids (PFCA) Levels for Repeated Dose Toxicity Studies Conducted for Long Chain PFCA in Rats. Society of Toxicology 54th Annual meeting (2015.3, San Diego, USA)
  - 2) A. Ono, K. Kobayashi, M. Matsumoto, M. Hirata-Koizumi, A. Hirose, M. Ema and T. Nishimura :Initial Risk Assessment of  $\beta$ -Bromostyrene. Society of Toxicology 54th Annual meeting (2015.3, San Diego, USA)
  - 3) T. Yamada, Y. Tanka, R. Hasegawa, Y. Sakuratani, Y. Yamazoe, A. Ono, A. Hirose and M. Hayashi :Hazard Evaluation Support System (HESS): Development of a Category Approach to Predict the Testicular Toxicity of Chemical Substances Structurally Related to Ethylene Glycol Methyl Ether. Society of Toxicology 54th Annual meeting (2015.3, San Diego, USA)
  - 4) A. Ono :Toxicogenomics as alternative of traditional toxicological endpoints. Korean Society for Alternatives to Animal Experiments 11th Annual Meeting (2014.11, Korea)