

平成 27 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

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

分担研究課題名：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 安全性予測評価部 第1室長

要旨

本研究では、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的とした研究を進めている。本年度は、類似物質について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った。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結果、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。また、（14 日間）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ない場合も多いが、短期試験においても、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ことが示唆された。

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、それらの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、我が国の化学物質規制法である化審法（「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」）では、良分解性物質や 10t 未満の物質（少量新規及び低生産量物質）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無しに申請可能であるが、そうした物質であっても可能な限り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、動物を用いた安全性試験により評価されているが、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、既に安全性評価が実施済みの化学物質に構造が類似する化学物質群については、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。また、これまでに評価済みの化学構造データをもとに様々な構造活性相関モデル構築の検討も進められているが、これまでのところ国際的にリスク評価に受け入れ可能とされたモデルはない。さらに、カテゴリーアプローチを始めとした構造類似物質の情報をもとにした評価手法は、既知情報から評価対象物質の評価を行う経験則に基づいており、用いたデータベースに毒性既知の類似物質の情報が得られていない、新規構造物質については予測不可能である。

そこで本研究では、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的とした研究を進めている。本年度は、類似物質について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った。

B. 研究方法

1. In vivo 反復毒性試験における予備試験結果と本試験結果の比較

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を行った。なお、最も多くの物質で実施されていた予備試験期間は、14日間であったことから、14日間反復投与試験を予備試験として実施された物質のみを本研究の解析対象とした。また、28日間試験と反復投与生殖発生併合試験では、本試験における投与期間が異なるため、分けて解析を行った。

2. 化学構造を指標とした in vivo 短期試験結果からの毒性クラス判定の検討

1で得られた解析結果について、さらに化学構造から評価可能な指標を用いて、化学物質の分類を行い、短期試験から信頼性の高い評価が可能な化学構造的特徴について検討を行った。本研究では、化学構造的特徴として、Cremerの毒性分類、分子量、水素結合ドナー、アクセプターの数について検討を行った。

3. 予備試験と本試験における無毒性量判定根拠の比較

2の解析結果において、Cremer毒性クラス1,2に分類された物質のうち、予備試験と本試験における無毒性量の比が大きい(5倍以上)物質について、予備試験と本試験における無毒性量判定根拠の比較を行い、無毒性量の比が大きくなる原因について考察した。

C. 研究結果

1. In vivo 反復毒性試験における予備試験結果と本試験結果の比較

解析を行った化学物質のうち、予備試験として14日間試験が実施された物質は、28日間試験(TG407)174物質、反復投与生殖発生併合試験(TG422)155物質であった。そのうち、14日間試験においてNOAELが求められた物質(TG407:96/174, TG422:97/155)について、14日間試験におけるNOAEL(NOAEL_14d)と本試験におけるNOAEL(NOAEL_28d)の相関比較を行った結果を図1に示した。TG407、TG422いずれの試験結果においても、NOAEL_14dとNOAEL_28dは良く相関し、幾つかの物質では、NOAEL_28dのほうがNOAEL_14dより高い結果であった。NOAEL_14dとNOAEL_28dの比の分布(図2)から、TG407、TG422いずれにおいても80%以上の物質で比が5倍以内であった。一方、14日間予備試験でNOAELが求めら

れなった物質(TG407: 35, TG422: 41)についての14日間試験におけるLOAEL_{14d}とNOAEL_{28d}の比は多くの場合で5倍以上であり、30%以上の物質では、比が10倍以上であった(図3)。

2. 化学構造を指標とした in vivo 短期試験結果からの毒性クラス判定の検討

1の解析結果からNOAEL_{14d}とNOAEL_{28d}は良く相関し、80%以上の物質ではNOAEL比(NOAEL_{14d}/NOAEL_{28d})が5倍以内であることが明らかとなった。一方で、約20%の物質では、NOAEL比が5倍以上で且つ、数は少ないものの10倍を超える物質もあることが明らかとなった。そこで、化学構造から評価可能なエンドポイントとしてCremer毒性クラス分類を行い、毒性クラスごとのNOAEL比の分布について検討を行った。Cremer分類の結果、毒性クラス2に分類された物質は数物質であったため、毒性クラス1,2と毒性クラス3の2グループに分けて、NOAEL比をNOAEL_{14d}に対してプロットした結果を図4に示した。TG407、TG422いずれにおいてもNOAEL比が大きな物質のほとんどは毒性クラス3に分類され、毒性クラス1,2のグループでNOAEL比が5倍を超える物質は、TG407実施2物質、TG422実施4物質であった。さらに、化学構造から計算可能な、基本的なとしてMolar Mass及び水素結合ドナー、アクセプターの数を計算してNOAEL比との関係について解析を行った結果を図5に示した。その結果、Cremerの毒性クラス分類によらず、NOAEL比が大きい物質では、Molar Massが小さく、及び水素結合ドナー、アクセプターの積数が少ない傾向が認められた。

3. 予備試験と本試験における無毒性量判定根拠の比較

2の解析結果において、毒性クラス1,2のグループでNOAEL比が5倍を超える、TG407実施2

物質、TG422実施4物質について、NOAEL比が大きくなった原因について検討を行う目的で、予備試験と本試験それぞれにおける無毒性量判定根拠について比較を行った結果を表1, 2に示した。これらの物質のNOAEL比は8から16倍であった。TG407実施2物質の本試験判定根拠は、いずれも病理組織学的変化であったが、予備試験において病理組織学的検査は実施されておらず、NOAEL比が大きくなった原因の一つとして考えられた。一方、TG422実施4物質のうち3物質の本試験判定根拠は、体重や臓器重量、もしくは血液生化学的検査結果であった。1物質(CAS No.1459-93-4)では、妊娠雌動物でのみ体重増加抑制が認められており、併合試験では妊娠による影響もNOAEL比の原因となる可能性が示唆された。一方、メチルシクロヘキサン(CAS No.108-87-2)では、予備試験、本試験で共通する所見としてコレステロール上昇が認められ、本試験では雄のみ最低用量から認められたと報告されているが、結果を確認したところ、本試験の雄、最低用量と中間用量におけるコレステロール値は同程度で用量相関性が無い、本試験では雌では認められていないことから、本試験における雄コントロール値が低かったため差が有意となった可能性も考えられた。

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を指標とした推定評価手法の実用化を目的とする。

これまでに反復投与毒性の構造活性相関手法については、肝毒性や腎毒性など毒性標的臓器ごとの毒性発現の評価モデルの構築などの検討が行われてきているが、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。様々な毒性メカニズムによる無毒性量を化学構造的特徴から予測するのは困難であるものの、非常に構造が類似した化学物質についての毒性情報が得られている場合には、カテゴリーアプローチを代表例とする毒性類推の手法が適用可能であることが示されており、一部では利用され始めている。しかし、カテゴリーアプローチを始めとした構造類似物質の情報をもとにした評価手法は、既知情報から評価対象物質の評価を行う経験則に基いており、用いたデータベースに毒性既知の類似物質の情報が得られていない、新規構造物質については予測不可能であるかもしくは予測結果が得られたとしてもその信頼性は低い。

そこで本研究では、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的とした研究を進めている。本年度は、類似物質について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った。

すなわち、反復投与毒性試験の実施にあたっては、ほとんどの場合、用量設定のための短期の予備試験が実施される。毒性の非常に強い一部の化学物質を除いて用量設定試験において無毒性量が得られることから、化学構造から評価可能な基本的な物性等の情報と組み合わせで予備試験レベルの短期試験で得られる無毒性量から、28日間試験相当の無毒性量を評価可能であれば、短期試験において無毒性量が得られた化学物質については、試験実施に必要な期間や動物数を半減することが可能である。

そこで本研究では、まず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を行った。その結果、予備試験としては 14 日間試験が最も多く実施されており、14 日間試験において NOAEL が求められた物質では、NOAEL 比 (NOAEL_{14d}/NOAEL_{28d}) は、80%以上の物質で 5 倍以内であった。その一方で、約 20%の物質では、NOAEL 比が 5 倍以上で且つ、数は少ないものの 10 倍を超える物質もあることが示された。そこで、Cremer 毒性クラス分類を実施して、毒性クラスごとの NOAEL 比の分布をみたところ、毒性クラス 1,2 のグループでは NOAEL 比が 5 倍を超える物質は数個であったのに対して、毒性クラス 3 には NOAEL 比が 5 倍を超える物質が多数分類された。Cremer 毒性分類は、毒性の強さを簡易分類するルールであるが、本研究結果は、投与の延長により毒性が強くと示される物質が毒性クラス 3 に分類されることを示唆していると考えられた。一方、化学構造から計算可能な基本的な物性と NOAEL 比との関係について解析した結果、NOAEL 比が大きい物質では、Molar Mass が小さく、及び水素結合ドナー、アクセプターの積数が少ない傾向が認められた。ただし、Molar Mass が小さい物質や水素結合ドナー、アクセプターの積数が少ない物質であっても、NOAEL 比が小さい物質は多く、これらの指標から直接判断をすることは難しく、Cremer 毒性分類との組み合わせ等、複数の指標の組み合わせによる評価を行う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。

一方、NOAEL 比の大きい物質について予備試験と本試験における無毒性量判定根拠の比較を行った結果、NOAEL 比が大きくなった原因として、本試験では病理組織学的変化が判定根拠であったが、予備試験において病理組織学的検査は実施されていないケース、併合試験で妊娠動物のみに影響が認められたケースなどが認められた。さらに、本試験で用量相関性が無い血液生化学的変

化を判定根拠している試験結果もあり、このようなケースでは、NOAEL 比は大きかったものの本試験における所見は毒性学的に重大なものではなく、予備試験における NOAEL の 5 倍以内と評価されたとしてもスクリーニングレベルの評価においては問題無いと考察された。

すなわち、本年度の研究結果から、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。また、(14 日間) 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ない場合も多いが、予備試験においても、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ことが示唆された。

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、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を指標とした推定評価手法の実用化を目的としている。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、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ている。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課題であるとともに、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。そのため本研究では、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の構築を目的としている。本年度の研究により、特定の化学構造的特徴を有する化学物質については、短期の動物試験結果からのスクリーニング評価が可能であることが示された。このアプローチは、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の評価に有用であるだけでなく、全ての化学物質の評価にも適用可能であると考えられる。

F. 研究発表

- 論文発表
- M. Hirata-Koizumi, S. Fujii, K. Hina, M. Matsumoto, M. Takahashi, A. Ono and A. Hirose ; 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)
- Y. Igarashi, N. Nakatsu, T. Yamashita, A. Ono, Y. Ohno, T. Urushidani and H. Yamada ; Open TG-GATEs: a large-scale toxicogenomics database.; *Nucleic Acids Res*, 43(Database issue) D921–D927 (2015)
- H. Okamura, H. Abe, Y. Hasegawa-Baba, K. Saito, F. Sekiya, S. Hayashi, Y. Mirokuji, S. Maruyama, A. Ono, M. Nakajima, M. Degawa, S. Ozawa, M. Shibutani and T. Maitani ; 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)

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

2 . 学会発表

- A. Hirose, M. Hirata-Koizumi, T. Kawamura, M. Matsumoto, M. Takahashi, T. Nishimaki-Mogami, T. Nishimura, M. Ema and A. Ono :Derivation of subacute reference doses for drinking water quality management. *The 51st EUROTOX2015* (2015.9, Porto, Portugal)
- T. Nishimura, M. Hirata-Koizumi, T. Yamada, T. Kawamura, A. Ono, A. Hirose and M. Ema :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)
- A. Ono, M. Matsumoto, M. Takahashi, T. Kawamura, M. Hirata-Koizumi and A. Hirose :Is a 14-day dose setting study able to predict its 28-day repeated dose toxicity?. *The 51st EUROTOX2015* (2015.9, Porto, Portugal)

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

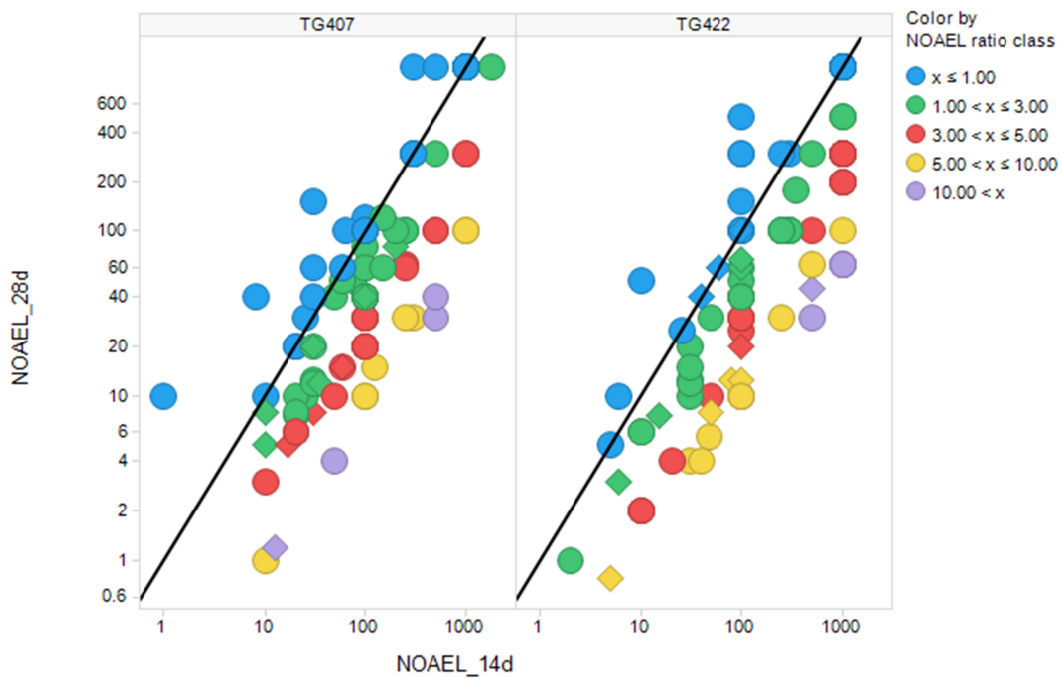


図1 14日間予備試験においてNOAELが求められた物質(TG407: 96/174, TG422: 97/155)の14日間NOAELと28日間NOAELの比較

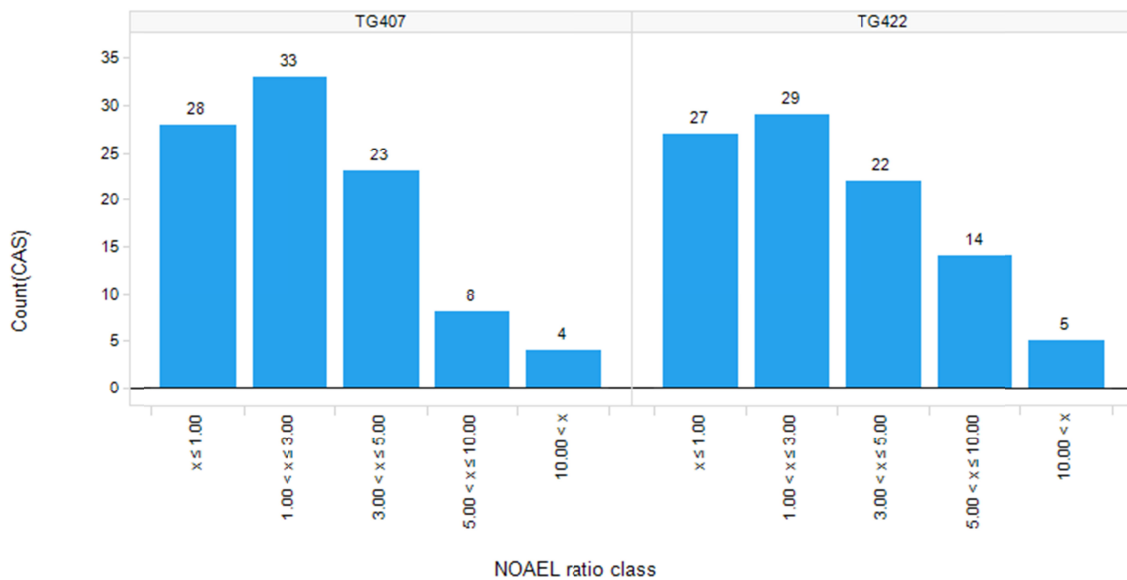


図2 14日間予備試験でNOELが求められた物質の14日間NOELと28日間NOELの比の分布

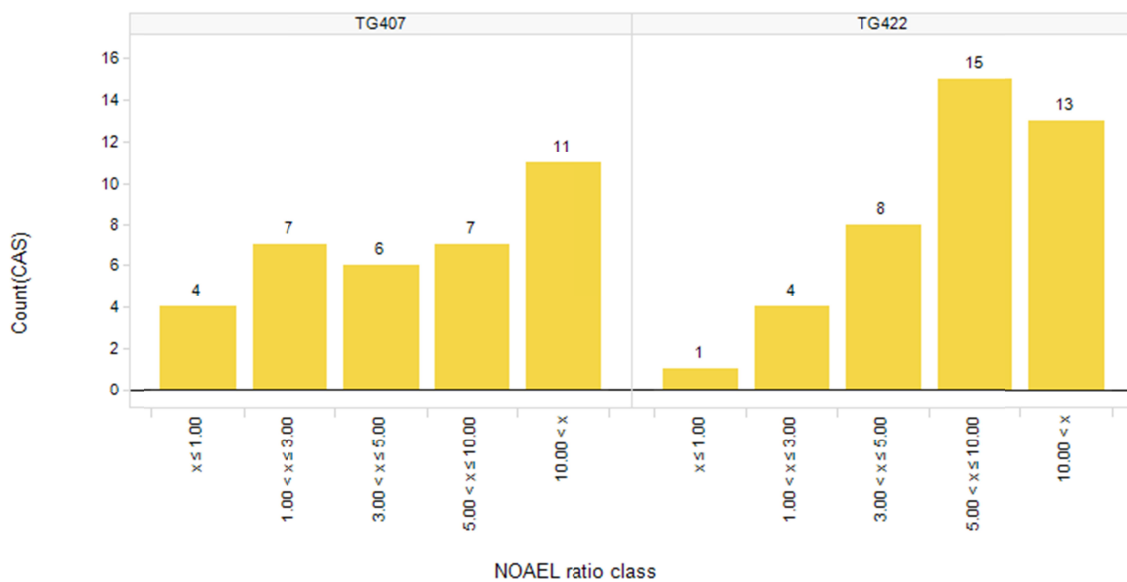


図3 14日間予備試験でNOELが求められなかった物質(TG407: 35, TG422: 41)の14日間LOELと28日間NOELの比の分布

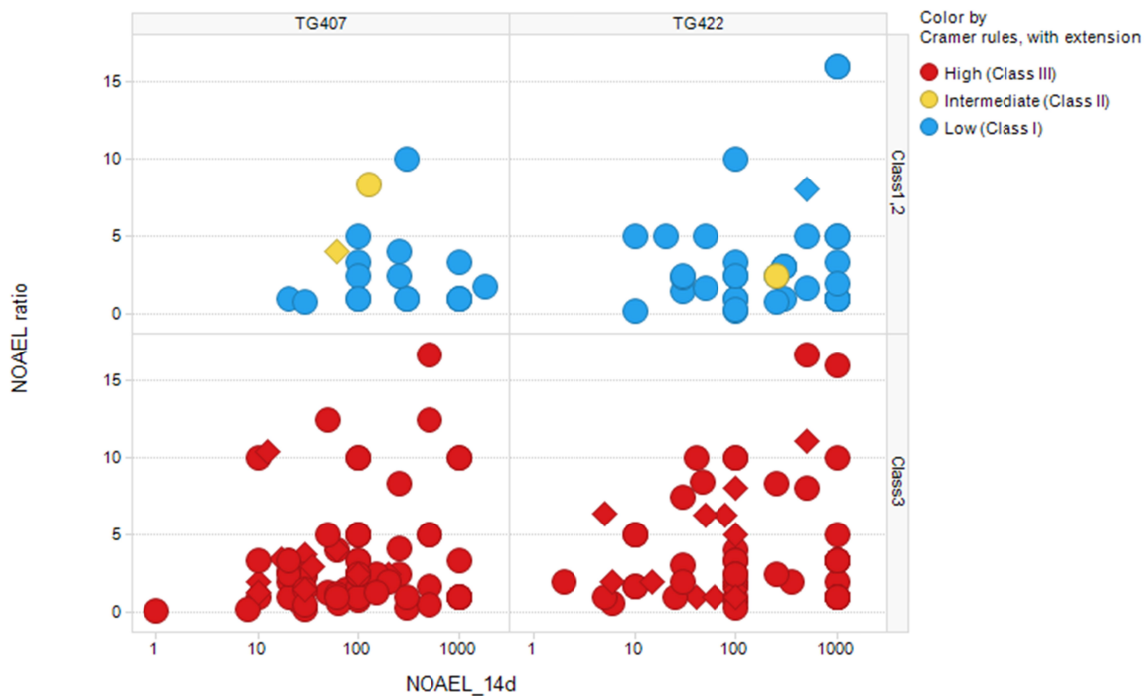


図4 Cramer ルールによる毒性クラス分類と NOAEL 比の関係

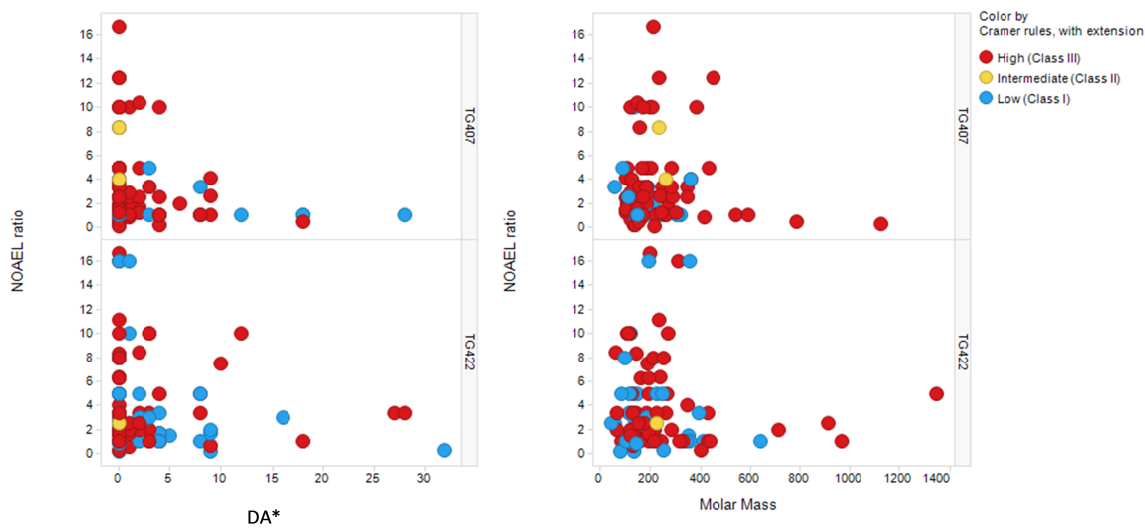


図5 化学構造から計算可能な基本的性質と NOAEL 比の関係

表1 Cremer 毒性クラス 1,2 で NOAEL 比 5 倍以上となった 28 日間試験(TG407)実施物質の毒性プロフィール

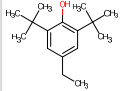
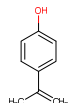


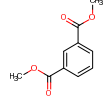
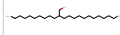
CAS RN	Chemical Name	NOAEL_28d (mg/kg/day) (dose level of main study)	Critical endpoint at LOAEL of main study	NOAEL_14d (mg/kg/day) (dose level of dose setting study)	Critical endpoint at LOAEL of dose setting study	NOAEL ratio (NOAEL_14d/ NOAEL_28d)	Chemical structure	Toxicity class of Cramer rules
4130-42-1	2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol	15 (15, 60, 250)	Liver:Hypertrophy, Thyroid:Hypertrophy, follicular cell(60m,f)	125 (125, 250, 500, 1000)	Liver, Kidney weight↑	8.3		Intermediate (Class II)
4286-23-1	4-(1-Methylethenyl)phenol	30 (30, 100, 300, 400)	Forestomach:Hypertrophy of squamous cells	300 (30, 100, 300)	-(LD50=600)	10.0		Low (Class I)

表2 Cremer 毒性クラス 1,2 で NOAEL 比 5 倍以上となった反復投与生殖発生併合試験(TG422)実施物質の毒性プロフィール

CAS RN	Chemical Name	NOAEL_28d (mg/kg/day) (dose level of main study)	Critical endpoint at LOAEL of main study	NOAEL_14d (mg/kg/day) (dose level of dose setting study)	Critical endpoint at LOAEL of dose setting study	NOAEL ratio (NOAEL_14d/ NOAEL_28d)	Chemical structure	Toxicity class of Cramer rules
90-02-8	2-Hydroxybenzaldehyde	10 (2.5, 10, 40, 160)	Liver:lipid droplet↓ (m), glycogen deposit↑(f) at 40mg/kg	100 (50, 100, 200, 400)	death(200(m1/5,f2/5), 400(m5/5,f4/5))	10.0		Low (Class I)
108-87-2	Methyl cyclohexane	62.5 (62.5, 250, 1000)	Cho (62.5m), Liver weight (1000m,f)	500 (200, 500, 1000)	Liver weight, TP,Cho↑(1000m,f)	8.0		Low (Class I)
1459-93-4	1,3-Benzenedicarboxylic acid, dimethyl ester	62.5 (62.5, 250, 1000)	Weak suppression of body weight increase was seen on female of reproductive test group at more than 250 mg/kg. But no effect on body weight of female of satellite group.	1000 (500, 1000)	-	16.0		Low (Class I)
58670-89-6	2-Decyl-1-tetradecanol	62.5 (62.5, 250, 1000)	PT, LDH (250m), UrinCl, K, Na (1000f)	1000 (100, 300, 1000)	-	16.0		Low (Class I)