

**研究課題名：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

化学物質のヒト健康リスク評価に、構造活性相関（QSAR）や、カテゴリーアプローチ手法の導入が注目されている。本研究ではこれら手法の実用化に向けた改良と、得られた成果を基にした評価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、QSAR 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た。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、データベースを完成させた。約 2 万物質のうち、12,962 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、且つ QSAR のトレーニングセットとして利用できる。この 12,962 物質のエームス試験データベースを公開しエームス/QSAR モデルの予測精度向上のための国際共同研究を開始する。

これまで *in vitro* の試験データから QSAR モデルを開発してきたが、*in vitro* でのアラートを *in vivo* へ拡大し、*in vivo* 遺伝毒性予測モデルの構築にも着手した。その前提として、*in vivo* 試験データの精査と、データベースの構築を行った。CGX DB による 756 の齧歯類発がん物質と 183 の非発がん物質について、*in vivo* 小核（MN）試験と *in vivo* トランスジェニック突然変異（TG）試験のデータを収集・解析した結果、MN では 379 物質の、TG では 78 物質の知見が得られ MN の感受性は 41.0%で、特異性は 60.5%、TG の感受性は 72.9%であることが判明した。*In vivo* MN の感受性（41.0%）は *in vitro* 試験（Ames 58.8%、MLA 73.1%、MN 78.7%、CA 65.6%）と比較して低いものであったが、一方、特異性（60.5%）は Ames に次いで高いものであった（Ames 73.9%、MLA 39.0%、MN 30.8%、CA 44.9%）。

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。これまでのワークフローに新たに機械論的な理解により情報化される試験法と評価のための統合アプローチ（IATA）を反映させた。変異原性分類を基準とした入手可能な変異原性データを用いて、精巧な IATA から一連の試験による発がん物質のカテゴリー化を行った。IATA を用いると、遺伝毒性によるがん原性陽性を、高感度（80～85%）で偽陽性の割合を低く抑え（15～20%）予測できることが認められた。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースの TG 試験予測モデルの開発を行った。本年度は NIHS からのデータの提供（TGR データセット）により感度および正確度が大幅に向上した。本研究で陽性適中率が比較的高い（50%以上）アラートが 4 種確認された。これら 4 種のアラートを拡大適用した場合、感度の向上は最大で 60%に達すると考えられた。さらに感度を高め

るためには、さらなる試験データベースの拡張が望まれる。

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、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た。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。

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

毒性フェノタイプからの評価モデル構築の検討として、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、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。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

日本で評価された農薬の毒性について公表データを基に構造別に分類し、子宮内膜腺癌が増加した農薬を抽出し、各剤の既知情報から考えられる発がん機序予測の可否と化学構造および作用機序を解析した。子宮癌はラットの慢性毒性発がん性併合試験のみ計 7 剤で投与により発生頻度が増加した。7 剤のうち 5 剤では機序試験が実施されており、このうち化学構造の異なる 4 剤では機序試験から発がん機序が予測できた。機序試験が実施されていない 2 剤は構造、作用機序および毒性プロファイルが類似していたが、発がん機序は予測できなかった。これらの結果から、子宮発がん性機序予測には機序試験が重要であることが確認された。

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。個々の物質の評価では、問題とする作用濃度ではないが、類似の基本骨格をもち、側鎖の構造は変化に富み多岐にわたることから、それらの環境に共存する状況における複合暴露については注意を払う必要がある。今後、さらにカテゴリー化を進め、詳細な検討を行うことが重要な課題である。

キーワード；化学物質管理、構造活性相関 (QSAR)、カテゴリーアプローチ、遺伝毒性、一般毒性

研究分担者

広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部・部長

小野 敦

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部・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 安全性予測評価部・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 哲台

帝京平成大学 薬学部・教授

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、トランスジェニック突然変異 (TG) 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。

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ストラテジー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

B . 研究方法

1) エームス試験データベースの再構築

厚生労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質対策課より昨年度入手した。労働安全衛生法による届け出のあった化学物質には、混合物・ポリマーなども含まれている。構造活性相関はあくまでも化学物質の構造に基づく予測を行うので、そのような、「構造式が特定できない物質」は、Ames 試験結果はあっても対象にならない。また、構造情報を得るために有用な CAS 番号の情報がない物質が約半数であったことから、CAS 番号の有無による振り分けを行った。以上のことを考慮し、現在までに 12,962 の化学物質の Ames 試験の情

報(物質名称と試験結果(陽性、陰性等の判定))を作成ソフトJChemに入力し、データベースを完成させた。

2) In vivo 遺伝毒性試験の発がん物質検出性との関連

カーランドらによる発がん性・遺伝毒性データベース(CGX DB)は、756の齧歯類発がん物質と183の非発がん物質について、4種の*in vitro* 遺伝毒性試験情報(Ames, MLA, *in vitro* MN, *in vitro* CA)が収載されている。*In vivo* MNに関するレビュー論文あるいは大規模試験報告書、EUリスク評価書やOECD SIDS文書などの国際的化学品評価文書、US NTPのデータベースサーチ、ならびにPubMed文献サーチを用いた。また、*in vivo* TGについては、OECDのレビュー文書および食品添加物の遺伝毒性試験報告書を用い、有用なデータを検索した。遺伝毒性試験結果とCPDBの発がん性データを比較し、その一致率を評価した。

3) 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

本研究の最初の部分では、これまで発表の一環として収集された162種類の化学物質のデータセット(Mekenyanら、2012年)に依拠した。これらの物質について入手可能なデータは、それぞれの試験の能力に従ってカテゴリー化した。組織に対する精緻化されたレベル全体の試験結果について、試験の能力を踏まえて再検討した。

データセットの対象とする試験系は、以下の試験タイプ由来とした。

- ・ 復帰突然変異検出のため、アミノ酸要求性の複数の細菌株を用いる細菌復帰突然変異試験(Ames試験)(OECD TG 471)
- ・ 染色体の構造異常および数異常を検出する哺乳類の染色体異常試験(OECD TG 473)
- ・ 遺伝子突然変異および染色体構造異常を検出するマウスリンフォーマ試験(OECD TG 476)
- ・ 肝細胞を用いる不定期DNA合成(UDS)(OECD TG 486)

- ・ アルカリ単細胞ゲル電気泳動法(コメットアッセイ)(現時点でOECD TGなし;国際的な同意が得られたプロトコールが入手可能(Olive and Banath(2006年)参照))
- ・ トランスジェニックげっ歯類突然変異試験(OECD TG 488)
- ・ マウス肝細胞を用いる*in vivo*小核試験(現時点でOECD TGなし;国際的な同意が得られたプロトコールが入手可能(Clietら、1989年参照))
- ・ 骨髄小核試験(OECD TG 474)

4) Derek Nexus を用いて in vivo 変異原性のエンドポイントを予測するためのトランスジェニックげっ歯類データの利用

NIHSより、188種の異なる化合物に関するTGRアッセイデータのデータセットが提供された。このデータセットは、OECDが発表したレビュー(Lambert et al)に提示されたTGRアッセイデータを用いてNIHSがまとめたものである。Lhasa社では、このデータセットにおけるTGRでの判定結果に基づき、以下のルールに従ってこれらの化合物を陽性(113化合物)または陰性(75化合物)の結果に振り分けた。

- ・ + = 標的組織で陽性(発がん性データが利用できる場合)。総合判定は陽性とする
- ・ - = 標的組織で陰性(発がん性データが利用できる場合)かつ試験対象とされたことがある他のいかなる組織でも陰性(コメント欄に記述)。総合判定は陰性とする。
- ・ na (+) = 標的組織で陰性(発がん性データが利用できる場合)であるが、コメント欄に記載されている他の組織で陽性。総合判定は陽性とする。
- ・ na (-) = 標的組織で陰性(発がん性データが利用できる場合)かつコメント欄に記載されている試験対象とされた他の組織で陰性。総合判定は陰性とする。

2014年に公開されたDerekの知識ベース(KB)を用い(Derek Nexus 4.0)、*in vitro*変異原性に関するアラートに対してこのデータセットを検討した。このKBには*in vitro*変異原性

に関するアラートが 118 種収録されており、これらのアラートのうち 39 種が TGR アッセイデータに関連するものであった。

5) 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

5.1 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。

5.2 RPs 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 (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、活性に当該 toxicophore との関連なし)

6) 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

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。血液化学及び血液生化学的变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。その中で毒性学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共通する化学構造的特徴の検討を行い、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を検討した。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。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。

7) 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

公表されている約 200 の農薬の報告書を基に、ラットおよびマウスの長期毒性試験 (慢性毒性発がん性併合試験/発がん性試験) で投与により子宮内膜腺癌が増加した農薬を検索した。子宮腫瘍が増加した各剤について、農薬名 (common name)、農薬の分類、化学構造の特徴、農薬としての作用機序、毒性プロファイル (急性毒性、毒性の特徴、1 日許容摂取量 (ADI) とその設定根拠試験における最小毒性量 (LOAEL) と無毒性量 (NOAEL)、子宮癌の NOAEL と LOAEL) と評価年を記載した。

また公表データより機序試験の有無についても検索した。まず既知の子宮がん発生機序をタイプ A から E の 5 つに分けて評価した。

8) カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

ネオニコチノイド系殺虫剤であるアセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、ニテンピラム、チアメトキサム、ジノテフラン、クロチアニジン、フィプロニル、フロニカミドに対して、ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした評価を行った。

C . 研究結果

1) エームス試験データベースの再構築

エームス試験データの内訳は以下の通りであ

る。

- ・ 入手したデータ数：20,761
- ・ 構造式が描けないと判断したデータ数：7,257（混合物・ポリマー等）
- ・ 入力済み：12,692（CAS#有：7,972 / CAS#無：4,990）
- ・ 入力保留中のデータ数（CAS#に関わらず）：467
- ・ 重複しているデータ数（CAS#に関わらず）：75

入力データの中で、陽性判定物質の割合は約14%で、そのうち3分の1が強い陽性とされるものであった。陰性判定物質は86%であった。

2) *In vivo* 遺伝毒性試験の発がん物質検出性との関連

In vivo MNの発がん性に対する感受性は41.0%（120/293）、特異性は60.5%（52/86）であり、一致性は45.4%（172/379）で良好といえるものではなかった。一方、*in vivo* TGの発がん性に対する感受性は、72.9%（54/74）と比較的高いものであった。また、Amesと*in vivo* MNを組合せた場合の感受性および特異性も評価した。発がん物質についてAmesと*in vivo* MNの両試験を実施して、少なくとも1つの試験で陽性となる感受性は68.7%で、カークランドらが2005年に報告したAmesと他の*in vitro*試験（MLA, MN, CA）との組合せによる感受性の75.3%～81.0%に比べると低かった。一方、非発がん物質についてAmesと*in vivo* MNの両試験を実施して、両方の試験で陰性となる特異性は45.3%で、Amesと他の*in vitro*試験（MLA, MN, CA）との組合せによる特異性の12.0%～34.6%に比べると高かった。

3) 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

これまでのワークフロー（Mekeny et al. 2012）では、起源に関係なく*in vitro* 変異原性試験の結果に基づき、陽性か陰性かでまず化学物質を細分した。次の分類は肝臓を用いる*in vivo* 遺伝毒性作用に基づき、続いて*in vivo* MNTの結

果とした。レベル全体の結果に不一致が生じた物質については、例えば*in vivo* のみの作用として、いわゆる基質チャネリングや化学物質の代謝的解毒の発生、骨髄など肝臓から離れた組織への接近の間にタンパク質（または他の生体分子）との相互作用能を獲得など、諸因子を考慮することにより可能な限り正当化された。こうした正当化は事例ごとの基準では可能であったが、レベルとは無関係に、少なくとも1つ陽性の変異原性データを不採用にすることが1つの欠点であった

例えば、レベル1の場合、最終的な変異原性が陽性であると、Ames-S9、CA、またはMLA由来データが陽性であることに基づく割り当てであると考えられる。これと同じ方法が、レベル2および3における*in vivo* 変異原性の割り当てに用いられると考えられる。故に、レベル1の最終的な変異原性の判定が、Ames試験データ陰性かつCAデータ陽性の結果に基づき陽性に割り当てられた場合、この化学物質はレベル2でなお陰性になることが考えられる。何故なら、レベル2で選択される試験には、CA試験に匹敵する試験の能力がなかったからである。そのため、この化学物質の場合、*in vitro* 試験では陽性、肝臓を用いる*in vivo* 試験では陰性であると判断され、実際には可能性がきわめて低い肝解毒作用関与の仮説が立てられると考えられる。今回の*in vitro*、*in vivo*における外挿のワークフローは、こうした欠点への対処のため精緻化された。

4) Derek Nexus を用いて *in vivo* 変異原性のエンドポイントを予測するためのトランスジェニックげっ歯類データの利用

検討対象とした7種のアラートのうち6種は*in vivo*での活性と関連性があると判断され、*in vivo*に拡大適用した。これらのアラートはいずれも*in vivo*データに対する十分な予測性能を有しており、活性のメカニズムは*in vitro*および*in vivo*のエンドポイントにおいて同一のものであると考えられた。また、哺乳類における推論レベルは、拡大適用としたアラートの大半（6種中5種）で「妥当」であるとみなした。これは、これらのアラートは陽性適中率が比較的高いこと、お

よび観察された活性は特定の toxicophore に起因するものであると予想されたことに基づいた判定である。

一方、芳香族アミンおよびアミドに対するアラート 352 については推論レベルを下げて「不確か」とし、このアラートの予測性能が信頼性に劣ることを示している。

TGR アッセイにおいていくつかの芳香族アゾ化合物が変異原性を示すことが報告されているが (Lambert et al.) これらの化合物はその活性に關与する可能性のある他の構造的特徴(すなわち、芳香族アミン基)も有していた。結果として、このアラートに対するコメントを更新したが、新たなルールは追加しなかった。

改良したアラートを含む新しい知識ベース (Derek KB 2014 + 第 8 年次 NIHS) の予測性能は、NIHS の TGR データセットを用いて評価した結果、感度 (10% から 41% に上昇) および正確度 (46% から 62% に上昇) に大幅な向上が認められ、これに伴う特異度の低下 (100% から 93%) はごくわずかであった。

5) 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

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。

■ 新たなフルアラート

- ・ RP008 「2-アミノピリミジン」
- ・ RP024 「スチレンまたはその誘導体」

■ 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
- ・ RP004: チオテトラゾールまたはその誘導体
- ・ RP006: チアゾリジノンまたはその誘導体

- ・ RP009: 硫化ジフェニル、スルホキシドまたはスルホン
- ・ RP018: ピロリジンまたはその誘導体
- ・ RP022: フルオロキノロン-3-カルボン酸
- ・ RP028: 第三級アルコールまたはエーテル
- ・ RP031: O-tert-ブチルエステルまたはカルバメート

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

¥

6) 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

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、血液生化学的变化については、いずれにおいても同様の用量域で変化が認められた。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。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結果、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。また、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、それに関する特徴部分構造として、アニリン骨格が抽出された。

最終的な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。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、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。

7)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

検索した農薬において、投与によって子宮内腺癌の頻度が7化合物において増加し、これらは全てラット慢性毒性発がん性試験併合試験で認められた。農薬の分類では、殺虫剤が2剤、殺菌剤が3剤、除草剤が2剤であった。農薬としての作用機序の点からは、除草剤のピリミノバックメチル、メタゾスルフロンはアセト乳酸合成酵素(ALS)阻害作用、殺菌剤であるイソピラザム、セダキサンおよび殺虫剤シエノピラフェンはミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素阻害剤、殺菌剤のベンチアバルカルブイソプロピルと殺虫剤のスピロジクロフェンは脂質系生合成阻害を有する化合物であった。7剤の化学構造は、5剤は異なっていた。2剤(イソピラザム、セダキサン)のみピラゾールカルボキサミド系と類似した化学構造を有していた。

発がん用量の比較において、子宮内腺癌の増加は6剤で高用量のみに認められた。ADIの設定根拠試験との比較では、差が最も小さい剤がベンチアバルカルブイソプロピルであったが子宮癌が増加した投与量は318mg/kg体重以上と大量投与条件下であった。ピリミノバックツメチルではADI設定根拠試験との差が200倍近かった。

8)カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

ネオニコチノイド系殺虫剤は、イミダクリプリドが開発されて、-C-N-C-N-の構造を共通に有する類似の作用性を持つ殺虫剤として、開発されて登録されている(図1)。アセタミプリドとイミダクリプリド及びニテンピラムが類似の骨格構造を有し、チアクロプリド、チアメトキサム及びクロチアニジンが類似の骨格構造を有し、ジノテフランが他の2群と異なった構造をもつ。アセタミプリドが最も作用が強く、ダイアジノンオキソンに比較して、相対濃度として約1150倍

に相当する濃度(1150分の1の作用)でAChEの阻害を示した。アセタミプリド(1)に対して、ジノテフランが相対濃度として0.08であった他は0.1~0.3に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N-の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

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。昨年度から、安衛法エームス試験データ20,761物質を入手し、データベース化に着手した。うち、12,962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、これをすべてデータベース化した。

遺伝毒性*in vivo*試験に関しては、CGX DBによる756の齧歯類発がん物質と183の非発がん物質について、*in vivo* MNと*in vivo* TGのデータを収集・解析した。*In vivo* MNの発がん性に対する感受性は41.0%で、特異性は60.5%、*in vivo* TGの感受性は72.9%であることが判明した。また、Amesと*in vivo* MNを組合せた場合の感受性は68.7%で、特異性は45.3%であった。*In vivo* MNの感受性(41.0%)は*in vitro*試験(Ames 58.8%、MLA 73.1%、MN 78.7%、CA 65.6%)と比較して低いものであったが、一方、特異性(60.5%)はAmesに次いで高いものであった(Ames 73.9%、MLA 39.0%、MN 30.8%、CA 44.9%)。 *In vivo* - *in vitro*比較においては、*in vivo* MNと*in vitro* CAの一致性を検証した。発がん物質に対する両試験の一致性は53.2%、非発がん物質に対しては37.3%で、発がん物質と非発がん物質を統合すると49.2%であった。また、発がん物質と非発がん物質を統合した場合の*in vivo* TGとAmesの一致性は78.4%で、高かった。今後、*in vivo* MNと*in vitro* CAにおける一致性の低さの要因(*in vitro* CAにおける反応の代謝活性化系の有無や

in vivo MNの曝露経路の妥当性などを含む)あるいは化学物質群に対する特性等を解明することにより、より精度の高いQSARの開発につながるものと考えられる。

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。これまで作成された遺伝毒性に関する *in vitro*、*in vivo* における外挿のワークフローを、試験の能力に基づいて精緻化した。今回、改訂ワークフローを通じ化学物質 162 種類のデータセットを再評価し、データの結果を解釈する際の欠点に対処した。これにより、最初の TIMES モデルを開発し、その見識を改善に用いた手法からさまざまな示唆が得られる。今回の改訂ワークフローでは、GHS の変異原性カテゴリーから陽性の遺伝毒性を予測する際、その実用性検討の取り組みまで範囲を広げた。試験の能力の類似性または相違性を明らかにした各種組み合わせの試験系について、その性能を評価してもほとんど差異が認められなかった。ただし、研究に利用可能な一連の試験が限られていたため、今回の結果には偏りが含まれていたことが考えられる。

今後の作業では、このワークフローを拡大し入手可能な TIMES モデルの結果を取り込み、体系的な利用に向け、このワークフローを実践的な IATA に取り入れていくことになる。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースのトランスジェニック突然変異 (TG) 試験予測モデルの開発を行った。本年度は NIHS からのデータの提供 (TGR データセット) により感度および正確度が大幅に向上した。本研究で陽性適中率が比較的高い (50%以上) アラートが 4 種確認された。これら 4 種のアラートを拡大適用した場合、感度の向上は最大で 60%に達すると考えられた。さらに感度を高めるためには、NIHS の TGR データセットに含まれる関連データを用いて、その他の *in vitro* 変異原性アラートを拡大適用する必要がある。しかし、これらのアラートの対象とされている活性化合物は 3 種未満であり、多くのアラート (32 種中 16 種) が 1 種のみ活性化合物を対象とするものである。したがって、NIHS の

TGR データセット以外に根拠となるデータが得られない限り、これらのアラートの多くは拡大適用に該当する可能性が低いと考えられる。従って、さらなる試験データベースの拡張が望まれる。

肝毒性の予測に関しては、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ている。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。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。

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。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。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。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。

ラットの子宮発がん作用機序として、エストロゲン作用、持続的な相対的高エストロゲン状態の持続、あるいは肝臓におけるエストロゲン代謝変調によるカテコールエストロゲンの産生の3つの経路が知られている。今回検索した7剤中5剤については機序試験が実施され、そのうち各2剤が相対的高エストロゲン状態の持続およびエストロゲン代謝変調によるカテコールエストロゲンの産生であったことから、これら4剤の試験では適切な機序試験が実施されていると判断され、長期毒性試験で発がん性が認められた場合の適切な機序試験の実施が発がん機序予測さらにはヒトへの外挿性予測のためには重要であると結論した。

一方、今回の検索結果より化学構造から子宮発がん機序を予測することはできなかった。しかし興味ある点として、化学構造が類似していた2剤では適切な機序試験が実施されていないために発がん機序を予測することはできなかったが、毒性のプロファイルも類似していることから同様の機序により子宮内膜腺癌が増加した可能性が示唆された。

ネオニコチノイド系殺虫剤は、天然物であるニコチンと同様、神経のシナプス後膜に局在するアセチルコリン受容体に結合し、神経興奮を遮断することにより毒性作用を発現されるとされてい

る。

ネオニコチノイド系殺虫剤7物質の間で、アセタミプリドが、AChE に対して最も作用が強く、ダイアジノンオキサゾンに比較して、相対濃度として約 1150 倍に相当する濃度（1150 分の一の作用）で AChE の阻害を示した。アセタミプリド（1）に対して、ジノテフランが相対濃度として 0.08 であった他は、0.1~0.3 に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N- の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

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し、QSAR ツールの予測性向上のための国際共同研究を組織し、この分野で国際的イニシャティブを取る。In vitro の試験データから QSAR モデルを開発してきたが、in vitro でのアラートを in vivo へ拡大し、in vivo 遺伝毒性予測モデルの構築にも着手した。その前提として、in vivo 試験データの精査と、データベースの構築を行う。Ames 試験の予測だけでなく、他の遺伝毒性エンドポイントの予測モデルも着実に開発を続ける。

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。今回、その結果、2つのフルアラート作成と、8つの RP の無効化により肝毒性の予測精度は、感度 39.5%、特異性は 77.9%となった。

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。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。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。

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

研究発表

誌上発表

1. Petkov, PI, Patlewicz, G, Schultz, TW, Honma, M, Todorov, T, Kotov, Dimitrov, SD, Donner, M, Mekenyan, OG, A feasibility study: Can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity? Regul. Tox. Pharm., 72, 17-25 (2015)
2. Morita, T., Miyajima, A., Hatano, A., Honma, M.: Effects of the proposed top concentration limit on an *in vitro* chromosomal aberration test to assay

sensitivity or to reduce the number of false positives, Mutation Research, 769, 34-49 (2014)

3. Kirkland, D, Zeiger, E, Madia, F, Gooderham, N, Kasper, P, Lynch, A, Morita, T, Ouedraogo, G, Morte, JM, Pfuhler, S, Rogiers, V, Schulz, M, Thybaud, V, Bentham, J, Vanparys, P, Worth, A, Corvi, R., Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop, Mutation Research 755, 55-68, (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. and Yokoi, R., Historical control data on developmental toxicity studies in rodents. Congenit. Anom. (Kyoto). 54, 150-161, 2014.
5. 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]
6. 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 Genet Toxicol Environ Mutagen*, 775-776, 94-98, 2014.
7. Yamada T, Tanaka Y, Hasegawa R, Sakuratani Y, Yamazoe Y, Ono A, Hirose A, Hayashi M. (2014) 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.
 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, 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.

学会発表

1. 本間正充: 医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理, 第 350 回 CBI 学会研究講演会 2014 年 5 月 東京
2. 本間正充: 日本環境変異原学会レギュラトリーサイエンス WG 活動, 日本環境変異原学会公開シンポジウム 2014 年 5 月 東京
3. Honma, M et al.: Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing genotoxicity by targeted mutagenesis, 43rd EEMS Annual Meeting 2014 年 7 月 ランカスター・英国
4. M. Honma: Use of QSAR Tools for Hazard Identification of Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, 9th World Congress on Alternative and Animal Use Sciences (WC9), 2014 年 8 月 プラハ・チェコ
5. 本間正充: インシリコによる医薬品中不純物の安全性評価と、その向上に向けた国際共同研究, CBI 学会 2014 年大会プレミィングセッション 2014 年 10 月 東京
6. Honma, M.: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014 年 11 月 上海・中国
7. 本間正充: 遺伝毒性インテリジェントテストシステム, 日本環境変異原学会第 43 回大会 2014 年 11 月 東京
8. 本間正充: QSAR を利用した医薬品中の遺伝毒性不純物の評価と管理, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 2014 年 12 月 横浜
9. M. Honma et al.: Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014 年 12 月 コルカタ・インド
10. Takeshi Morita and Shuichi Hamada: The Rat Liver Micronucleus Test: Summary of the 2013 IWGT Working Group on the

- Liver Micronucleus Test, 2014 GTA
(Genetic Toxicology Association) ,
Newark, US, 7 May 2014.
11. 森田 健: Ames 陽性知見は、発がん性や遺伝毒性リスクを全て同じレベルで示唆するか? JEMS・BMS 研究会 第 51 回定例会 (2014 年 6 月 6 日、大橋会館、東京)
 12. 森田 健、古田光子、春日文子: 有害性物質の毒物劇物への該当性評価、第 36 回日本中毒学会総会(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 (2014.9 , Edinburgh, UK)
 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, Kawasako 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
 16. 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)
 17. 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)
 18. 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)
 19. Ono, A., Kobayashi K., Matsumoto, M., Ema, M., Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A. Initial risk assessment of β -bromostyrene, 第 54 回米国トキシコロジー学会(2015.3, San Diego, California, USA)
 20. 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)
 21. 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)
22. 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) - 精巢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)
23. A. Ono :Toxicogenomics as alternative of
traditional toxicological endpoints. Korean
Society for Alternatives to Animal
Experiments 11th Annual Meeting
(2014.11, Korea)
24. A. Ono, M. Takeyoshi, Y. Maeda, N.
Suzuki, H. Kojima, S. Takeuchi, J. Hong,
H. Lee, A. Vinggaard, J. Odum, S. Laws
and H. Kojima :Inter-laboratory validation
study of Androgen receptor stably
transfected transcriptional activation
(STTA) assay for new OECD test guideline.
The 9th World Congress on Alternatives
and Animal Use in the Life Sciences
(2014.8, プラハ、チェコ)
25. 小野 敦 :トキシコゲノミクスによる肝毒性
バイオマーカー. 第41回日本毒性学会学術
年会 (2014.7, 神戸)
26. Midori Yoshida, Kaoru Inoue, Miwa
Takahashi. Predictive MOAs of uterine
adenocarcinoma development induced by
pesticides. SOT2015 (San Diego, March
2015)

G . 知的所有権の取得状況

(該当なし)