

**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  
（H27-化学-指定-005）**

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

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。本研究では、規制の対象となるすべての化学物質のヒト健康リスクを評価するためのインシリコ手法を確立することを目的とする。具体的には、カテゴリーアプローチと、構造活性相関（QSAR）手法により、各種毒性エンドポイントを定性的、もしくは定量的に予測する手法を開発、改良し、化学物質のヒト健康リスク評価に利用することを実現させる。

エームス試験に関しては、これまで構築してきた大規模データベース利用し、予測精度の向上を目指した競争的国際共同研究を組織した。H27年度は3,950化学物質のエームス変異原性の予測に世界7カ国のQSARベンダーが提供する16のQSARモデルが挑戦した。*In vivo*小核試験では379物質、トランスジェニック遺伝子突然変異試験では80物質からなる大規模*in vivo*遺伝毒性試験データベースを構築し、発がん感受性および*in vitro/in vivo*試験間の一貫性を評価した。今後、これらの知見をQSARモデルに組込む。

反復投与毒性については、無毒性量評価において、類似物質についての毒性情報が得られておらず化学構造のみからの評価が困難と判断される化学物質について、基本的な化学構造的特徴と短期毒性試験結果をもとにした毒性クラス判定の可能性について検討を行い、特定の化学構造的特徴を有する化学物質に限定すれば、予備試験レベルでの短期試験により無毒性量を外挿評価可能であることが示された。

また、肝毒性の評価に関しては、これまでの公表論文等のメカニズム情報を基に肝毒性アラートを作成する手法に代わる新たなアプローチとして、肝毒性に関連するkey eventを予測し、生体内経路の攪乱に關与する化合物群のプロファイルと組み合わせることによる肝毒性の予測モデルの作成を行った。Key Eventを特定するために、*in vitro* 肝毒性データから MIE（molecular initiating event）を特定し、有害転帰経路（Adverse Outcome Pathway; AOP）に位置付けた。さらに、AOP wikiに収載された情報を用いてkey eventとAOPとの相関関係を構築した。

**キーワード：**定量的構造活性相関(QSAR)、カテゴリーアプローチ、データベース、遺伝毒性、反復毒性、肝毒性

## 研究分担者

本間正充

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部  
部長

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

小野 敦

国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部  
室長

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

## A. 研究目的

化学物質の規制に関わる国際機関や、各国規制当局の最近の関心の焦点は、規制の対象となるすべての化学物質を実験的に試験することなく、有害作用を引き起こす化学物質を同定するための単純なスクリーニングツールを確立することにある。構造活性相関、およびカテゴリーアプローチは、コンピュータトキシコロジーの重要な研究分野であり、有害作用を引き起こす可能性が高い化学物質を、その化学構造から*in silico*で予測する手法である。これら手法は統合型毒性評価系の重要な構成要素の1つであり、安全性評価が必要とされる化学物質の優先順位付けや絞り込みに有用である。また、毒性試験における動物利用の大幅な削減にも貢献できる。

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(QSAR)やカテゴリーアプローチ手法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基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。本年度は、これまでの研究成果を生

かし、QSARやカテゴリーアプローチ手法の実用化に向けて予測精度の向上を目指す。

エームス変異原性に関しては、これまで我が国で行われたエームス試験データを収集し、大規模データベースを再構築してきた。本データベースもつ化学物質の種類は世界最大規模になると予想され、かつ、個々の試験はOECDガイドラインに従い、GLP管理下で行われた試験であるため、信頼性の高いデータベースである。このデータをベンチマークデータセットとして、世界中のQSARベンダーに提供し、全てのQSARツールの予測率の向上を目指した国際共同研究を開始した(本間)。

染色体異常誘発性については、*in vitro*試験で陽性だが*in vivo*試験では陰性となるケースが多く知られている。そのため、より精度の高い染色体異常予測率を示すQSARモデルの構築には、*in vivo*試験の発がん物質感受性を評価し、*in vitro*と*in vivo*試験間のギャップの要因を検証する必要がある。そのため、CGXデータベースに、小核試験(MN)と、トランスジェニック遺伝子突然変異試験(TGR)の2種の*in vivo*遺伝毒性試験を加えた拡張版CGXを構築し、各試験の感受性/特異性を評価する。さらに、遺伝毒性指標を同じくする*in vitro/in vivo*試験間のデータ比較から、より信頼性の高い遺伝毒性試験QSARの開発を目指す(森田)。

反復投与毒性については、化学構造からの予測評価手法の実用化に向けて、評価対象とする化学物質について既知情報からの評価の可能性を判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、化学構造を指標として可能な限り効率的なリスク評価スキームを構築することを目指す(小野)。

臓器別の毒性予測に関しては、これまでの公表論文等のメカニズム情報を基に肝毒性アラートを作成する手法に代わる新たなアプローチとして、肝毒性エンドポイントに関連するkey eventモデルを予測し、生体内経路の攪乱に關与する化

合物群のプロファイルと組み合わせることによる肝毒性の予測モデルの作成を行った（広瀬）。

## B. 研究方法

### B.1. エームス変異原性の予測精度の向上（本間）

安衛法によって実施された約23,000化学物質のエーム試験結果を精査し、QSARの開発に有用である12,451化学物質（内エームス陽性1,776化合物）をデータベース化した。そのうち3,950化合物のデータを共同研究のPhase Iデータとした。これらエームス試験の結果以下の3つに分類される。

- A判定：エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg以上の強い陽性と判定される物質
- B判定：エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質
- C判定：エームス試験における陰性判定物質

世界7カ国、11のQASRベンダーが共同研究に参画した。合計16のQSARツールが評価に提供され、Phase Iトライアルにチャレンジした。

### B.2. In vivo遺伝毒性試験QSARの開発（森田）

対象化学物質はカーランドらのCGX データベースを基にした。データ収集には、総説、国際的的化学物質評価文書、NTP データベースおよびPubMed等を用いた。試験結果は以下の4つに分類した。すなわち、+：陽性、-：陰性、E（不明確）およびTC（技術的に問題あり）。TGRにおける陽性は「少なくとも1つの発がん標的部位で陽性」、陰性は「TGRで評価したすべての発がん標的部位で陰性」とした。なお、*in vitro* CAにおいて、10 mM超および2 mg/mL超の濃度での陽性の知見は、これまでの研究成果に基づき陰性と判断した。

### B.3 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（小野）

既存化学物質安全性点検事業により、反復投与毒性試験（28日間試験もしくは反復投与生殖発生併合試験）が実施された化学物質について、本試験に先立って実施された予備試験の概要と本試験・予備試験それぞれにおけるNOAEL、LOAEL及び主な毒性所見を整理して、予備試験結果と本試験結果との比較解析及び基本的な物性や毒性クラス分類との相関について解析を行った。

### B.4. 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（広瀬）

肝毒性に関連する経路およびKey Eventを特定するために、*in vitro* 肝毒性データを収集したMIP-DILIプロジェクトの研究成果を基礎としてMIE（Molecular Initiating Event）を特定し、有害転帰経路（Adverse Outcome Pathway; AOP）に位置付けた。さらに、AOP wikiに収載された情報を用いてkey eventとAOPとの相関関係を構築した。概念実証プロファイラーの作成には2種類のアプローチ（Derek Nexusのアラートパターンの利用とkey eventに関連する公開*in vitro* アッセイデータに関連する化合物群との構造的類似性を利用したリードアクロス法）を採用した。次にkey eventモデルと化合物プロファイラーを関連づけ、KNIME解析プラットフォームを用いて肝毒性の予測性能を評価した。

## C. 結果

### C.1. エームス変異原性の予測精度の向上（本間）

2014年12月までに11機関に化学物質の以下の情報を送付した。情報は、管理番号、CAS#、化学物質名、SMILESである。2015年9月末までに参加機関のQSARツールによるエームス試験判定予測結果を回収し、予測精度を評価した。

基本的な能力評価はA-Sensitivity、AB-Sensitivity、Specificityを用いた。A-Sensitivityは強いエームス陽性化合物を陽性判定する率で有り、規制側はこの値を最も重要視する。Specificityはエームス陰性化合物を陰性と

判定する率で、化学物質や、医薬品の開発にはこの数値が高いことが望まれる。最も高いA-Sensitivityを示したものはイタリアのマリオネギリ研究所のVEGA+MNとマルチケース社のCase-ULTRA(rule based)であった(ともに81.3%)。

今回の3,950化学物質には183の強いエームス陽性化合物が含まれる(A判定)。しかしながら、このうち8化合物については、16のQSARツールの全てが陰性を示した。これら化合物は”False Negative(偽陰性)”と考えられる。一方、3,380化合物はエームス陰性である(C判定)。しかしながら、このうち10化合物については、16のQSARツールの全てが陽性の判定をした(False Positive; 偽陽性)。

### C.2. In vivo遺伝毒性試験QSARの開発(森田)

In vivo MNでは379物質、TGRでは80物質のデータが認められた。感受性/特異性は、in vivo MNで41.0%/60.5%、TGRで72.4%/nc、エームス + in vivo MNで68.7%/45.3%、エームス + TGRで83.8%/ncであった。3試験を組合せた場合の感受性は、80%超であった。In vitro/in vivo一致性は、in vivo MNとin vitro CAで50.3%、TGRとエームス試験で79.5%であった。27物質がin vitro CA陰性でin vivo MN陽性を示し、5物質がエームス試験陰性でTGR陽性、10物質がエームス試験陽性でTGR陰性を示した。

### C.3 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(小野)

特定の化学構造的特徴を有しており14日間予備試験でNOAELが求められている物質については、14日間NOAELの組み合わせで、スクリーニングレベルの評価が可能であることが示された。さらに、化学構造から計算可能な基本的な物性とCremer毒性分類との組み合わせにより評価対象物質を限定することでより信頼性の高い評価が可能であることが示された。

### C.4 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(広瀬)

反復投与毒性データセットを作成したプロファイラーで処理して毒性予測を行った結果、感度は57%で、特異度は44%となった。さらに、高濃度でしか肝毒性を示さなかった化合物としてLOAELが1000 mg/kg超または250 mg/kg超となる化合物を除外するとモデルの感度はそれぞれ63%および71%に向上することが示された。さらに、物理化学的な記述子のカットオフとして分子量の480未満またはClogP-5超を利用したところ、感度を同程度に維持したまま特異度が44%から58%に向上させることができた。

## **D. 考察**

### D.1. エームス変異原性の予測精度の向上(本間)

今回の3,950化合物の予測精度に関しては、ICH-M7を契機にエームス試験の予測性の向上に積極的に取り組んでいるラーサ社、マルチケース社、リードスコープ社のQSARツールの予測性に期待が持たれた。3社は、知識ベース、統計ベースの両者のモデルを有する。概して、3社のツールはSensitivity、Specificityともバランスがよく、75~82%の一致率(Correspondence)を示した。一方、規制当局が懸念するA-Sensitivityに関しては、イタリアのマリオネギリ研究所のVEGA、およびVEGA+MNモデルが80%以上の検出率を示したが、一方Specificityは70%以下で有り、偽陽性が多くなることが懸念された。REACH(EU)、TSCA(米国)、化審法(日本)等の化学物質の管理のシーンでは実際の試験対象物質のスクリーニング、もしくは優先順位付けに有効かもしれない。

A-Sensitivityが低いツールとして、スイスのAZMES、スペインのSymmetry、ブルガリアのAMBIT、日本のADMEWORKSが挙げられる。これらのA-Sensitivityは60%以下で有り、多くの危険な化学物質を偽陰性と判断する可能性がある。

る。今後の、改良が望まれる。

ほとんど全てのQSARツールの全てが陰性と間違っ判定した化学物質が全体の強いエームス陽性化学物質の10%も存在したことは、これらのQSARツールがまだ未熟であることを示すと同時に、本プロジェクトの意義が明確になった。すなわち、様々な構造を有する化学物質の試験結果をデータベース化し、エームス陽性のケミカルスペースを拡大することが、偽陰性を減らすことに繋がるものと確信する。また、偽陽性も多く見つかった。警告アラートとは別に、それらアラートを修飾する部分構造や、トキシコフォープを同定することが偽陽性の削減に役立つが、それに対しても多くの化学物質の情報が必要である。

#### D.2. *In vivo* 遺伝毒性試験QSARの開発 (森田)

*In vivo* MNの感受性は、*in vitro*試験より低かったが特異性はエームス試験に次いで高かった。TGRの感受性はエームス試験よりも高く、他の*in vitro*試験と同程度であった。エームス+ *in vivo* MN + TGRは高い感受性を示し、ICH S2(R1)のオプション2は、有効であることが示唆された。より精度の高いQSARの開発には、*in vitro* CA陰性で*in vivo* MN陽性の物質の特徴やそのメカニズムの検証、ならびに発がん標的臓器と遺伝子突然変異標的臓器の相違の要因(動物種、系統、投与期間、投与経路、化学物質の吸収や代謝など)の検討が必要と考えられる。

#### D.3. 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 (小野)

予備試験では、病理組織学的検査や血液生化学検査が実施されていない場合も多いが、それらの検査を実施することでより正確な評価(予測)が可能であり、類似物質についての毒性情報が得られておらず化学構造のみからの評価が困難と判断された化学物質について、基本的な化学構造的な特徴と短期毒性試験結果をもとに毒性クラスの効率的な判定が可能であると考察された。

#### D.4. 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 (広瀬)

今後の研究として感度と特異度の両方を向上させるためには、偽陰性や偽陽性の化学物質クラス解析等を行うことによって、様々なkey eventを予測する方法をさらに調査することが有用であることが示された。

### **E. 結論**

エームス変異原性の予測精度の向上に関しては、エームス試験予測QSARモデルの向上を目指した国際共同研究を開始した。日本で実施された安衛法に基づくエームス試験データから、QSARモデルの開発に有用と考えられる12,000化学物質のをデータベース化した。H27年度はこのうち3,950化合物について、エームス試験結果の予測精度を競うPhase Iトライアルを行った。世界7カ国から、11のQSARベンダーがこの国際競争に参画し、16のQSARツールについて予測精度の評価を行った。多くのQSARツールの精度は高いものであったが、強い陽性化合物を適切に陽性と判定する能力のさらなる向上が望まれた。また、ほとんど全てのQSARツールで検出できない強いエームス陽性化合物が多く同定された。これら化合物は新規の変異原性アラートを有することが考えられる。多くの外部データで試験を行い、できるだけケミカルスペースを拡大させることが、QSARの予測精度の向上に繋がるものと考えられる。

*In vivo*遺伝毒性試験に関しては、これまでにない大規模な試験データベースを構築した。*In vivo* MNの感受性/特異性は41.0%/60.5%、TGRの感受性は72.4%であった。エームス+ *in vivo* MNでは68.7%/45.3%、エームス+ *in vivo* TGRでは83.8%/ncであった。また、*in vitro/in vivo* 試験の一致性は、*in vivo* MNと*in vitro* CAで50.3%、TGRとエームス試験で79.5%であった。これらの*in vivo*知見あるいは*in vitro/in vivo*試験間の相違に関する知見をQSARに組込むことが精度向上に

必要である。

反復毒性については、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、肝毒性に関してはkey Eventを特定するために、*in vitro* 肝毒性データを収集したMIP-DILIプロジェクトの研究成果を基礎としてMIEを特定し、有害転帰経路AOPに位置付けた。Key eventとAOPとの相関関係を構築は毒性評価の新しい可能性をもたらすものとする。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

Barber C, Amberg A, Custer L, Dobo KL, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Harvey J, Honma M, Kenyon MO, Kruhlak N, Muster W, Stavitskaya L, Teasdale A, Vessey J, Wichard J; Establishing best practise in the application of expert review of mutagenicity under ICH M7. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 73, 367-377 (2015)

Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Williams RV, Hamada S, Hirose A, Honma M, Morita T; Using *in vitro* structural alerts for chromosome damage to predict *in vivo* activity and direct future testing. *Mutagenesis*, 31, 17-25 (2015)

Petko IP, Patlewicz G, Terry, Schultz W, Honma M, Todorov M, Kotov S, 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)

Morita T, Hamada S, Masumura K, Wakata A, Maniwa J, Takasawa H, Yasunaga K, Hashizume T, Honma M; Evaluation of the sensitivity and specificity of *in vivo* erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. *Mutation Research*, 802, 1-29 (2016)

Morita T, Uno Y, Honma M, Kojima H, Hayashi H, Tice RR, Corvi R, Schechtman L, The JaCVAM International Validation Study on the *in vivo* Comet Assay: Selection of Test Chemicals. *Mutation Research*, 786-788, 14-44 (2015)

森田 健 ; LD50値による毒性評価手法の変遷、*中毒研究*, 28, 388-391 (2015)

Hirata-Koizumi M, Fujii S, Hina K, Matsumoto M, Takahashi M, Ono A, and Hirose A; Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats: perfluorohexadecanoic acid and perfluorotetradecanoic acid. *Fundam Toxicol Sci*, 2(4) 177-190 (2015)

Igarashi Y, Nakatsu N, Yamashita T, Ono A, Ohno Y, Urushidani T, Yamada H; Open TG-GATES: a large-scale toxicogenomics database. *Nucleic Acids Res*, 43 (Database issue) D921-D927 (2015)

Okamura H, Abe H, Hasegawa-Baba H, Saito K, Sekiya F, Hayashi S, Mirokuji Y, Maruyama S, Ono A, Nakajima M, Degawa M, Ozawa S, Shibutani M, and Maitani T; The Japan

Flavour and Fragrance Materials Association's (JFFMA) safety assessment of acetal food flavouring substances uniquely used in Japan. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 32(9) 1384–1396 (2015)

Ono A, Kobayashi K, Serizawa H, Kawamura T, Kato H, Matsumoto M, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Matsushima Y, Hirose A; A repeated dose 28-day oral toxicity study of  $\beta$ -bromostyrene in rats. *Fundam Toxicol Sci*, 2(4) 191–200 (2015)

松本真理子、清水将史、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6回化学物質共同評価会議概要 化学生物総合管理, 11, 37-45, 2015.

#### 学会発表

Honma M; Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines. 39th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society of India (2015.5、Impal, India)

Honma M; Ames QSAR Collaborative Study. ICCA LRI workshop (2015.6, New Orleans, USA)

本間正充；OECDテストガイドラインの変更点。JEMS・MMS研究会 第66回定例会 (2015.6、那須)

本間正充；ICH-M7ガイドラインとExpert Review 微生物変異試験研究会第53回定例会 (2015.11、福岡)

Morita T; GHS classification of CMR substances in EU and Japan, AsiaTox 2015、済州島、韓国、2015年6月23-26日。

森田 健；CMR物質のGHS分類比較：EUと日本、第42回日本毒性学会、金沢、2015年6月29日-7月1日。

森田 健；LD50値による毒性評価と行政利用、第37回日本中毒学会合同シンポジウム、和歌山、2015年7月17-18日。

Morita T, Hamada S, Masumura K, Honnma M; Detection of rodent carcinogens and non-carcinogens by in vivo erythrocyte micronucleus and transgenic rodent mutation tests, EEMS 2015, 23-27 August 2015, Prague, Czech Republic.

森田健、濱田修一、増村健一、本間正充；*In vivo* 赤血球小核試験とトランスジェニック齧歯類突然変異試験による齧歯類発がん物質の検出、日本環境変異原学会第44回大会、2015年11月27～28日、九州大学。

森田健、畝山智香子；カラメル色素中の4-メチルイミダゾールのリスク評価、日本環境変異原学会第44回大会、2015年11月27～28日、九州大学。

Hirose A, Hirata-Koizumi M, Kawamura T, Matsumoto M, Takahashi M, Nishimaki-Mogami T, Nishimura T, Ema M, Ono A; Derivation of subacute reference doses for drinking water quality management. The 51st EUROTOX2015 (2015.9, Porto, Portugal)

Nishimura T, Hirata-Koizumi M, Yamada T, Kawamura T, Ono A, Hirose A, Ema M; Derivation of the health advisory guidance values for sub-acute exposure of drinking water. Society of Toxicology 55th Annual meeting (2016.3, New Orleans, USA)

Ono A, Matsumoto M, Takahashi M, Kawamura T, Hirata-Koizumi M, Hirose A; Is a 14-day dose setting study able to predict its 28-day repeated dose toxicity?. The 51st EUROTOX2015 (2015.9, Porto, Portugal)

Hirose A; Japanese Current Chemical Regulation and Contribution to the OECD Cooperative Chemicals Assessment Programme (CoCAP). The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology. (2015.7. チェジュ、韓国)

Hirose A; Metal contaminants in drugs: ICH point of view. The 9th Congress of Toxicology in Developing Countries. (2015.10. ナタール, ブラジル)

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし