

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(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(H27-化学-指定-005)

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 岡山大学・医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

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、化学構造から計算される記述子や部分構造をもとに無毒性量（解析には NOEL（無影響量）を用いた）を基準とした毒性クラスを判定する統計的予測評価モデルを構築してスクリーニング評価への適用性について検討を行った。予備的な検討の結果、分子量、水素結合供与基の有無が予測精度に影響することが示されたことから、分子量と水素結合供与基の有無により適用範囲を限定した評価モデルをそれぞれ構築して、複数の評価モデルを組み合わせて、NOEL で設定した毒性クラスの評価を行う評価スキームを構築した。モデル構築には、Munro らの報告による毒性試験データセットを学習母集団として用い、ターゲット基準値を 200mg/kg/day とした毒性クラス判定を行うモデルを構築し、既存化学物質点検データセットを外部検証用データとして予測精度の検証を行った結果、分子量適用範囲を、100~600 の評価スキームにおいて、sensitivity、specificity いずれも 80% を超える予測精度が得られたことから適用範囲（評価モデルの coverage は約 70%）の化学物質のスクリーニング評価における有用性が示された。

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、動物試験の削減と効率的な評価法が求められている。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の毒性情報をもとに化学構造との関連から安全性評価を行う構造

活性相関手法の開発が世界中で進められているが、特にヒト健康影響評価において求められる反復投与毒性試験で評価される *in vivo* 毒性についての構造活性相関による評価については、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評価モデルは開発されてない。一方、構造類似の化学物質群に含まれる幾つかの物質について得られている毒性情報をもとに、未評価の構造類似物質の毒性を類推評価するカテゴリーアプローチによる安全性評価の検討も進められており、既に一部で実用化されている。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カテゴリーの妥当性が判断されており、1つのカテゴリー評価を行うために非常に時間や労力がかかっているのが実情であり、またさらにカテゴリーアプローチによる評価の実施に十分な毒性情報が得られている化学物質群は限られている。

構造活性相関モデル及びカテゴリーアプローチは、既知情報から評価対象物質の評価を行う経験則に基づく手法であり両者に共通する問題点として、いずれの手法とも評価に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信頼できる評価や予測は不可能であることにある。

そこで本研究では、評価対象物質について既知情報からの評価が可能であるか判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、化学構造からの評価が可能と判断された物質については化学構造を指標として可能な限り効率的なリスク評価を行い、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を行う、段階的評価スキームを構築することにより、信頼性の高い効率的なリスク評価手法の開発を目的とした研究を進めている。本年度は、リスク評価において重要となる無毒性量評価のための化学構造記述子を用いた統計学的評価モデルの構築と検証を行った。

B. 研究方法

1. モデル構築のためのデータセットの準備

モデル構築のためのデータセットとして Munro ら(Munro IC et.al., (1996) *Food and Chemical Toxicology*, 34, 829-867) により、Cremer ルールの検証に用いられたデータセットを用いた。毒性試験の無毒性量(無影響量)は、用量設定にも依存することから Munro らの論文に掲載された毒性試験情報から、NOEL と LOEL を整理して、NOEL と LOEL いずれもが評価ターゲットとして設定した投与量に設定した無毒性量より低い物質を強毒性クラス、いずれもが高い物質を弱毒性クラスに分類し、NOEL と LOEL が、ターゲット投与量を挟む物質は除外してモデル構築に用いた。

2. 予備的なモデル構築による予測結果の解析

本研究に先立って、化学物質の反復投与毒性の強さ(NOEL)を定性的に評価するため、既存化学物質点検で実施された反復投与毒性試験結果について幾つかのNOEL基

準値により化学物質を分類する評価モデルの構築を実施したが、いずれのモデルとも評価精度が不十分（外部検証 70%未満）であったことから、全ての化学物質を一つのモデルで評価することは困難であると判断された。そのため、本研究では、まず予備的なモデル構築を実施した。

予備的なモデル構築のため評価ターゲット用量 200mg/kg/day で用意したデータセットを用い、ADMEWORKS/ModelBuilderにより記述子を用いた約 2000 モデルを構築して、内部検証より予測精度が高かった 4 モデルの予測結果を用いて予測精度の悪い物質の特徴について分子量や物性の解析を行った。

3. 物性を限定した無毒性量クラス分類モデルと評価スキームの構築

上記 2 で実施した予測結果の解析より、評価対象物質の分子量及び水素結合供与基の有無による予測精度への影響が示唆されたため、最終的なモデル構築においては、モデルの適用範囲となる分子量を MW=200~500 と MW=100~600 とした 2 モデルを構築した。また、水素結合供与基を持つ物質を対象としたモデルと水素結合供与基を持たない物質を対象としたモデルを構築して、分子量域を限定したモデルとの組み合わせで評価を行う評価スキームを構築した。モデル構築においては、Munro データセットから各モデルの適応範囲に該当する物質を学習母集団として選択して用いた。構築した評価スキームについて、化審法既存点検試験により毒性試験が実施された物質を外部検証用データとして、予測精度の検証を行った。

C. 研究結果

1. モデル構築のためのデータセットの準備

本研究では、Munro らのデータセットを学習母集団として、既存化学物質点検で得られたデータセットを外部検証集団として用いた。図 1 に、Munro らのデータセット (613 物質) から、解析ソフト ADMEWORKS/ModelBuilder (MB) で対応できない金属系、イオン系及び混合物を除外した 505 物質をターゲット投与量 200mg/kg/day で分類した NOEL、LOEL 分布を示した。横線の色は学習用クラス分類を示す。本研究ではターゲット投与量として 200mg/kg/day を設定した。図 1 において赤線で示す強毒性物質は 345 物質、青線で示す弱毒性は 138 物質であった。NOEL と LOEL が 200 mg/kg/day をまたぐ緑線で示す 22 物質は、学習母集団から排除した。外部検証の用いた既存化学物質点検データについても同様に分類して解析に用いた。

2. 予備的なモデル構築による予測精度の検証

Munro らのデータセット (613 物質) から、解析ソフト ADMEWORKS/ModelBuilder (MB) で対応できない金属系、イオン系及び混合物を除外した 505 物質のうち NOEL 基準 200 で分類された 483 物質 (強毒性: 345 物質、弱毒性 138 物質) を学習母集団として、パラメータを変更しながら約 2000 回のモデル構築を行い、予測精度の高い上位 4 モデルを用いて、既存点検データセット 183 物質、Munro データセット 483 物

質の分類を実施して、基本的な物性の予測精度の関連を検証した。図 2 には、学習母集団として用いた 483 物質中に類似度 85% 以上の類似物質が含まれない物質について、分子量分布と水素結合供与基の有無と全 4 モデルで正しく予測された物質と間違っ て予測された物質の分布を示す。結果より分子量が 200 未満もしくは 500 以上の物質では予測精度が悪く、一方、水素結合供与基の有無により予測精度に違いがあることが示された。

3. 物性を限定した無毒性量クラス分類モデルと評価スキームの構築

分子量の適用範囲を限定したモデルとして構築した分子量 200~500、100~600 を対象としたモデルの分子量適用範囲の物質については、分子量を限定したモデルと水素結合供与基の有無によるモデルの 2 モデルの評価結果が一致した場合のみ評価結果を採用し、分子量適用範囲外の物質については、水素結合供与基の有無によるモデルの評価結果のみから評価を行う評価スキームを構築した。図 3 に、分子量を限定したモデルと水素結合供与基の有無によるモデルの組み合わせにより評価を行う評価スキームを示した。構築した分子量 200~500 及び 100~600 の評価スキームについて Munro らのデータセットを用いた内部検証結果を図 4 と表 1 に、化審法既存点検データセットを用いた外部検証結果を図 5 と表 2 に示した。いずれの検証結果においても、NOEL200 モデルは、分子量 200~500 モデル、NOEL200-16 モデルは、分子量 100~600 モデルによる予測評価結果で、全物質（すなわち分子量モデルの適用範囲外

の物質については水素結合供与基の有無によるモデルのみの予測結果を採用) を評価対象とした場合と、各分子量モデルの適用範囲内の物質のみを評価対象とした場合の結果を示す。内部検証結果ではいずれのケースでも sensitivity は、90 以上を超えるものの specificity は、評価対象を分子量 200~500 の物質のみに限定した場合には、85% と高いものの評価対象を広げた他のケースでは、74~75% に低下した。一方、外部検証では分子量 100~600 のモデルを用いた場合、sensitivity = 92%、specificity = 80% を達成した。分子量 200~500 モデルにおいても同程度の予測精度が得られたものの、coverage は 30% であった。これは、既存化学物質データセットには分子量 200 未満の化学物質が多く含まれることによるものである。

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した研究を進めている。

反復投与毒性の構造活性相関手法については、これまでに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、スクリーニングレベルのリスク評価における *in vivo* 反復毒性試験においては、毒性の強さに応じた化学物質の管理のため、毒性の起さない用量である無毒性量を明らかにすることが重要な目的である。様々な毒性メカニズムによる毒性が根拠となる無毒性量を

化学構造的特徴から単一の手法で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きている。一方で、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、これまでに蓄積された毒性情報をもとに化学構造からスクリーニングレベルの評価が可能な物質については化学構造からの予測評価を行い、類似物質の情報が不十分等の理由から化学構造からの予測が困難な物質についてのみ毒性試験を実施することにより評価の効率化をはかる、段階的評価スキームの構築を進めている。

本年度は、化学構造から計算される記述子や部分構造をもとに無毒性量（解析にはNOEL（無影響量）を用いた）を基準とした毒性クラスを判定する統計的予測評価モデルを構築してスクリーニング評価への適用性について検討を行った。本研究に先立って、化学物質の反復投与毒性の強さ（NOEL）を定性的に評価するため、既存化学物質点検で実施された反復投与毒性試験結果を学習母集団として用いた評価モデルを構築したものの、十分な予測精度を得られなかつ

た。そこで本研究では、まず予備的なモデル構築を実施した結果、分子量、水素結合供与基の有無が予測精度に影響することが示された。この結果より、全ての化学物質を一括して同一のモデルで評価するのは困難であり、適用範囲を限定した評価モデルのほうが高精度の評価を行えることを示している。そこで本研究では、分子量適用範囲を、200~500 と 100~600 に限定した評価モデルと、水素結合供与基の有無を適用範囲とした評価モデルを構築し、これらを組み合わせて評価を行う評価スキームを構築した。また、モデル構築には、既存化学物質データセットより多くの化学物質情報を含むMunroらの報告による毒性試験データセットを学習母集団として用い、ターゲット基準値を200mg/kg/dayとした毒性クラス判定を行うモデルを構築し、既存化学物質点検データセットを外部検証用データとして予測精度の検証を行った。結果として、分子量適用範囲を、100~600の評価スキームを用い評価対象分子量を100~600とした場合において、ある程度のカバー率（68%）を確保した高精度の予測が可能であることが示された。さらに、分子量適用範囲100~600の評価スキームでは全物質対象の評価結果においても sensitivity は、若干下がるものの sensitivity、specificity いずれも80%を超える予測精度が得られたことから、本研究で構築した評価スキームはスクリーニング評価において十分実用的であると考察される。一方で、分子量適用範囲100~600の評価スキームでは全物質対象とした場合でも、coverage が77%であった。これは、分子量適用範囲内の物質のうち、分子量モデルと水素結合供与基モデルの評価

結果が一致しないため判定結果が得られなかった物質が多くあることによる。本研究では、化学構造からの評価手法として本年度、検討を進めた統計的モデルとは別に、より単純な化学構造類似性を指標とした評価手法について検討を進める予定をしている。今後、評価のベースとなるデータセット内に類似物質情報が得られていれば、化学構造類似性を指標とした評価手法による適用範囲の拡大について検討を進める予定である。

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、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 *in vivo* 反復投与による毒性の強さの評価については、評価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、カテゴリーアプローチのような評価が、ある程度、可能であることが示されている一方で、多様な化学構造の化学物質を一括して評価する評価モデルの構築は難しく、本研究における予備的な検討においても実用レベルの予測精度を達成することは困難であることが示された。一方、本研究の結果から、評価対象化学物質の適用範囲を限定することで実用可能な予測精度のモデルを構築可能であることが示された。すなわち全ての化学物質について同一のルールやモデルで評価を行うアプローチよりも化学物質ごとに適用可能な評価手法を判定

した上で選択して評価を行う評価スキームのほうが信頼性も実用性は高いと考えられる。本年度構築した評価モデルの適用範囲の化学物質については、評価モデルから信頼性の高いスクリーニング評価が可能であることが示された。本研究で構築を進めている、化学構造から適用可能な評価手法を判定し、評価を行う評価スキームは、評価未済みの化学物質のスクリーニング評価の効率化へ寄与すると結論された。

F. 研究発表

論文発表

1. M. Matsumoto, H. Todo, T. Akiyama, M. Hirata-Koizumi, K. Sugibayashi, Y. Ikarashi, A. Ono, A. Hirose and K. Yokoyama ; Risk assessment of skin lightening cosmetics containing hydroquinone.; Regul Toxicol Pharmacol, 81,128–135 (2016)
2. M. Hirata-Koizumi, R. Ise, H. Kato, T. Matsuyama, T. Nishimaki-Mogami, M. Takahashi, A. Ono, M. Ema and A. Hirose ; Transcriptome analyses demonstrate that Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) activity of an ultraviolet absorber, 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole, as possible mechanism of their toxicity and the gender differences.; J Toxicol Sci, 41,(5) 693–700 (2016)

学会発表

1. A. Ono, J. Ciloy, M. Matsumoto, M. Takahashi, T. Kawamura and A. Hirose :Development and validation of a QSAR model to classify chemicals for toxic potency of sub-acute repeated dose toxicity. 17th International Conference on QSAR in enviromental and health sciences (2016.6, Miami Beach, Florida, USA)
2. A. Ono, H. Jinno and A. Hirose :Comparative analysis of respiratory and skin sensitization potential of chemicals using Japanese GHS classification.. The 52nd Eurotox2016 (2016.9, Sevilla, Spain)
3. A. Ono, H. Jinno and A. Hirose :Evaluation of the OECD QSAR Toolbox in the screening of chemical sensitizer.. The 14th International Congress of Toxicology (2016.10, Merida, Mexico)

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

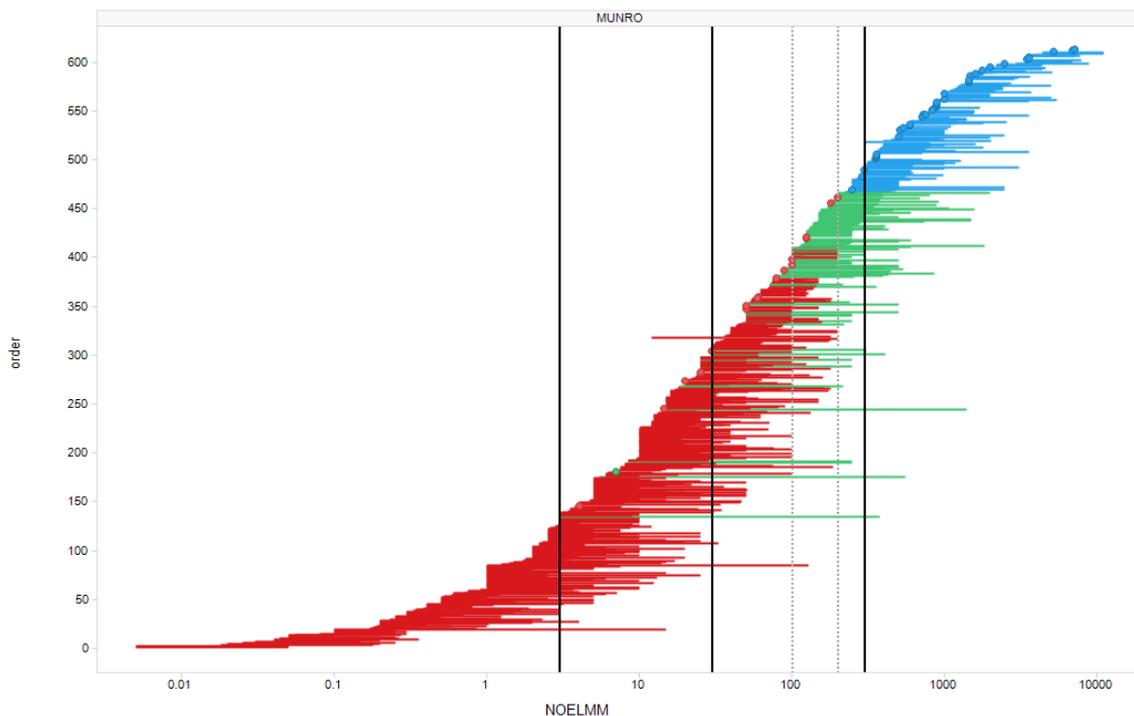


図1 動物試験の NOEL-LOEL 範囲による毒性クラス分類

; 学習母集団として用いた Munro IC et.al., (Food and Chemical Toxicology, 34, 829-867, 1996) のデータセットを投与量 200mg/kg/day でクラス分類した結果を示す。(各横線は化学物質の NOEL と LOEL の範囲を、線の色は、毒性クラス (赤: 強毒性、緑: 未分類、青: 弱毒性) を示す)

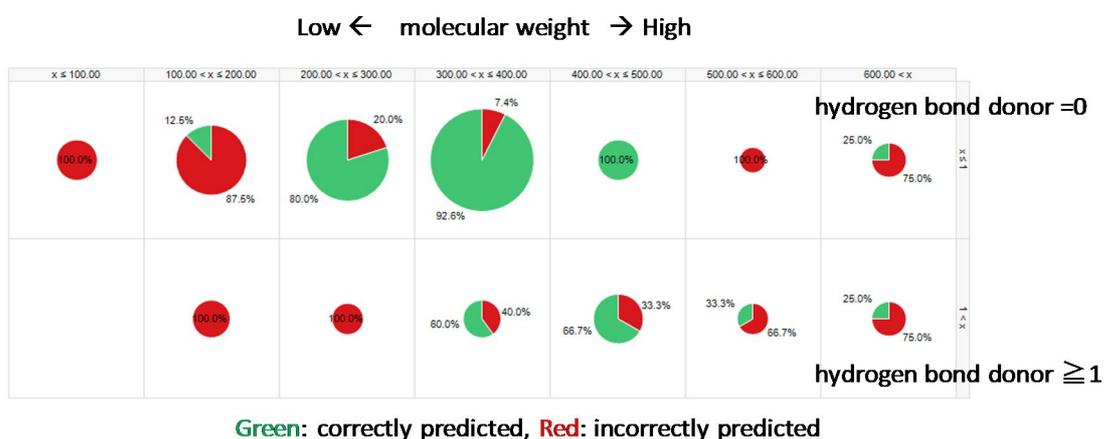


図2 分子量と水素結合供与基の有無による予測精度の関係

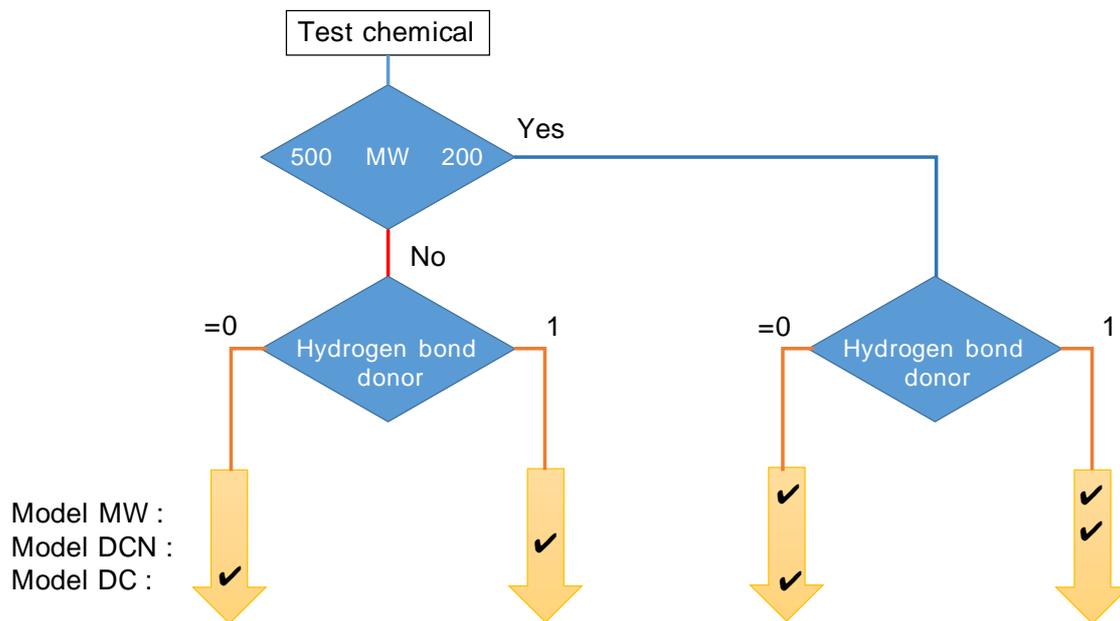


図3 分子量モデルと水素結合供与基モデルの組み合わせによる評価スキーム

；図は分子量 200～500 のモデルを用いた場合の評価スキームを示す。(Model MW : 分子量モデル、Model DCN : 水素結合供与基を有する物質を対象とした評価モデル、Model DC : 水素結合供与基を持たない物質を対象とした評価モデル)

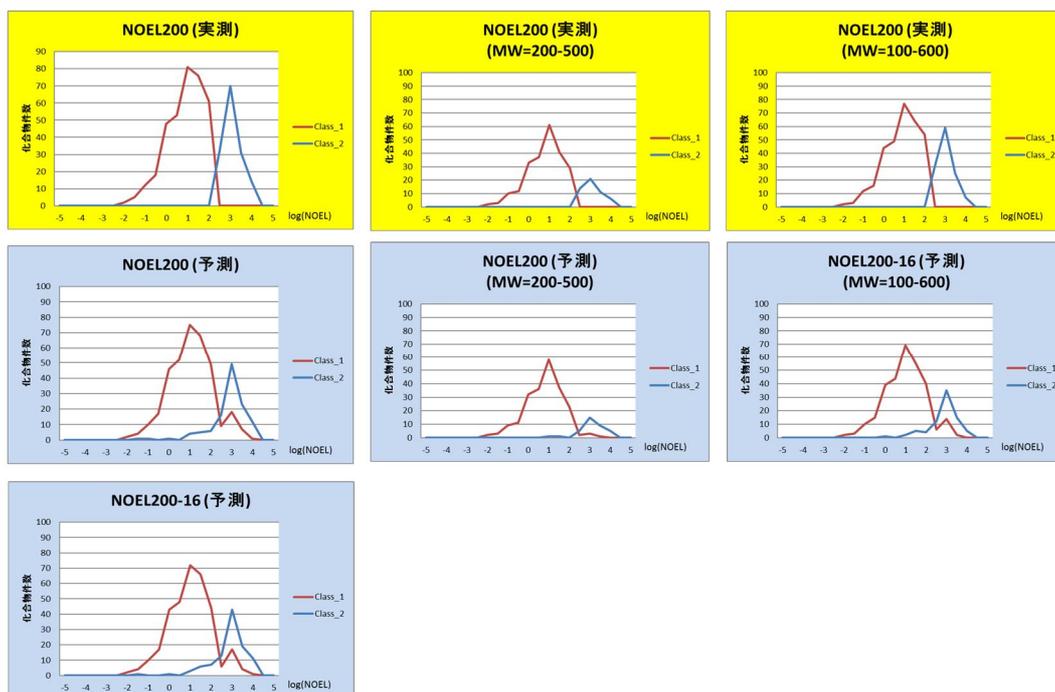


図 4 組み合わせ評価スキームによる内部検証結果

；動物試験結果（実測）による毒性クラスと予測モデルによる毒性クラスに分類された化学物質の NOEL 分布を示す。

表 1 組み合わせ評価スキームによる内部検証結果

モデル名	NOEL200	NOEL200-16	NOEL200 (MW=200-500)	NOEL200-16 (MW=100-600)
評価対象	全物質	全物質	MW=200-500の 物質のみ	MW=100-600の 物質のみ
TN	100	86	34	67
FP	35	28	6	22
TP	323	306	211	277
FN	18	18	2	12
ALL	476	438	253	378
COVERAGE	0.95	0.87	0.50	0.75
CONCORDANCE	0.89	0.89	0.97	0.91
SPECIFICITY	0.74	0.75	0.85	0.75
SENSITIVITY	0.95	0.94	0.99	0.96

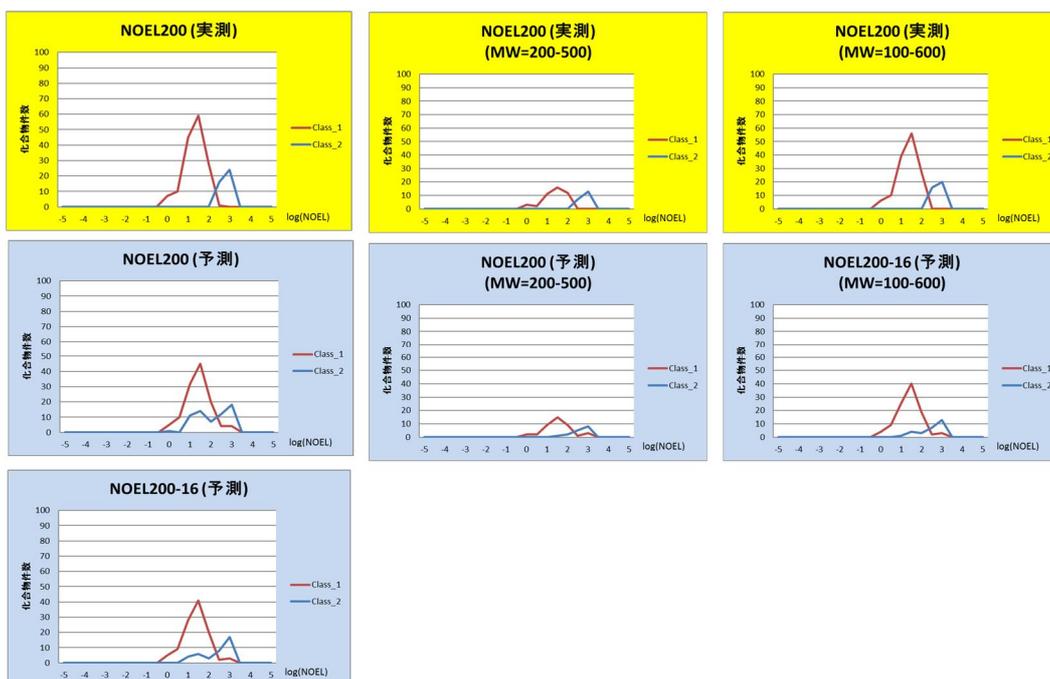


図5 組み合わせ評価スキームによる外部検証結果

；動物試験結果（実測）による毒性クラスと予測モデルによる毒性クラスに分類された化学物質の NOEL 分布を示す。

表2 組み合わせ評価スキームによる外部検証結果

モデル名	NOEL200	NOEL200-16	NOEL200 (MW=200-500)	NOEL200-16 (MW=100-600)
評価対象	全物質	全物質	MW=200-500の 物質のみ	MW=100-600の 物質のみ
TN	29	24	13	20
FP	8	5	4	5
TP	112	103	37	97
FN	34	14	3	8
ALL	183	146	57	130
COVERAGE	0.96	0.77	0.30	0.68
CONCORDANCE	0.77	0.87	0.88	0.90
SPECIFICITY	0.78	0.83	0.76	0.80
SENSITIVITY	0.77	0.88	0.93	0.92

