

平成 29 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 岡山大学・医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨

本研究では、反復投与毒性による無毒性量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、化学構造の類似する化学物質で得られている無毒性量からの評価対象物質の無毒性量評価の可能性について検討を行うため、データベースに含まれる毒性情報既知の化学物質との構造類似度と無毒性量の近似についての解析、化学構造記述子や部分構造をもとに無毒性量を判定する統計的予測評価モデルにおけるモデル構築に用いた化学物質に含まれる評価対象物質との構造類似物質の数と評価精度との関係について検証を行った。化審法で 28 日間試験が実施された化学物質を対象として化学物質間との構造類似度と無毒性量の近似について総当たり解析を行った結果、構造類似度が高いほど無毒性量の近似が認められ、データベースに類似度が 70% を上回る物質の情報が 3 物質以上で得られていない物質では構造類似性からの無毒性量評価は困難であることが示された。一方、昨年度構築した記述子や部分構造をもとに無毒性量を 2 クラス分類する評価モデルにおける評価精度についてモデル構築に用いた物質に含まれる評価対象物質の構造類似物質数との関係について解析を行った結果、分類モデルの評価精度に構造類似物質数との関連は認められず、既存データセット中に構造類似物質の情報が得られていない物質であっても評価可能であることが明らかとなった。得られた結果より評価に用いるデータベース中に含まれる構造類似物質の情報の有無により評価に用いる手法やモデルを組合せて選択して用いることで、信頼性の高い無毒性量の評価が可能であ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いるが、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、基本的な化学構造の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、化学構造の類似する化学物質で得られている無毒性量からの評価対象物質の無毒性量評価の可能性について検討を行うため、データベースに含まれる毒性情報既知の化学物質との構造類似度と無毒性量の近似についての網羅的解析による検討を行った。またあわせて、昨年度までに構築した化学構造記述子や部分構造をもとに無毒性量を判定する統計的予測評価モデルにおけるモデル構築に用いた化学物質に含まれる評価対象物質との構造類似物質の数と評価精度との関係について検証を行った。

B. 研究方法

1. 構造類似度と反復投与毒性試験における無毒性量の近似度の総当たり解析による

構造類似物質からの反復投与毒性試験における無毒性量の予測性の検討

化審法既存点検により 28 日間試験が実施されて無毒性量 (NOEL) が得られており、化学構造が明らかな 234 物質を解析の対象とした。234 物質の 2D 化学構造を sdf ファイルで整理して、extended 型の fingerprint を生成し tanimoto 係数による構造類似度を総当たり計算した。構造類似度の計算には、R 3.0.2 の RCDK パッケージを用いた。

無毒性量の近似度評価のためには、構造類似度の総当たり計算に用いた 234 物質相互について反復投与毒性試験による無毒性量 (NOEL) の比 (NOEL) を総当たり計算し、各物質間相互の構造類似度と NOEL 比との関係について解析を行った。構造類似度と NOEL 比との関係から類似度 70% 未満の物質では NOEL 比が増大し無毒性量の近似が認められないことから、類似度 70% 以上の類似物質の NOEL 値からの評価対象物質の NOEL 値の予測性について、データベース中に含まれる構造類似物質数との関係について解析を行った。

2. 構造記述子を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデルにおける判別性能とモデル構築に用いたデータセットに含まれる構造類似物質数の関係

上記 2 の解析より化学構造全体の類似度からの無毒性量の予測性は、データが得られている構造類似物質の類似度と数に依存することが示されたため、昨年度、構築した構造記述子と部分構造を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデルにおける評価対象物質の判別性能とモデル構築に用いたデータセットに含まれる構造類似物質数の関係に

ついて解析を行った。判別モデル構築に用いた Munro ら (Munro IC et.al., (1996) Food and Chemical Toxicology, 34, 829-867) のデータセットと評価対象に用いた化審法既存点検物質の構造類似度を 1 . と同様に総当たり計算してモデル構築データセット中に含まれる構造類似物質数と判別結果との関係について解析を行った。

C. 研究結果

1. 構造類似度と反復投与毒性試験における無毒性量の近似度の総当たり解析による構造類似物質からの反復投与毒性試験における無毒性量の予測性の検討

図 1 に解析に用いた 234 物質×234 物質の構造類似度と NOEL 比 (対数) との関係を示す。構造類似度 (Similarity) が低くなると NOEL 比の分布が広くなり、構造類似度がおおよそ 70% 未満では無毒性量の近似は認められないことが明らかに示された。一方、構造類似度 70% 以上であっても個別の物質間の NOEL 比は対数軸で 1 以上の分布 (10 倍以上) を示すことから、次に複数の構造類似物質の無毒性量からの予測性について検討を行った。まず始めに 234 物質それぞれについての構造類似度 70% 以上の類似物質数について確認を行った。図 2 に類似物質数ごとの物質数の分布を示す。評価に用いた 234 物質のうち 96 物質については、対象とした物質セット中に構造類似度 70% 以上の類似物質が存在せず、一方、類似物質数が 3 物質を超える物質は、57 物質に留まった。同様に構造類似度 80% 以上を基準とした場合、140 物質については類似物質が存在せず、類似物質数が 3 物質を超える物質は、25 物質であった (data not

shown)。そこで、構造類似度 70%以上の類似物質が存在する物質について、類似物質の NOEL と評価対象物質との関係について更に検討を行った。図 3 に構造類似度 70%以上の物質の NOEL 平均値、対数平均値および中央値と評価対象物質の NOEL との比を構造類似物質数に対して示した。構造類似物質数が 2 物質以下の場合、NOEL 比の分布が非常に大きく、構造類似物質数 3 もしくは 4 物質を超える場合、構造類似物質の NOEL から計算される値と評価対象物質の NOEL が約 5 倍程度に収束することが示された。一方、構造類似物質数は最大で 17 物質であったが、4 物質以上では構造類似物質の NOEL から計算される値と評価対象物質の NOEL の比の分布に大きな違いは認められなかった。図 4 には、評価対象物質の NOEL に対する構造類似物質の NOEL から計算される値を示した。図中の直線はそれぞれの計算値の回帰直線である。回帰直線に大きな違いは認められないものの単純な平均値や中央値では、対数平均値に比べ、評価対象物質の NOEL より大きな値となる傾向が示された。

2. 構造記述子を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデルにおける判別性能とモデル構築に用いたデータセットに含まれる構造類似物質数の関係

図 5, 6 に昨年度、構築した構造記述子と部分構造を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデル 2 種 (NOEL 100 と 200 を評価基準としたモデル) における評価対象物質の判別結果とモデル構築に用いたデータセットに含まれる評価対象物質の構造類似度 70%以上の類似物質数との関係を示した。

いずれのモデルにおいても、類似物質数と判別精度に明らかな関係は認められず、既知情報として得られている物質群に含まれる類似物質が無いもしくは限られている場合であっても 80%程度の判別精度が得られることが示された。

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、化学物質管理のための定量的リスク評価において、*in vivo* 反復毒性試験では、無毒性量を明らかにすることが求められている。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な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データベースに含まれる既知情報からの評価の可否を判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、構造類似性等の観点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と判定される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、化学構造の類似する化学物質で得られている無毒性量からの評価対象物質の無毒性量評価の可能性について検討を行うため、データベースに含まれる毒性情報既知の化学物質との構造類似度と無毒性量の近似についての網羅的解析による検討を行った。その結果、化学物質全般の傾向として、類似度が高いほど無毒性量は近似し、類似度が70%より低い物質では無毒性量にほとんど近似が認められないことが明らかとなり、構造類似度が高い複数の物質について毒性試験情報が得られていれば、ある程度の評価は可能であると考察された。一方、構造類似物質が1つや2つでは、予測結果のばらつきが大きく、3つないしは4つ以上の構造類似物質について情報が得られている場合でないと予測信頼性は低く、また、3物質以上の構造類似物質について情報が得られている場合であっても、情報が得られている物質間で無毒性量や毒性所見が大きく異なる場合には注意が必要であると考察される。本研究では類似度の指標として一般によく用いられる指標である tanimoto 係数を用いたが、類似度の指標には様々な指標が開発されており、今後は他

の指標についても検討の余地があると考察される。他方、本年度の検討では、昨年度までに構築した化学構造記述子や部分構造をもとに無毒性量を判定する統計的予測評価モデルにおけるモデル構築に用いた化学物質に含まれる評価対象物質との構造類似物質の数と評価精度との関係についても検証を行った。検証の結果、統計予測モデルの評価結果について、モデル構築に用いたデータセット中の評価対象物質の類似物質の有無との明確な関係は認められず、構造類似物質について情報が得られていないもしくは限られている場合には、記述子等を用いた予測モデルによる判定結果のほうにむける信頼できると考察された。すなわち、データベース中に含まれる構造類似物質の類似度や物質数に応じて類似物質からの計算される無毒性量近似値と構造記述子を用いた統計予測モデルによる判定結果を比較することでそれぞれの予測結果の信頼性について検討を行い、既知情報から無毒性量判定の可否を判断することが重要であると考察される。構造類似物質からの予測もしくは毒性クラス判別モデルのいずれも手法も適用範囲外となる化学物質については、従来どおり動物試験による評価が行われるべきであるが、評価の基礎となるデータセットとして類似物質の情報が得られれば、適用範囲(適用可能な化学物質)を拡大可能であり、反復投与毒性評価における構造活性相関手法の適用拡大のためには、既知情報の追加によるデータベースの拡充が重要である。

E. 結論

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、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既知情報からの予測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、多くの化学物質について個別にカテゴリーアプローチを適用して評価を行うのは困難である。

本研究の結果から、類似構造の物質について毒性情報が得られていれば、化学構造から機械的に計算可能な構造類似度を指標とした無毒性量の近似評価が可能であることが示された。一方、構造類似物質についての情報が限られている場合には、昨年度までに構築した構造記述子等を用いた統計予測モデルによる評価のほうがむしろ信頼性が高いことが示された。いずれの手法による予測結果にも、ある程度の不確実性を含むものの、これらの手法を適用な化学物質については、スクリーニングレベルでの評価においては適用可能な予測が可能であると結論される。一方、いずれの手法も適用範囲外と判断される化学物質については、従来どおり動物試験による反復投与毒性の評価が要求されるものの、評価の基礎となるデータベースの拡充により適用範囲（適用可能な化学物質）を拡大可能であり、将来的には多くの化学物質について少なくともスクリーニングレベルの評価においては、既知情報からの予測評価が可能となると結論され

る。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Saito, Y. Hasegawa-Baba, F. Sekiya, S. Hayashi, Y. Mirokuji, H. Okamura, S. Maruyama, A. Ono, M. Nakajima, M. Degawa, S. Ozawa, M. Shibutani and T. Maitani ; Japan Flavour and Fragrance Materials Association's (JFFMA) safety assessment of food-flavouring substances uniquely used in Japan that belong to the class of aliphatic primary alcohols, aldehydes, carboxylic acids, acetals and esters containing additional oxygenated functional groups.; *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 34,(9) 1474–1484 (2017)

2. 学会発表

A. Ono, S. Watanabe, T. Sugawara, K. Wakabayashi, Y. Tahara, N. Horie, K. Fujimoto, K. Kusakari, Y. Kurokawa, T. Sozu, T. Nakayama, T. Kusao, T. Kawakami, K. Kojima, H. Kojima, J. Richmond, N. Kleinstreuer, K. Bae-Hwa, Y. Yamamoto, M. Fujita and T. Kasahara :A multi-centre validation study of Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) - a novel in chemico alternative test method for skin sensitization. *Society of*

Toxicology 55th Annual meeting
(2018.March, San Antonio, USA)

小野 敦, 渡辺 真一, 菅原 経継, 若林 晃
次, 田原 宥, 堀江 宣行, 藤本 恵一,
草苅 啓, 黒川 嘉彦, 寒水 孝司, 中山
拓人, 草生 武, 河上 強志, 小島 幸一,
小島 肇, J. Richmond, K. Nicole, K.
Bae-Hwa, 山本 裕介, 藤田 正晴, 笠
原 利彦 :新規*in chemico*皮膚感作性試
験ADRA法の多施設バリデーション試
験 : 第2報. *日本実験動物代替法学会*
第30回年会 (2017.11, Tokyo)

A. Ono, Y. Hiraoka, A. Hirose, and H.
Jinno :Comparative analysis of
respiratory, skin and eye irritation
potential of chemicals using
Japanese GHS classification.. *The*
53nd Eurotox2017 (2017.9,
Bratislava, Slovak)

A. Ono, S. Watanabe, T. Sugawara, K.
Wakabayashi, Y. Tahara, N. Horie,
K. Fujimoto, K. Kusakari, Y.
Kurokawa, T. Sozu, T. Nakayama, T.
Kusao, T. Kawakami, K. Kojima, H.
Kojima, J. Richmond, N.
Kleinstreuer, K. Bae-Hwa, Y.
Yamamoto, M. Fujita and T.
Kasahara :Phase-1 of the validation
study of Amino acid Derivative
Reactivity Assay (ADRA): a novel *in*
chemico alternative test method of
skin sensitization.. *Tenth World*
Congress Alternatives and Animal
Use in the Life Sciences (2017.8,
Washington State Convention
Center, Seattle, Washington)

小野 敦, 渡辺 真一, 菅原 経継, 若林 晃
次, 田原 宥, 堀江 宣行, 藤本 恵一,
草苅 啓, 黒川 嘉彦, 寒水 孝司, 中山
拓人, 草生 武, 河上 強志, 小島 幸一,
小島 肇, J. Richmond, K. Nicole, K.
Bae-Hwa, 山本 裕介, 藤田 正晴, 笠
原 利彦 :新規*in chemico*皮膚感作性試
験ADRA法の多施設バリデーション試
験 : 第1報. *第44回日本毒性学会*
(2017.7, Yokohama)

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

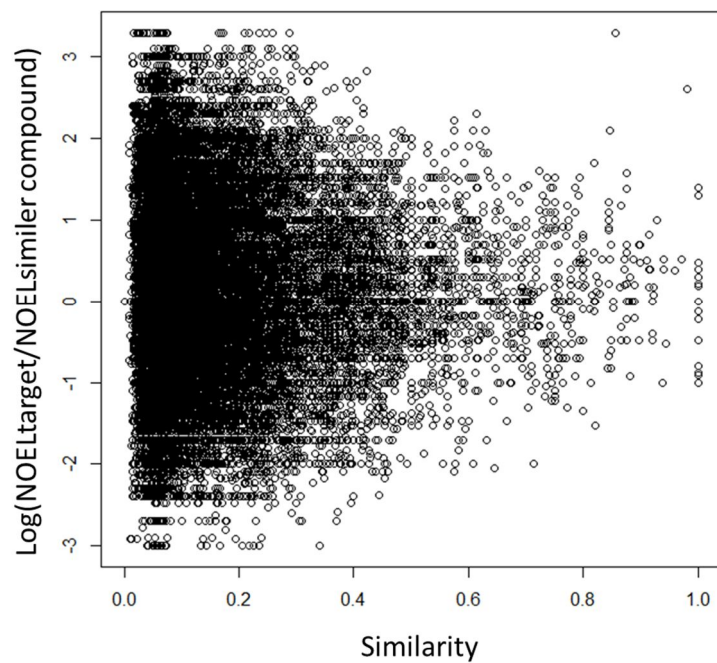


図 1 化学構造類似度 (similarity) と NOEL 比 (Log(NOELtarget/NOELsimilar compound))の関係

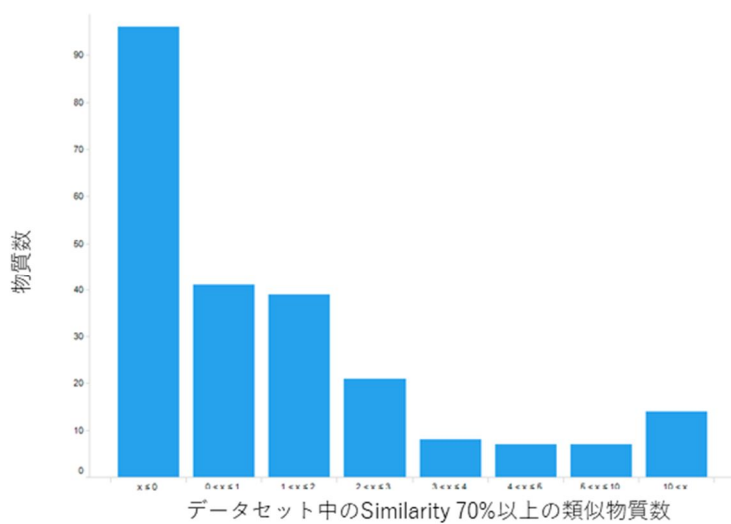


図 2 化審法 234 物質における類似度総当たり計算において similarity:70%以上の類似物質数の分布

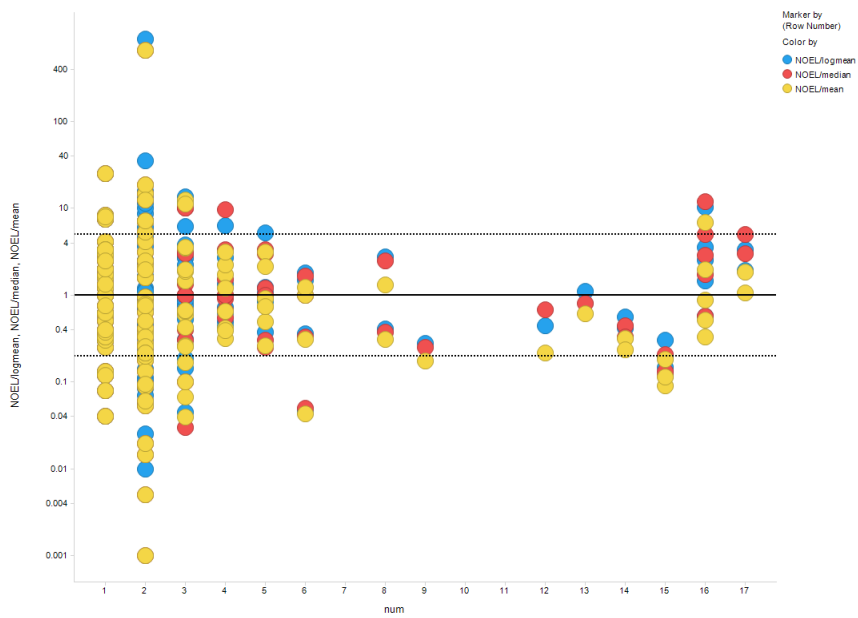


図3 評価対象物質のNOELと構造類似物質のNOEL 平均値(中央値)との関係(比)における構造類似物質数の影響

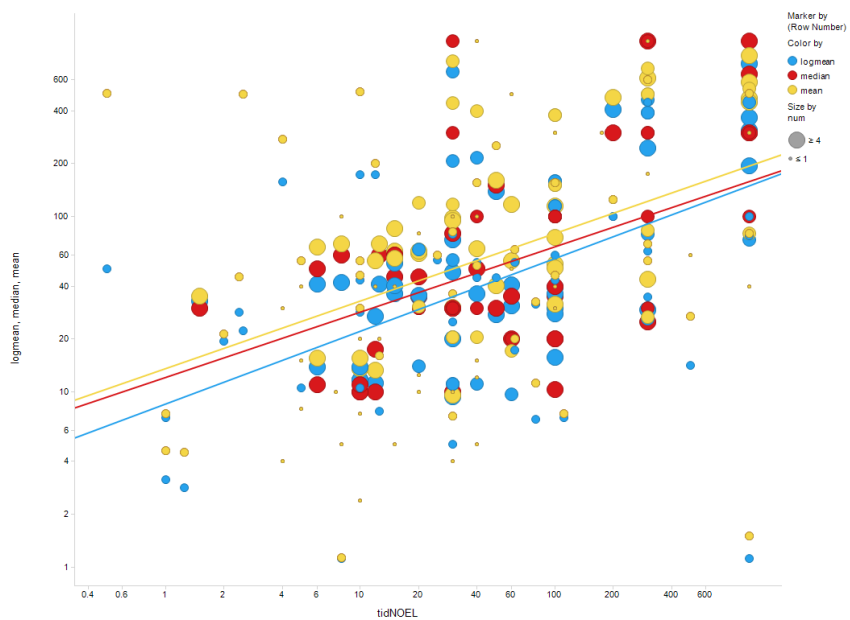


図4 評価対象物質のNOELと構造類似物質のNOEL 平均値(中央値)との関係(比)における構造類似物質数の影響

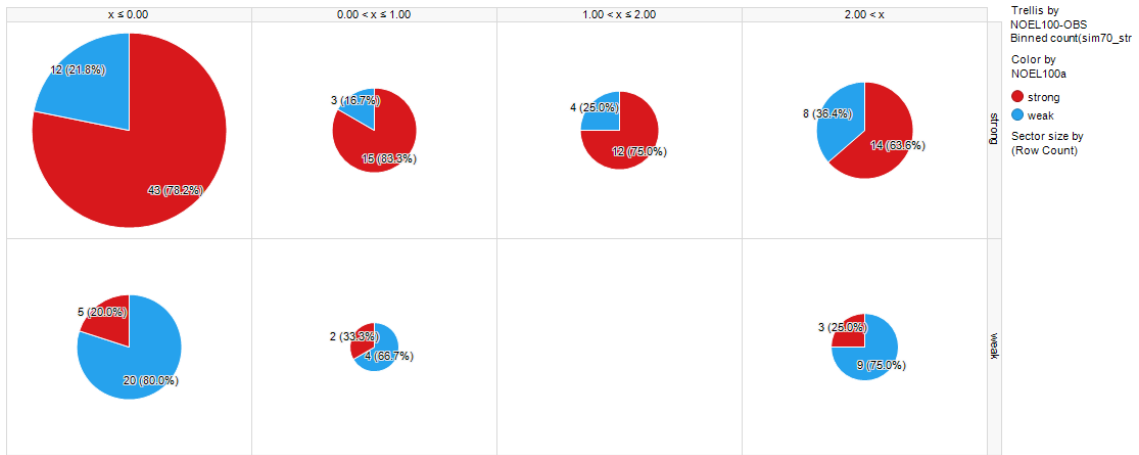


図5 構造記述子を用いた2クラス判別モデル (NOEL 100 基準) のトレーニング化合物における構造類似物質数と予測判別率の関係

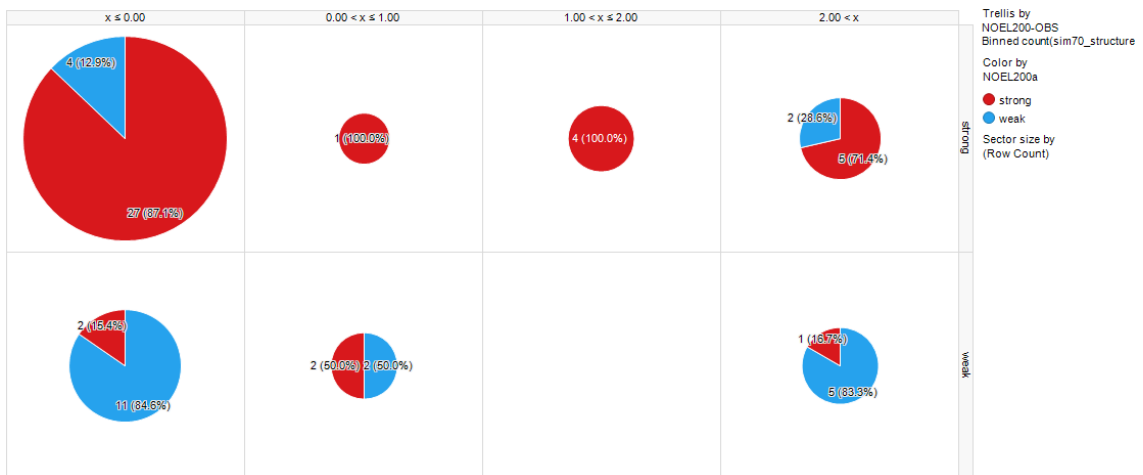


図6 構造記述子を用いた2クラス判別モデル (NOEL 200 基準) のトレーニング化合物における構造類似物質数と予測判別率の関係