

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の  
ヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発  
(H30-化学-指定-005)

研究代表者 山田隆志 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長

### 研究要旨

本研究では、数万種に及ぶ既存化学物質のヒト健康リスクを効率的に評価するために、インシリコ手法の高度化と実用化に基づく評価のストラテジーを開発する。

Ames/QSAR予測性の向上と運用可能なAmes変異原性予測のスキームの確立に関する研究では、構築した12,140物質より成るAmesデータベースに詳細な試験条件（各菌株の陽性陰性結果，被験物質純度，媒体）を追加入力すると共に、一部の試験結果の再評価を行い、より信頼性が高く、情報量の多いベンチマークデータベースを完成させた。これは、第2回Ames/QSAR国際共同チャレンジプロジェクトに活用される。

代謝予測モデルの改良による*in vivo*遺伝毒性予測性の向上に関する研究では、前年度にデータの妥当性を検証した*in vitro*染色体異常試験（CA）陰性で*in vivo*小核試験陽性（MN）の12物質、およびAmes試験陰性でげっ歯類トランスジェニック突然変異試験（TGR）陽性の4物質について*in vitro/in vivo*の代謝の差異の要因を検証したところ、主な要因として、1) 代謝酵素の発現、2) 試験における暴露時間、が挙げられた。これらの知見を活用して代謝シミュレーションシステム（Tissue Metabolism Simulator System: TIMES）の改良に取り組んだ。

反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究では、前年度に構築した国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を注意深く選抜し、化学構造、毒性機序に基づいて神経毒性物質をグループ化した。類似物質の情報を解析してカテゴリーの領域を定義し、OECD QSAR Toolboxに実装することにより、神経毒性を予測評価するカテゴリーアプローチの基盤を構築した。

AOP キーイベントに基づくリードアクロスモデルの精度向上に関する研究では、化学物質審査規制法のもとで実施された生殖発生毒性試験を用いて新たなデータベースを作成し、関連するキーイベント候補を抽出して、そのうちひとつについて AOP を開発することに成功し、このアプローチの妥当性を検証することができた。

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、生理学的薬物動態モデル（PBPK）の文献を収集し、分配係数と代謝パラメータ既報値のデータベースを構築した。さらに、分子間相互作用と代謝酵素によりカテゴリー化した分配係数と代謝パラメータの代表値を設定した。これらの代表値を用いて、PBPK モデルでトキシコキネティクスを推定した結果、カテゴリーごとのトキシコキネティクスの特徴把握にモデルが有用であることが示された。

## 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

笠松 俊夫

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

研究員

山田 隆志

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

石田 誠一

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

室長

## A. 研究目的

WSSD2020年目標の達成に向けて、膨大な数の試験データのない化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。さらに、動物福祉の観点から動物実験の削減の流れも着実に進んでいる。こうした動向に対応するため、現状の*in silico*評価の技術レベルの向上、適用範囲の拡大、安全性評価での実運用が強く求められている。近年OECDではAOP（毒性発現経路）の開発が精力的に進められており、QSARの適用が困難と考えられる複雑な毒性エンドポイントについて、AOPに基づいて*in silico*、*in vitro*、*in vivo*の情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する統合的アプローチ（IATA）のコンセプトが整理されつつある。2020年以降は動物実験への依存度を軽減しつつ、化学物質が発現しうるヒトへの毒性を高精度で予測する*in silico*評価技術を確立し、IATAに基

づいてヒト健康リスク評価のストラテジーを進化させる動きが加速すると考えられる。本研究では、有害性評価の長年の経験を有する専門家が選別した信頼性が高い試験データセットを用いて、QSAR並びにカテゴリーアプローチ手法の精度を向上させ、得られた成果を基に、国際的な調和の動向を取り入れた*in silico*予測評価ストラテジーを開発する。

Ames変異原性については、これまで我が国で行われた安衛法Ames試験データを収集し、大規模データベースを構築した。その数は約13000物質になる。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チャレンジプロジェクトを実施中である。平成31年度は詳細データベースの作成と信頼性の高いデータのみからなるベンチマークデータセットの構築を目指す。（本間）

*In vitro*試験の代謝系（肝S9画分）と*in vivo*試験（生物個体）間の代謝の違いは、異なる遺伝毒性試験結果を引き起こす可能性がある。この代謝の相違を理解し、これらの知見を考慮した遺伝毒性予測モデルを構築することにより、精緻な*in vivo*遺伝毒性予測を可能にする。（笠松）

反復投与毒性については、化学構造から効果的に毒性を予測する手法の実用化に向けて、化学物質に関する既知毒性情報を網羅的に検索・解析可能なデータベースを構築（国内外の公開データベースを統合）する。それを有効に活用し、さらに代謝や毒性機序に関する情報を体系的に整理・集約して、カテゴリーアプローチにより未試験化学物質を評価するスキームを確立することを目指す。（山田）

さらに、AOP キーイベントに基づくリードアクロスモデルの精度向上については、平成 30 年度は化学物質の主要な標的である肝毒性エンドポイントに関連するキーイベント情報と毒性試験結果による毒性プロファイルから肝毒性予測モデルの作成を行ったが、平成 31 年度は、生殖発生毒性に関するリードアクロスモデルの構築を目指して、毒性試験結果と既知の生殖発生毒性に関する情報を元に、生殖発生毒性に関連するキーイベントと AOP の同定を試みる。(広瀬)

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、文献等から物理化学的および生化学的パラメータを引き続き収集し、一般化学物質のパラメータ既報値に関するデータベースを構築する。収集したヒトのパラメータをカテゴリー化し、各カテゴリーの分配係数(血液/空気および組織/血液)、代謝パラメータ(Vmax と Km) の特徴を解析し、代表値を設定する。代表値を用いて生物学的薬物動力学(PBPK)モデルでヒトの体内での動態を計算し、カテゴリーごとのトキシコキネティクスの特徴を解析することを試みる。(石田)

## B. 研究方法

### B.1. Ames/QSAR 予測性の向上と運用可能な Ames 変異原性予測のスキームの確立に関する研究(本間)

Ames/QSAR ツールの予測性の向上を目指す国際チャレンジプロジェクトは平成30年度に終了し、論文化した。合計約25000物質の試験報告書を電子化し、詳細データベースの作成を試みた。また、既存のCGX、ハンセンデータベースと共に試験結果を再評価した。評価が困難な物質に関しては実

際にAmes試験を実施し、結果を検証した。これら作業により信頼性の高いデータのみからなるベンチマークデータセットの構築を目指す。

### B.2. 代謝予測モデルの改良によるMoAに基づいたin vivo遺伝毒性予測性の向上に関する研究(笠松)

平成 30 年度に遺伝毒性試験結果の妥当性が検証された物質について代謝に関する情報を収集し、代謝マップを作成した。In vitro/in vivo の代謝の差異をもたらす要因を検証したところ、主な要因として、1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の暴露時間、が考えられた。Ames 陰性・TGR 陽性物質、in vitro CA 陰性・in vivo MN 陽性物質について、どのような要因で説明できるケースかを整理し、得た知見を基に in silico 遺伝毒性予測モデル OASIS TIMES の代謝シミュレータの改良を試みた。

### B.3. 反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究(山田)

国内外で公開されている信頼性の高い化学物質の反復投与毒性試験データ(HESS、COSMOS、ToxRef、RepDose、食品健康影響評価書等、総計約 2,500物質)を統合した反復毒性試験統合データベース(新規化学物質は除く)から、病理組織学的に神経系(中枢又は末梢)に何らかの異常が見られている物質、および神経系に対する影響の可能性があると考えられる一般状態の変化を有する物質を選抜した。この中から、死亡例あるいは死亡用量でのみ変化の見られているものや、流涎、自発運動低下など他の要因でも生じる不明瞭な変化しか発現していないもの、神経組織の色素沈着や空

胞化など軽度な組織変化が記載されているにもかかわらず一般状態に変化の見られていないものを対象から外した。選抜した物質について、PubMed、Google、PubChem等の検索エンジンを用いて、*in vivo*における神経影響に関する文献や国内外のリスク評価書及び神経毒性の発現機序に関する文献を収集し精査した。毒性発現とリンクする測定または予測可能なキーイベントと部分化学構造を推定するとともに、関連物質の情報からカテゴリーの構造領域を考察した。

#### B.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究(広瀬)

既存化学物質点検プログラムで行われてきた生殖毒性反復投与併合試験(OECD TG-421) および簡易生殖試験(OECD TG-422) で得られた生殖発生毒性のパラメータをデータベース化すると共に、データマイニングを行うためにデータの標準化を行った。その結果、一意かつ妥当な化学構造394個のデータセットを対象に解析を行うこととした。次に、このデータセットに収録されている試験結果に対する予測能の指標を得るために、Derek NexusとAOPを用いた生殖発生毒性予測のプロトタイプモデルを用いてバリデーションを行った。バリデーションの結果、既存のモデルではカバーできない毒性学的関心領域を特定するために、5種類のデータマイニングを行った。さらに、得られた毒性学的関心領域と関連する構造クラスのうち、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)受容体と生殖毒性の間のシグナルについて、その主要な構造カテゴリーであるニトロ芳香族化合物を調査しAOPの構築を試みた。

#### B.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備とIATAへの適用に関する研究(石田)

昨年度に引き続き、PBPKモデルに必要な物理化学的および生化学的パラメータの既報値を計667の文献から収集した。一般化学物質の分配係数(血液/空気、組織/血液等)と生化学的パラメータ( $V_{max}$ 、 $K_m$ 等)を、化学物質の特性情報、対象生物種、出典等の情報と関連付けてまとめ、データベースを構築した。

ヒトの分配係数値を、van der Waals力、双極子-双極子相互作用、水素結合等の分子間相互作用に基づいて4カテゴリーに分類し、血液/空気分配係数については、ヘンリー則定数との相関性、組織/血液分配係数については、オクタノール/水分配係数との相関性を解析するとともに、各カテゴリーの分配係数値の分布範囲も解析した。 $V_{max}$ と $K_m$ については、代謝にCYP2E1が関与する物質とその他の酵素が関与する物質に分類し、CYP2E1が関与する物質について分子構造フラグメント(ベンゼン環、ベンゼン環水素、炭素-炭素二重結合、二重結合炭素に結合する水素、メチル基、メチレン基、メチン基、4級炭素、塩素および臭素)の $V_{max}$ と $K_m$ への寄与を解析した。さらに、CYP2E1が代謝関与する物質とその他の酵素が関与する物質の $V_{max}$ と $K_m$ の値の分布範囲も解析した。

上記の解析で得られた各カテゴリーの分配係数、 $V_{max}$ および $K_m$ の代表値を用いて、ヒトPBPKモデルで吸入曝露中と曝露後の各組織中の濃度-時間曲線を計算し、各カテゴリーのトキシコキネティクス的一般的な特徴を解析した。

## C. 結果

### C.1. Ames/QSAR予測性の向上と運用可能なAmes変異原性予測のスキームの確立に関する研究（本間）

安衛法Ames試験報告書は平成27年10月までの登録番号27325までの提供を受けた。このうち、昭和61年以前の登録番号2174までの報告書は廃棄され入手できなかった。従って、合計25151の試験報告書をPDF化した。PDF化は株式会社ユートハンズに委託し、令和元年9月に終了した。

PDF化した試験報告書を基に、データベースの作成を試みた。まず、Ames陽性の1549物質の試験結果について主要データ（物質情報、純度、試験条件、菌株および代謝条件下での試験結果）を抽出し、詳細データベースを構築した。さらに陽性1527と陰性16の試験結果について専門家レビューを行って、結果の再評価を行った。その結果、60物質については間違えて陽性、もしくは陰性と判断されていると考えられ、これら試験結果は変更された。

また、ハンセンデータベース等でAmes試験陽性ではあるが試験報告が古く、信頼性に欠け、さらにQSARでは陰性を示す化合物、またはその逆の挙動を示す化合物について平成30年からAmes試験を実施し、結果の検証を行っている。平成31年度は、bis(methoxyethyl)phthalate、2',3',4'-trichloroacetophenoneの2物質を試験した。両物質とも再現性の高い陽性反応が観察された。

### C.2. 代謝予測モデルの改良によるMoAに基づいたin vivo遺伝毒性予測性の向上に関する研究（笠松）

平成30年度に試験データの妥当性を確認したAmes陰性・TGR陽性43物質、in vitro CA

陰性・in vivo MN陽性12物質について代謝に関する文献データを検索した。その結果、代謝マップの作成に十分な代謝情報が得られた。代謝マップを作成し、in vitro陰性・in vivo陽性となった主な要因について検証すると1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の暴露時間、が挙げられた。例えば、Ames陰性・TGR陽性物質のメチルオイゲノールは、硫酸転移酵素（SULT）の働きにより反応性の高い求電子物質が産生され、遺伝毒性を示すが、in vitroではSULTの発現が不十分のため、Ames試験では陰性となると考えられる。またin vitro CA陰性でin vivo MN陽性であるジアゼパムは、生体内で継続的な酸化ストレスを与えることが、in vivo陽性結果の原因と示唆される。In vitro試験では暴露時間が短いため、このような持続的なストレスが起こらず陰性結果が得られるものと考えられる。このようなin vitro陰性・in vivo陽性の差異を説明できる代謝情報を使用して、TIMESの代謝シミュレータの改良に取り組んだ。現行のTIMESは、データベースの代謝情報に発生確率を割り当てているが、速度論的因子は考慮されていない。今回、in vitro陰性・in vivo陽性の差異には試験の暴露時間が重要な因子であることが浮き彫りになったことから、代謝シミュレーションに速度論的因子を導入し、新しいモデリングを構築中である。

### C.3. 反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究（山田）

平成30年度までに統合化した毒性データベースから、神経毒性影響を引き起こす物質を抽出した。病理組織学的に神経系（中枢および末梢）に異常が見られた物質数は23、病理組織学的な神経系の変化はないが、

神経系に対すると思われる一般状態の異常が見られた物質数は70であった。神経毒性と潜在的に関連性を有する可能性がある部分構造をケモタイプとして抽出したところ、神経毒性物質はその物質数に対して構造的多様性が大きいことが判明した。

続いて、神経系に病理変化を引き起こした物質についてその想定される機序を整理した。中枢神経系に変性または壊死を示した物質のカテゴリーとして、チオフェン類、ハロアルカン、ベンジルアルコールおよびその前駆体、ニトロベンゼン類などが同定された。脳の部位特異的に発現する P450 等の代謝酵素によって生成した反応性代謝物による生体分子の機能障害、グルタチオン抱合による細胞内グルタチオンの枯渇と酸化ストレスの誘導などが神経細胞の不可逆的な障害に関連すると考えられた。

一般症状にのみ影響が見られた物質では、フェニルグアニジン類、代謝されて  $\gamma$ -hydroxybutyric acid を生成する物質群のように神経伝達系に作用するカテゴリー、ベンゼンスルホンアミド類のように脳の pH の制御系に作用するカテゴリー、クロロフェノール/ニトロフェノールのようにミトコンドリアの脱共役作用を有するカテゴリーなどが同定された。さらに有機溶剤として用いられている物質のグループ化を試みたところ、脂肪族アルコール、アルキルエーテル、アルコキシアアルコール、アルキルフェノール類がカテゴリーの候補として同定された。

#### C.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究 (広瀬)

解析対象とした 394 データセットについて、

様々な評価項目を確立されたオントロジーの用語を使用することによって関連付けを行い、他の毒性に続発するのではなく、選択的に生殖発生毒性を引き起こす可能性のある化合物を選択的毒性物質とし、一般毒性の存在下で生殖発生毒性を引き起こす化合物を「非選択的毒性物質」として分類を行った。このデータセットを Derek Nexus と AOP を用いたプロトタイプモデルで検証を行った結果、Derek Nexus に比較して AOP に基づくモデルで感度の上昇が認められたが、この感度上昇は特異性の低下を伴っており、結果的に 2 モデルの確度は同程度であった。この AOP に基づくモデルの感度の上昇の検証と新規の作用機作の存在を探索するために、5 種類のデータマイニング手法を行った。その結果、パターンマイニング (Sherhod *et.al.*, 2014) では有意な毒性メカニズムは見つからなかったが、生殖発生毒性の決定樹 (Wu *et al.*, 2013) では 2 種類、Derek Nexus の別の毒性に対する構造アラートでは 2 種類、ToxCast データとの相関マイニングでは 7 種類、フィンガープリントによる QSAR モデルでは 8 種類の作用メカニズム候補を抽出することができた。そのうち、生殖毒性との関連性やデータセットに含まれる物質の数を参考とし、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 受容体と生殖毒性の間のシグナルについて調査し、AOP の作成を試みた。その結果、主要な構造カテゴリーであるニトロ芳香族化合物は、直接 GnRH とは反応しないことが明らかになったが、さらなる調査で、グルタチオンの減少を伴う酸化ストレスで引き起こされる精巣および精子形成障害に繋がる AOP を確立できた。

### C.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備とIATAへの適用に関する研究(石田)

208種の一般化学物質のヒト、ラットおよびマウスの物理化学的および生化学的パラメータの既報値を収集し、化学物質の特性情報、その他情報および出典とともに、化学物質ごとにデータベース化した(延べ1103物質×48データ項目)。

ヒトの血液/空気分配係数とヘンリー則定数の間には負の強い相関が見られ、バラツキは大きいものの全カテゴリーの物質は同じ回帰直線に従う可能性を示した。ヒトの脂肪/血液分配係数とlog D, pH7.4の間には強い正の相関が見られ、同様にバラツキは大きいものの全カテゴリーの物質は同じ回帰直線に従う可能性を示した。一方、肝臓/血液、高血流組織/血液および低血流組織/血液の各分配係数では、log D, pH7.4との間に強い相関は見られなかった。また、分子間の相互作用が強くなるに伴い、血液/空気分配係数は高くなる傾向を、逆に、組織/血液分配係数は低くなる傾向を示した。

VmaxとKmの対数値と10種の分子構造フラグメントの出現数との間には、重回帰分析により有意な決定係数が得られ、log Vmaxには、炭素-炭素二重結合、二重結合炭素に結合する水素、4級炭素および塩素の出現数が、log Kmには、塩素の出現数が有意な寄与すると示唆された。また、代謝にCYP2E1が関与する物質とその他の酵素が関与する物質のVmaxとKm値は同じ分布傾向を示し、両物質カテゴリーの間でVmaxとKmの分布に差異は見られなかった。

各カテゴリーの物質の分配係数、VmaxおよびKmの代表値を用いて、各カテゴリーの物質の典型的な各組織中濃度-時間曲線

をヒトPBPKモデルで推定した結果、カテゴリーごとに推定された最高濃度や濃度の時間変化パターン、曝露停止後の濃度の初期半減期から、カテゴリー間でトキシコキネティクスに違いがあることが示された。

## **D. 考 察**

### D.1. Ames/QSAR予測性の向上と運用可能なAmes変異原性予測のスキームの確立に関する研究(本間)

作成した12140物質より成る安衛法Ames試験データベースについて、陽性が報告されている物質を中心に試験報告書を確認し、より詳細な試験条件をデータベースに追加入力した。確認の過程で誤りがあれば訂正、曖昧な反応については複数の専門家が確認し、判定を確定させた。最終的には60物質について判定が変更された。

変更となった主な理由は、1) 単純な確認ミスに起因とされると思われ、これまでのデータベース記載のリストと試験報告書との食い違いがあったもの。2) 試験実施機関の判定基準が様々であるため、現在の判断基準に合っていないこと。3) 試験としての判定は陰性だが、QSAR予測モデル開発の視点から陽性とするのが妥当と判断されたものがある。

この内3)については、国際共同チャレンジプロジェクトにて評価した17のQSAR予測モデルの内、全て、あるいは1つ以外は全てのモデルが陽性と判定した陰性物質(偽陽性物質)について試験報告書を確認し、陽性基準(e.g. 2倍以上のコロニー数増加)には達していないものの、再現性のある増加傾向が認められた場合はQSAR開発の視点からは陽性と区分するのが妥当と判断したものである。近年のQSAR予測モデ

ルは、確かな根拠に基づいて開発され、予測性が大きく向上している。一方、実試験の Ames 試験は試験、あるいは実施機関によるバラツキがあり、必ずしも再現性が担保されたものではない。こうした背景を鑑みるに、QSAR 予測モデルの殆どが陽性と判断したことは妥当性の高い根拠があると考えられ、実試験においても一定の反応が認められれば、その物質を陽性と区分することに合理性がある。今後、更に QSAR 予測モデルのパフォーマンスが向上すれば、実試験よりも QSAR 予測結果が変異原性の判断において重要視される時代が来る可能性がある。本データベースでは陰性と判定された 9,129 物質の再評価がまだ残っている。今後の課題である。

一方、安衛法以外のデータベースの整備も重要である。ハンセン、CGX、ECVAM 等の Ames 試験データベースが存在するが、多くのデータは古く、また詳細な試験報告書が無い場合も多くある。これらデータベースには基本的な化学構造を有する化学物質が多く収載されており、QSAR モデルの開発に重要である。今回、新たに 2 化合物について Ames 変異原性を確認した。更に試験化合物を増やすことによりケミカルスペースの拡大を目指す。

#### D.2. 代謝予測モデルの改良による MoA に基づいた *in vivo* 遺伝毒性予測性の向上に関する研究 (笠松)

*In vitro* 陰性・*in vivo* 陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して代謝マップを作成した結果、発現代謝酵素や代謝物の違いという質的な差異だけでなく、暴露時間差がもたらす代謝物生成量の違いという量的な差異もクローズアップされることとなった。

このことは現行の *in silico* 遺伝毒性予測モデル (OASIS TIMES) に速度論的視点を取り入れた改良の必要性を認識させ、現在、代謝物の生成を時間軸でシミュレートできるようなモデルの改良を進めている。(代謝物を含む) 遺伝毒性物質が DNA やタンパク質などの標的分子と結合し、その結合量が一定量以上になると遺伝毒性を示すと考えることができることから、この一定量を閾値として遺伝毒性の有無を予測するモデルを、まず *in vitro* の Ames/CA 試験について、その次に *in vivo* の TGR/MN 試験について開発できるよう検討を進める。

#### D.3. 反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究 (山田)

国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を選抜し、その神経毒性機序情報を集積した。本研究の成果の一つとして、化学物質の神経毒性機序情報が集積され、化学物質に対する神経系の選択的な脆弱性の理解を深めることが出来たことが挙げられる。

類似物質や共通部分構造をもつ医薬品・農薬関連物質等の毒性データを比較解析することにより、毒性発現に寄与する基本構造と許容される構造的差異を考察してカテゴリーの領域として定義した。これを OECD QSAR Toolbox のカテゴリープロファイラーへカスタムで搭載することにより、数多くの化学物質の中から神経毒性物質を機序に基づいてプロファイリングすることが可能になると期待できる。本研究では、神経毒性ポテンシャルを有する物質をできるだけ見落とさないようにカテゴリー領域を定義したが、毒性にリンクするキーイベントの



*in vitro*試験データ等をより広範囲に収集して物質間で比較解析することにより、カテゴリーの領域をより精緻に定義できるようになると考えられる。一方で、一部のカテゴリーでは、基本構造を持っていても*in vivo*毒性試験では神経毒性影響が認められていないケースがある。分子ターゲットとの作用（トキシコダイナミクス）の違いに加えて、暴露量や体内分布、代謝などに依存するトキシコキネティクスの違いも要因として挙げられる。実際にカテゴリーアプローチを適用する際には、課題設定を明確にすることが重要である。有害作用の類推、NOAELの推計など、目的によって許容される不確実性のレベルが異なり、必要に応じて追加で情報を収集する必要があることに留意する必要がある。

#### D.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究（広瀬）

既存化学物質点検プログラムで行った反復投与毒性試験のうち生殖発生毒性項目を解析した結果、知識ベースの予測モデルより、AOPに基づいた予測モデルで感度が上昇したことから、既存の知識ではカバーできていない生殖発生毒性の作用メカニズムを開発できる可能性のあることが示されたと共に、様々な情報源に基づいてデータマイニングすることにより、いくつかの新規の作用メカニズム候補の抽出を行うことができた。そのうちの一つのメカニズムとして、GnRHとニトロ芳香族と生殖毒性の間のシグナルとニトロ芳香族化合物の関連性について調査を行ったが、実際はGnRHとの関連性はなく、むしろ酸化ストレスによる精巣毒性との関連性が浮かび上がった。こ

のことは、構造と生物活性との相関性のみ頼った解析では、間違ったメカニズムを示唆する可能性があることを示したが、更なる解析結果として別のメカニズムを明らかにできたことは、本手法が、生殖毒性に関してのAOPの開発手段として有用であることを示すことができたと考えられる。

#### D.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備とIATAへの適用に関する研究（石田）

血液/空気分配係数がヘンリー則定数と、そして脂肪/血液分配係数がlog D, pH7.4との強い相関性を示したが、各物質の値には大きなバラツキが見られ、ヘンリー則定数やlog D, pH7.4に追加して新たな説明変数を導入して回帰分析を行うことやカテゴリー内の物質をさらに構造やその他の基準で細分化し、分配係数の代表値を決定することを検討する必要があると考えられた。

生化学的パラメータについては、本年度検討した分子構造フラグメントの寄与率から推定法としての可能性が示されたことから、本年度は考慮しなかったフッ素、酸素等も考慮して、CYP2E1以外の酵素が関与する物質も含めて適用範囲の拡大等を検討する必要があると考えられた。

各Categoryの物理化学的および生化学的パラメータには、かなりの分布幅があるため、各Categoryの物質のヒトでの体内動態をより適切に表現するためには、パラメータの分布を考慮するモンテカルロ法による体内動態の推定とその結果の定量的な不確実性分析がより適切と考えられる。

#### **E. 結論**

遺伝毒性については、Ames試験予測QSARモデルの向上を目指した国際チャレ

ンジプロジェクトは成功裡に終了した。さらなる予測性の向上を目指し、詳細データからなるベンチマークデータセットの開発を進めている。また、令和2年度からは新規の国際チャレンジプロジェクトを開始する。*In vivo*遺伝毒性予測性の向上へ向けて*in vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して代謝マップを作成し代謝の差異を検証したところ、主な要因として、代謝酵素の発現と遺伝毒性試験の暴露時間が挙げられた。得られた知見を基に遺伝毒性予測モデルの改良を図った。

反復投与毒性については、国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を選抜し、化学構造、毒性機序に基づいて神経毒性物質をグループ化した。類似物質の情報を解析してカテゴリーの領域を定義し、OECD QSAR Toolboxに実装することにより、神経毒性を予測評価するカテゴリーアプローチの基盤を構築した。

生殖発生毒性について新たなデータベースを作成し、関連するキーイベント候補を抽出して、そのうちひとつについてAOPを開発することに成功し、このアプローチの妥当性を検証することができた。

体内動態予測システムの基盤整備では、PBPKモデルで使用される分配係数と代謝パラメータ値のデータベース化を継続した。その解析より、カテゴリーに分類された物質群毎に各パラメータの推計や代表値が導出できると考えられた。また、医薬品を対象に、既報のデータベースや推計手法より得られるパラメータ値に基づいてPBPKモデルでヒト血漿中濃度を精度よく推計でき、経口曝露時の体内動態推定に必要なパラメータ推計法が利用できる可能性が示唆され

た。

以上のことから本研究は順調に推移している。

## F. その他 -OECDにおける活動-

本研究班は前研究班（平成27-29年度）に引き続き、OECDと連携してその活動に貢献しつつ、最新の国際動向を収集して本研究へフィードバックさせることを目指している。前研究班の分担研究の継続としてエチレングリコールメチルエーテル（EGME）誘導体を化審法化学物質インベントリーからスクリーニングし、その精巢毒性をカテゴリーアプローチにより予測評価するケーススタディを2018年にIATA Case Studies Projectに提出し、専門家レビュー後の2019年に正式に承認された。各国で高懸念物質としてリスト化されるEGMEの類似物質を機序に基づいて主要な毒性を予測した事例として高く評価された。その後、OECDの推薦により同ケーススタディをEU-ToxRiskのワークショップで紹介し、さらに米国ICCVAM Read-Across Work Groupでも同様に紹介した。OECDを中心にして同手法の国際的なガイダンス作成に貢献している。

2019年のQSAR Toolbox Management Group会議では、本分担研究で作成した生殖発生毒性のデータベースを次年度にOECD QSAR Toolboxに提供することを表明し、質の高いデータ提供を歓迎された。すでにQSAR Toolboxに実装されている生殖発生毒性データと合わせて、カテゴリー解析やグルーピングによるリードアクロス予測の適用範囲の拡大が期待される。さらに、本研究班の概要と成果を同会議で紹介した。有害性評価の長年の経験を有する専門家が選別した信頼性の高い試験データセットを用

いて、QSAR並びにカテゴリーアプローチ手法の精度を向上させる取り組みに対して多くの関心と期待が寄せられた。また、同会議では、欧州化学品庁（ECHA）より、欧州のREACH規制で企業から提出された大規模の毒性データが、近いうちにQSAR Toolboxを介して様々な解析ができるようになることが表明された。本研究班で集積したデータとQSAR Toolboxの新しいデータとを相互利用することにより、毒性と体内動態予測モデルの開発・検証が国際的に進められるようになると期待される。

## G. 健康危険情報

なし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 本間正充. 医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理—ICH-M7 を踏まえた遺伝毒性物質の許容値の設定に関する科学— *PHARM TECH JAPAN*. 2019, 35, 1461-1469.
- 2) 本間正充. 化学物質の遺伝毒性評価と定量的構造相関 ((Q)SAR) . *ポリ衛協会報*. 2019, 65, 5-25.
- 3) 本間正充. 毒性試験の未来を考える — (定量的) 構造活性相関による化学物質の変異原性評価 — *国立医薬品食品衛生研究所報告*. 2019, 137, 20-31.
- 4) Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Frericks M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ. Genetic toxicology in silico protocol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019, Oct; 107:104403. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403. Epub 2019 Jun 11. PubMed PMID: 31195068.
- 5) Petkov PI, Kuseva C, Kotov S, Honma M, Kitazawa A, Kulkarni S, Schultz TW, Mekenyan OG. Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of evidences: Application to Ames mutagenicity. *Computational Toxicology*. 2019;12, doi.org/10.1016/J.COMTOX.2017.02.004
- 6) 本間正充. 食品中に混在する微量な化学物質の安全性評価 — 定量的構造活性相関 (QSAR) による変異原性化学物質の同定— *日本包装学会誌*. 2020, 29, 27-42.
- 7) Jojima K, Yamada T, Hirose A. Development of a hepatotoxicity prediction model using in vitro assay data of key molecular events. *Fundam. Toxicol. Sci*. 2019, 6, 327-32.

- 8) Inoue K, Suzuki H, Yamada T. Comprehensive toxicity evaluation of cyclopentyl methyl ether (CPME) for establishing a permitted daily exposure level. *Fundam Toxicol Sci.* 2019, 6, 145-165.
- 9) Yamada T, Matsumoto M, Miura M, Hirose A. Case study on the use of integrated approaches to testing and assessment for testicular toxicity of ethylene glycol methyl ether (EGME)-related chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Series on Testing & Assessment. 2019, No. 308. 1-75.
- 10) Patlewicz G, Lizarraga LE, Rua D, Allen DG, Daniel AB, Fitzpatrick SC, Garcia-Reyero N, Gordon J, Hakkinen P, Howard AS, Karmaus A, Matheson J, Mumtaz M, Richarz A, Ruiz P, Scarano L, Yamada T, Kleinstreuer N. Exploring current read-across applications and needs among selected U.S. Federal Agencies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2019, 106, 197-209.
- 11) Tachibana K, Kass GEN, Ono A, Yamada T, Tong W, Doerge DR, Yamazoe Y. A Summary Report of FSCJ Workshop "Future Challenges and Opportunities in Developing Methodologies for Improved Human Risk Assessments". *Food Safety.* 2019, 7, 83-89.
- 12) 山田隆志, 足利太可雄, 小島肇, 広瀬明彦. AOP (Adverse Outcome Pathway; 有害性発現経路) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2020, 140, 481-484.
- 13) 田邊思帆里, 広瀬明彦, Maurice Whelan, 山田隆志. 遺伝子ネットワーク解析による分子パスウェイ解明及び AOP 開発状況について. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2020, 140, 485-489.
- 14) Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Tanabe S, Inoue K, Hirose A. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances(V). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* 2019, 137, 66-72.
- 15) Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Kawamura T, Sakuratani S, Ono A, Hirose A. Validation of the statistical parameters and model selection criteria of the benchmark dose methods for the evaluation of various endpoints in repeated-dose toxicity studies. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2019, 6, 125-136.
2. 学会発表
- 1) Improvement of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) Tools for Predicting Ames Mutagenicity. Honma M. 第 47 回欧州環境変異ゲノム学会 (2019 年 5 月、フランス、レンヌ)
- 2) ICH-M7(医薬品中の DNA 反応性不純物の評価と管理)に関するガイドライン, 本間正充, 第 74 回 MMS 研究会定例会 (2019 年 6 月 京都)
- 3) 重大な発がん性物質は変異原性物質である。変異原性物質は *in silico* で予測できる。従って、発がん性物質は *in silico* で予測できる。本間正充, 第 46 回日本毒理学学会学術年会 (2019 年 6 月 徳島)
- 4) Ames/QSAR International Challenge Project. Honma M. 第 6 回アジア環境変異原学会/日本環境変異原学会第 48 回

- 大会 合同大会 (2019年11月 東京)
- 5) StarDropを活用した香料化合物の*in silico*遺伝毒性評価の試み, 笠松俊夫, 北澤愛莉, 田島澄恵, 金子昌弘, 本間正充, 第6回アジア環境変異原学会/日本環境変異原学会第48回大会 合同大会 (2019年11月 東京)
  - 6) Improvement of Ames test database for developing QSAR prediction models. Kasamatsu T, Kitazawa A, Sugiyama K, Suzuki T, Honma M. *59<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology* (March 2020, Anaheim, USA)
  - 7) Case Study on the Use of Integrated Approach to Testing and Assessment for Testicular Toxicity of Ethylene Glycol Methyl Ether (EGME)-Related Chemicals, Yamada, T., Matsumoto, M., Miura, M., Hirose, A. EU-ToxRisk workshop on NAM-supported read-across: from case studies to regulatory guidance in safety assessment (May 2019, Espoo, Finland)
  - 8) Current status of development and improvement of *in silico* approaches for regulatory chemical safety assessment in NIHS. Yamada, T., Honma, M., Hirose, A. 第46回日本毒性学会学術年会 (2019年6月 徳島)
  - 9) 食品用器具・容器包装材料のポジティブリスト化に向けた安全性評価: 脂肪酸類のグループ評価, 磯貴子, 松本真理子, 鈴木洋, 川村智子, 山田隆志, 井上薫, 杉山圭一, 森田健, 本間正充, 広瀬明彦, 第46回日本毒性学会学術大会 (2019年6月 徳島)
  - 10) Development of hepatotoxicity prediction model using *in vitro* assay data of the molecular key events. Yamada, T., Jojima, K., Hirose, A. IUTOX 15th International Congress of Toxicology (July 2019, Honolulu, USA)
  - 11) Development of *in silico* prediction model for skin sensitization using the alternative tests dataset. Suzuki, M., Ambe, K., Tohkin, M., Yamada, T., Ashikaga, T. CBI学会2019年大会 (2019年10月 東京)
  - 12) 化学物質のヒト安全性評価のための*in silico*アプローチの開発と活用, 山田隆志, 内閣府化学物質の安全管理に関するシンポジウムー化学物質の評価・管理に関する手法やツール等の活用状況ー (2019年11月 東京)
  - 13) 生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータの物質群毎の特徴の解析, 明関由里子, 吉田喜久雄, 石田誠一, 山田隆志, 第32回日本リスク学会年次大会 (2019年11月 東京)
  - 14) 化学物質のヒト健康リスク評価に対する*in silico*アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第47回構造活性相関シンポジウム (2019年12月 熊本)
  - 15) Construction of databases of environmental fate and ecotoxicity for the development of environmental risk evaluation system of pharmaceuticals. Hirose, A., Kobayashi, N., Kurimoto, M., Yamamoto, H., Ikarashi, Y., Yamada, T. Society of Risk Analysis 2019 Annual meeting (December 2019, Arlington, USA)
  - 16) Read-across case study on testicular

toxicity of ethylene glycol methyl ether-related substances for the fourth cycle of OECD IATA Case Studies Project. Yamada, T., Matsumoto, M., Kawamura, T., Miura, M., Hirose, A. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2020, Anaheim, USA)

- 17) PDE 設定の基本的考え方, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 18) 水道水中の汚染化学物質に対する亜急性参照値の導出, 松本真理子, 川村智子, 井上薫, 山田隆志, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 19) 化審法既存化学物質のスクリーニング評価における 1,4-ジクロロブタンの有害性評価, 五十嵐智女, 鈴木洋, 牛田和夫, 松本真理子, 井上薫, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 20) Hazard assessment of hydrazine, a possible migration contaminant from drinking water apparatus. Matsumoto, M., Igarashi, T., Inoue, K., Yamada, T., Hirose, A. 5th Congress of the European Societies of Toxicology (September 2019, Helsinki, Finland)
- 21) The network pathways related to epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer and stem cells. Tanabe, S., Quader, S., Ono, R., Aoyagi, K., Hirose, A., Yokozaki, H., Sasaki, H. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019 年 9 月 京都)

- 22) 生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータの物質群毎の特徴の解析, 明関由里子, 吉田喜久雄, 石田誠一, 山田隆志, 第 32 回日本リスク学会年次大会 (2019 年 11 月 東京)

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

なし