

平成 31 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

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)

分担研究報告書

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

研究分担者	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
研究協力者	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
研究協力者	鈴木 洋	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	Susanne Stalford	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Adrian Fowkes	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Alun Myden	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Emma Hill	ラーサ研究所		研究員

研究要旨

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や毒性発現経路（AOP）の同定を試みた。既存化学物質点検プログラムで行われてきた各毒性のパラメータをデータベース化し、収録されている試験に対する予測能の指標を得るために、Derek Nexus と AOP に基づく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。その結果、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、特異性の低下も伴っており、結果的には 2 つの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を検証するため、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。パターンマイニング法 (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、発生生殖毒性の決定樹 (Wu *et.al.*, 2013) では 2 種類、Derek Nexus の他の毒性に対する構造アラートの解析では 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、ニトロ芳香族化合物に関連する作用メカニズムとして、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が原因となる雄性生殖能の低下を示す AOP を同定することができ、リードアクロスモデルの性能向上にむけて今回の AOP の開発手法が有用であることが示された。

A. 研究目的

近年の化学物質の規制に関わる国際的な関心は、化学物質の安全性評価において動物実験を用いた試験だけに頼ることなく、化学物質曝露による有害作用を同定し評価するための評価ストラテジーを確立することにあり、その中において構造活性相関(QSAR)やカテゴリーアプローチなどの *in silico* 手法を用いたコンピュータトキシコロジーは重要な位置づけでもあり、発展の望まれる研究分野である。本研究では、反復投与毒性の毒性予測モデル開発の一環として、今年度から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、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や AOP の同定を試みることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

B-1 生殖発生毒性試験データの抽出とケミカルスペース解析

既存化学物質点検プログラムで行われてきた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(OECD TG-421) および簡易生殖発生毒性試験(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した。また、Lhasa の生殖発生毒性データセットとの重複やケミカルスペースの解析を行った。

B-2 生殖発生毒性試験データの標準化

データマイニングへの取り組みの促進(関連する評価項目のグループ化など)を行う為、評価項目については、データセット内でエンドポイントツリーとしてまとめ、オントロジーとの関係性を調査した。

B-3 試験結果の分類法

データセットのマイニングを支援すべく、

化合物をその試験結果に従って分類するためのルールを策定した。

B-4 *In silico* モデルのバリデーション

分類された試験結果に従って、Derek Nexus (v6.0.1)、AOP の枠組みを基礎とした研究のプロトタイプモデル(Myden *et al.*, 2018)を用いて、予測性能の評価を行った。

B-5 データマイニングと知識抽出

Derek Nexus と AOP を用いた発生毒性予測のプロトタイプモデルでは十分にカバーされなかった毒性学的懸念領域の抽出について以下の5つの方法を適用した。

- パターンマイニング (Sherhod *et al.*, 2014)
- 生殖発生毒性の決定樹 (Wu *et al.*, 2013)
- Derek Nexus (他のアラートを用いる手法)
- ToxCast データ (US EPA, 2015) との相関マイニング (Sipes *et al.*, 2011)
- ChEMBL 統計モデルを用いたバイオフィンガープリント法

B-6 AOP の作成の試行

抽出した毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連に対する蓋然性、今回のデータセットに含まれる物質の数から、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。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C-1 生殖発生毒性試験データの抽出とケミカルスペース解析

既存化学物質点検プログラムのデータに含まれる 394 の化合物のうち、105 の化合物が Lhasa の生殖発生毒性データセットに存在した。また、他の情報源との重複を検討したところ、試験型についてより詳細な情報を提供しているデータセット（Lhasa の DARTDB および ToxRefDB 等）との重複と比較して、化合物分類を目的とした要約データセット（FDA および NTP など）との重複が大きかった。

表 1 データセットの化合物のうち、他の生殖発生毒性のデータセットに存在する化合物の数

データセット	物質数	Dataset summary
All datasets	105	Combination of the datasets listed below
FDA	50	Mining dataset curated and supplied by the FDA ^[8]
Lhasa Limited	7	Curated dataset of studies published in the literature
NTP	94	A dataset obtained from the NTP with a binary classification for developmental toxicity
ToxRefDB	7	A database containing repeat dose studies including DART studies ^[9]
Wu et al	9	Training set for an expert rule-based prediction system for DART ^[10]

また、データによって占有される化学空間領域を検討するため、提供されたデータセットを Lhasa Limited 社が高い信頼性を有しているデータセットと比較した（図 1）。プロットは、主成分解析によって 2 次元に縮小し、Morgan フィンガープリント[RDkit]によって決定されたケミカルスペース内の化合物を表す。青色の密度プロットは、Lhasa の生殖発生毒性データセットのうち FDA と ToxRefDB 由来のケミカルスペース領域で、赤色の点は、今回のデータセットの 394 の構造を表す。今回のデータセットには、

生殖発生毒性作用が比較的知られている化学空間領域を占めているものもあれば、比較的密度の低い化学空間領域を占めているものもあることがわかった。このプロット図から、ケミカルスペースには生殖発生毒性傾向に関する情報が多い領域が 2 箇所あることが示唆される（図 1：領域 A および B）。この 2 領域の化合物の例を検証すると、領域 A に含まれる化合物の典型例は、小化合物、非環式化合物および脂肪族化合物であるが、領域 B では芳香族基が多いことが示された。

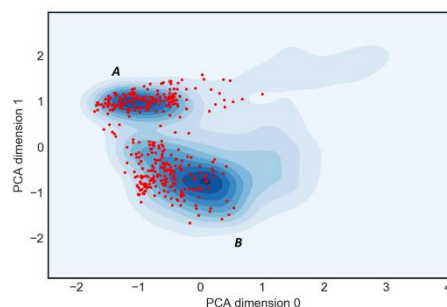


図 1 既存化学物質点検プログラムの生殖発生毒性データと Lhasa Limited 社が所有する既存の生殖発生毒性データセット中の化合物との関係

C-2 生殖発生毒性試験データの標準化

TG-421 と TG-422 試験結果のさまざまな評価項目とその結果を抽出し、データセット内の他の評価項目と関連付けた。これらの抽出された評価項目をデータセット内の他の評価項目と関連付けるため、小規模な評価項目集を作成した（表 2）。これらの用語は、EBI の Ontology Lookup Service や哺乳類表現型オントロジーなどの既存のオントロジーから入手した。このような方法で評価項目を構成することで、データマイニングへの取り組みのためのネットワーク図を作成した（図 2）。

び発生毒性モデルを用いた。また、バリデーション基準を作成するために、非選択的毒性物質も陽性物質に含む「包含 (Included) シナリオ」と、含めない「除外 (Excluded) シナリオ」の2つに分けて評価した。

表 4&図 4. 児動物の評価項目のモデル性能

非選択的 毒性物質	Model	Total	TP	FP	TN	FN
Excluded	Derek Nexus	277	2	13	231	31
Excluded	AOP model	277	11	62	182	22
Included	Derek Nexus	394	6	13	231	144
Included	AOP model	394	40	62	182	110

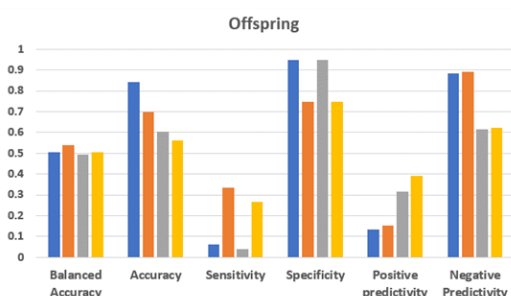
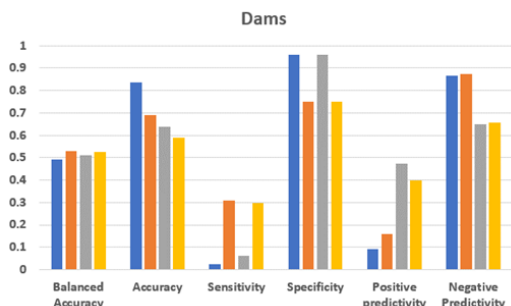


表 5&図 5. 母動物の評価項目のモデル性能

非選択的 毒性物質	Model	Total	TP	FP	TN	FN
Excluded	Derek Nexus	292	1	10	243	38
Excluded	AOP model	292	12	63	190	27
Included	Derek Nexus	394	9	10	243	132
Included	AOP model	394	42	63	190	99



バリデーションの結果、母動物および児動物の評価項目、ならびに非選択的毒性物

質を包含するか否かについて、モデルの性能には同様の傾向が認められた。Derek Nexus と比較して、AOP Model で感度の上昇が認められた。この AOP Model における感度上昇は、特異性において同様の低下を伴っており、結果的に両モデルの確度は同程度で均衡していた。AOP Model における感度の上昇は、Derek Nexus と比べて化合物の作用機序の予測に用いられる構造アラートの範囲がより広いことによって生じると考えられた。

C-5 データマイニングと知識抽出

In silico モデルでは十分にカバーされない毒性学的関心領域を特定し、新規の発生毒性および受胎能毒性を予測できるモデルの開発を支援するために、母動物および出生児の評価項目の結果を用いて、5つの手法を用いて、関心領域とその所見の特定を試みた。

- パターンマイニング (Sherhod *et al.*, 2014)

アルゴリズムによって予測結果をデータセット内の各化合物の試験値と比較した後、モデルによってカバーされなかった毒性物質の構造的特徴を特定できるが、特定されたパターンを検証した結果、各グループによって裏付けられた一連の化学物質が異なっていたことより、この手法では新しいパターンを見いだせなかった。

- 生殖発生毒性の決定樹 (Wu *et al.*, 2013)

特徴的なルールに基づく構造アラートを用いて生殖発生毒性を予測できるモデルで、このモデルを用いて、上記の *in silico* モデルがカバーしていない2つの関心領域を特定できた (表6)。

- Derek Nexus (他のアラートを用いる手法)

Derek Nexus に含まれる他の毒性の評価項目を予測する構造アラートを用いて、プロファイリングを行った結果、生殖発生毒性に関連すると思われるトキシコフォアとメカニズムを2つ特定した(表6)。

- ToxCast データとの相関マイニング (Sipes *et al.*, 2011)

今回のデータの評価項目の分類結果と ToxCast の生物活性値との相関関係を、Sipes らが報告した方法を用いて検討した。統計的検定およびルールを用いた。In vivo における有害転帰を予測可能な生物活性試験および標的領域を7種特定できた(表7)。

- バイオフィンガープリントモデル

ChEMBL から提供を受けた統計モデルを用いて、選択的毒性物質のバイオフィンガープリントを作成した。既に AOP に基づくモデルとして掲載されている標的タンパクを除外し、残った標的についていくらかでも生殖発生毒性と関連性のある標的を特定するために検証を行った。その結果8つの標的タンパクを同定した(表8)。

C-6 AOP の作成の試行

以上解析によって、今回検証したデータセットの様々な化学物質について、潜在的な生殖発生毒性の因果関係として化学的分類といくつかの生物学的標的を特定することができたが、これらの標的について、新たな AOP を作成することができるかどうかについて検証した。まず、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。

このシグナルは、QSAR 予測によって GnRH 受容体と相互作用すると見なされた一群の化合物に基づいているが、これらの化合物に関する生物活性データベースを検索した結果、化合物は GnRH 受容体のリガンドではないことが判明した。これらの化合物の中に多数含まれるニトロベンゼン類が、ChEMBL の GnRH 受容体モデルのトレーニングセットの活性化化合物の部分構造として含まれることが QSAR 予測の根拠になっていると考えられた。しかし、これらニトロベンゼン類は、データセットの中で生殖発生毒性との関連性を示すことは示されていないので、さらなる文献調査を行った結果、これらの化合物が既知の毒性機序を有する精巣毒性に関連することが示された。そこで、この知見を網羅するように調査を行い、ニトロ芳香族類が酸化ストレスによって雄の生殖毒性を引き起こすという AOP を作成した。この AOP の概要は以下の様になった。

グルタチオン(GSH)は、共有結合による求電子性生体異物化合物の除去および活性酸素種(ROS)のクエンチングの基質となるトリペプチドである(Forman *et al.*, 2009)。ROS は、シグナル変換における二次メッセンジャーとしての作用、およびイオン輸送、免疫学的宿主防衛、転写およびアポトーシスに関与するプロセスの媒介を含む一連の正常な生物学的機能に対して重要である(Ray *et al.*, 2012; van Gelder *et al.*, 2010)。内在性 ROS は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化から生成し、そこで重要な役割を演じることができる(Ray *et al.*, 2012)。しかしながら、過剰な ROS は、精巣毒性および精子

形成障害を含む広範囲の毒性転帰の原因に関与する酸化ストレス状態をもたらす可能性がある (Creasy *et al.*, 2018; van Gelder *et al.*, 2010)。過剰な ROS および酸化ストレスは、ニトロ芳香族類などの外因性化合物によって促進される可能性がある (Creasy *et al.*, 2018; Kovacic *et al.*, 2001) (図 6)。

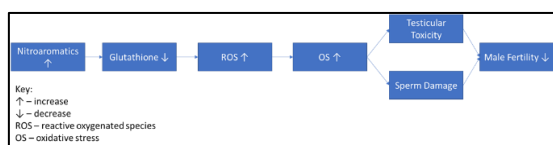


図 6. ニトロ芳香族類による雄の生殖毒性の AOP のキーイベントの関係

ニトロ芳香族の増加 → GSH の減少

ニトロ芳香族類は、代謝されて GSH と反応することができる官能基を形成する (Kovacic *et al.*, 2014)。GSH とニトロ芳香族間の芳香族求核置換反応 (SNAr 反応) はアリアル化合物の置換様式に依存している (Ruzza *et al.*, 2013)。さらに、GSH の二量化は ROS の処理のための酵素反応産物であるため、GSH の二量化は ROS を産生する生体外異物によって促進される可能性がある (Nimse *et al.*, 2015)。

GSH の減少 → ROS の増加

GSH は、過剰 ROS の生成に対する細胞の最も重要な防御機構である (Nimse *et al.*, 2015)。したがって、化学的損傷から生じる GSH の過剰な枯渇は ROS の増加を引き起こし得る。GSH との結合の前に、生体外異物がフリーラジカル中間体に転換を受けることが多い (Wells *et al.*, 2009)。この GSH との結合に加え、これらのフリーラジカルの中間体自体が追加の ROS を生成することができる。したがって、生体外異物の代謝による GSH の枯渇によって過剰な ROS が生成す

る。

ROS の増加 → 酸化ストレス

ROS は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化、並びにイオン輸送、免疫宿主防御、転写およびアポトーシスに関与するプロセスなどの多数の生物学的プロセスに重要である (Ray *et al.*, 2012; van Gelder *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2017)。ROS は主に、酸化的リン酸化においてミトコンドリアで生成する (Ray *et al.*, 2012)。酸化ストレスは、ROS と抗酸化防御の不均衡と定義される (Betteridge *et al.*, 2000)。したがって、酸化還元ホメオスタシスを維持するシステムが崩壊する点まで ROS が増加すると酸化ストレスが生じる可能性がある。

酸化ストレス → 精巣毒性

ROS は DNA、タンパク質および脂質と共有結合し、細胞構成要素への損傷および細胞シグナル伝達障害を引き起こす可能性がある (Creasy *et al.*, 2018; van Gelder *et al.*, 2010)。酸化ストレスは多数の経路を介して毒性をもたらす得るため、毒性の正確な機序を解明することは簡単ではないが、生殖毒性を有する多数の化合物群は、その毒性に寄与すると考えられる酸化ストレスを引き起こすことが知られている (Kovacic *et al.*, 2001; Creasy *et al.*, 2018)。ニトロ芳香族化合物は酸化ストレスを引き起こすことができ (Kovacic *et al.*, 2014)、精巣毒性も誘発する。

AOP と関連するニトロ芳香族化合物の例

- 2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノール (ジノセブ)

ジノセブが齧歯類に投与された試験の検証では、ジノセブはラットへの様々な反復経口投与試験で精子数の減少、精巣萎縮等の精巣毒性物質であるとされている

(Matsumoto *et al.*, 2008)。

- 4,6-ジニトロ-*o*-クレゾール (DNOC)
総説論文では、DNOC はジノセブより弱い精巣毒性物質であると結論されている (Matsumoto *et al.*, 2008)。

- 2,4-ジニトロフェノール (DNP)
総説論文で、DNP は精巣毒性物質ではないが、その理由は、迅速な体内クリアランスに起因すると結論されている (Matsumoto *et al.*, 2008)。

- トリニトロトルエン (TNT)
ラットにおける TNT の影響を調べた 13 週間の食餌試験から、TNT は最高用量での精巣萎縮、精細管上皮の変性、間質性ライディッヒ細胞の過形成などの病理変化が示された。低用量でも精子、精子細胞および精母細胞の減少などが認められた (Levine *et al.*, 1984)。

- ニトロベンゼン (NB)
ラットにおける NB の単回投与試験では、肝臓と精巣がこの化合物の主な標的臓器であると結論され、高用量ほど精細管の損傷が認められ、精母細胞の破壊と精巣上体の数の減少が認められた (Bond *et al.*, 1981)。

- 1,3-ジニトロベンゼン (1,3-DNB)
ラットへの 8 週間の飲水曝露により、精巣萎縮に加え、精子形成の低下と精細管の脱落、崩壊、16 週間では精巣の重量減少が認められた (Cody *et al.*, 1981)。また、1,3-DNB は、ミトコンドリアグルタチオン濃度を低下させることも明らかにされている (Creasy *et al.*, 2018)。

- 2,6-ジニトロトルエン (2,6-DNT)
イヌとラットを用いた 13 週間の試験では、精巣萎縮および精子形成の低下が生じた (Rickert *et al.*, 1984)。

- 2,4-ジニトロトルエン (2,4-DNT)
ラットとイヌへ 13 週間曝露で精巣萎縮と精子形成障害が認められた (Rickert *et al.*, 1984)。

- 3-メチル-4-ニトロフェノール (PNMC)
マウスへの 100 mg/kg の単回腹腔内投与で精細管に著しい損傷を示した (Bu *et al.*, 2012)。さらに、円形生殖細胞の 40% 損失、長い精子の非検出、精巣萎縮も認められた。これらの所見もグルタチオン濃度の低下と同時に認められ、酸化防止剤 (ケルセチン) の同時投与によって、毒性やグルタチオン減少が緩和された。

D. 考察

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情報したことから、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。これらの毒性メカニズム候補となる生物活性標的と関連する化合物群の調査を深めていくことができれば、新規の AOP 開発と共にリードアクロスアプローチや将来的な生殖発生予測モデルの性能向上に寄与できるものと考えられた。そこで、これらの生物活性標的のうち、生殖発生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 との関連性は見いだせなかった。しかし、ニトロ芳香族化合物群と今回のデータセットの解析による選択毒性

物質との関連性が高いことから、さらなる調査を進めて結果、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 relied 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、さらなるデータマイニングで生物反応と構造との関連性を抽出することが可能であることも示している。更に、今回の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、今回のアプローチは新たな AOP の開発手段として妥当であったことを示すと共に、生殖毒性に関して、さらなる AOP の開発の余地があることも示唆したものと考えられる。

E. 結論

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発生毒性に関する情報を元に、発生毒性に関連するキーイベントや AOP の同定を試みた。既存化学物質点検プログラムで行われてきた各毒性のパラメータをデータベース化し、収録されている試験に対する予測能の指標を得るために、Derek Nexus と AOP に基づく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。その結果、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、特異性の低下も伴っており、結果的には 2 つの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を検証するため、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。パターンマイニング法 (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 の他の毒性に対する構造アラートの解析では 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できた。そのうち、ニトロ芳香族化合物に関連する作用メカニズムとして、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が原因となる雄性生殖能の低下を示す AOP を同定することができ、リードアクロスモデルの性能向上にむけて今回の AOP の開発手法が有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

- 4) 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.
2. 学会発表
- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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. *59th Annual Meeting of Society of Toxicology* (March 2020, Anaheim, USA)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 6 専門的なルールに基づくシステムの構造アラートの使用に関連して特定された
化学的分類

Compound class ^a	Numbers of Chemicals in DB and Scores ^b	Biological plausibility	<i>In silico</i> model knowledge	Recommendation(s)
Anthraquinones (DART decision tree)	3 compounds Signal: Dams = 0.5 Offspring = 0.67	Chemicals such as these can inhibit type II topoisomerase and thus disrupt DNA synthesis and repair.	Putative AOP linking genetic instability to developmental toxicity. These compounds were not captured by the current research model.	AOP for type II topoisomerase inhibition leading to DART. AOP network linking DART to genetic instability.
Perfluoro-carboxylic acids and perfluoro-sulphonic acids (DART decision tree)	5 compounds Signal: Dams = 0.2 Offspring = 0.5	Chemicals such as these are associated with DART which may be driven by disruption to the endocrine system.	No model in the AOP-based approach captures compounds of this type.	Mode of action analysis for compounds within this class. Synthesise structural alert or AOP accordingly.
Alerting for mitochondrial toxicity (Derek Nexus)	33 compounds Signal: Dams = 0.46 Offspring = 0.40	Mitochondria are essential for cell survival and therefore their perturbation of could lead to a variety of toxic outcomes.	Disruption to mitochondrial function is not a key event described in the AOP-based approach.	Synthesise an AOP network for mitochondrial toxicity and link to DART endpoints if appropriate.
Quaternary ammonium salts (Derek Nexus)	6 compounds Signal: Dams 0.42 Offspring 0.33	Possible mechanisms of action include disruption to membrane integrity or uncoupling/inhibition of oxidative phosphorylation.	No Lhasa model for predicting the DART effects of compounds within this class.	MOA analysis for quaternary ammonium salts. Synthesise structural alert or AOP accordingly.

- a. Method used to identify chemical class of concern is given in parentheses.
b. The signal for each endpoint is the average score for compounds captured by the feature described where compounds are assigned values according to the following rules: Selective toxicant = 1, non-selective toxicant = 0.5 and non-toxicant = 0.

表7 データセットと ToxCast 試験結果との相関マイニングによって、
生殖発生毒性傾向が潜在すると特定されたタンパク質標的

Compound class ^a	Numbers of Chemicals in DB and Scores ^b	Biological plausibility	<i>In silico</i> model knowledge	Recommendation(s)
Pregnane X receptor (ATG_PXRE_CIS_up')	Endpoint = Offspring Non-selective toxicants = excluded Signal = 0.18 (17 compounds)	Pregnane X receptor is involved in foetal liver metabolism. However, mouse knockout data indicates that the receptor is not required for normal development or reproduction.	Pregnane X receptor is not described in the AOP-based approach.	Investigate pregnane X receptor as a potential MIE for reproductive toxicity.
Matrix metalloproteinase 9 (BSK_KF3CT_MM_P9_down)	Endpoint = Offspring Non-selective toxicants = included Signal = 0.36 (11 compounds)	Matrix metalloproteinases breaks down extracellular matrix proteins and are required for cell differentiation and growth.	Matrix metalloproteinases are not described in the AOP-based approach.	Investigate matrix metalloproteinases as potential MIE for developmental toxicity AOPs.
SMAD1(ATG_BRE_CIS_up)	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = excluded Signal = 0.4 (5 compounds)	SMADs (mothers against dpp) are signal transducers in multiple signaling pathways. Knockout of SMAD genes result in embryo lethality in mice.	SMAD1 is not described in the AOP-based approach.	Investigate SMADs for potential roles developmental toxicity AOPs.
Histone deacetylases (BSK_3C_HLADR_down)	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = included Signal = 0.38 (8 compounds)	Histone deacetylases have roles in key cellular processes. AOP leading to testicular toxicity is described on the AOPwiki.	The broad family of histone deacetylases is described in AOP-based approach.	Create an AOP network for histone deacetylases inhibition leading to DART endpoints.
Chemokine ligand 2 (BSK_3C_MCP1_down)	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = included Signal = 0.43 (7 compounds)	Chemokines act as growth factors.	Chemokine signaling is not described in the AOP-based approach.	Create an AOP network for disruption of chemokine signaling leading to developmental toxicity.
Vascular cell adhesion molecule 1 (BSK_hDFCGF_VCAM1_down)	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = included Signal = 0.50 (8 compounds)	Inhibition in the placenta has been linked with restricted foetal growth.	Vascular cell adhesion molecules are not described in the AOP-based approach.	Investigate disruption to vascular cell adhesion molecules leading to reproductive toxicity.
P-selectin (BSK_4H_Pselectin_down)	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = included Signal = 0.44 (9 compounds)	P-selectin is involved in angiogenesis.	P-selectin is not described in the AOP-based approach.	Investigate disruption of P-selectin leading to reproductive toxicity. Implement models as appropriate.

- ToxCast assay identified as being predictive for adverse outcome is given in parentheses.
- The endpoint and method for compound classification using the donated dataset. The signal is the average score for active compounds in the ToxCast assay (IC₅₀ < 10 μM), where compounds are assigned values according to the following rules: Selective toxicant = 1, non-selective toxicant = 0.5 and non-toxicant = 0.
- Values were calculated using compounds which were present in both the aggregated Lhasa Limited DART dataset and the ToxCast assay dataset. Molecules in the Lhasa Limited dataset had a binary classification for DART and compounds were classified as active in the ToxCast assay if they were more potent than 10 μM. Prevalence is the ratio of compounds classified as a toxicant and the positive predictive value (PPV) is the ratio of compounds predicted as active in the *in vitro* assays which are classified also classified as toxicants in the Lhasa Limited dataset.

表 8 QSAR モデルを用いて、選択的毒性物質をフィンガープリント法でプロファイリングすることにより、生殖発生毒性との関連が潜在すると特定されたタンパク質標的

Compound class	Numbers of Chemicals in DB and Scores ^a	Biological plausibility	<i>In silico</i> model knowledge	Recommendation(s)
Lanosterol synthase	8 compounds Signal: Offspring = 0.188, Dams = 0.188	Part of the cholesterol biosynthesis pathway.	Lanosterol synthase is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with Lanosterol synthase. Implement models as appropriate.
P2X purinoceptor 2	14 compounds Signal: Dams = 0.11 Offspring = 0.18	Marketed pharmaceuticals show no DART effects	P2X purinoceptor 2 is not described in the AOP-based approach.	Curate relevant DART data for marketed pharmaceuticals targeting P2X purinoceptor 2
G-protein coupled receptor 84	2 compounds Signal: Dams = 0.5 Offspring = 0.5	The receptor plays a role during eye development in <i>Xenopus</i> .	G-protein coupled receptor 84 is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with G-protein coupled receptor 84. Implement models as appropriate.
Serine/threonine-protein kinase WEE1	1 compound Signal: Dams = 1 Offspring = 1	The kinase acts as a negative regulator of entry into mitosis (G2 to M transition). Mouse knockout data also highlights developmental toxicity issues.	Serine/threonine-protein kinase WEE1 is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with serine/threonine-protein kinase WEE1. Implement models as appropriate.
Cannabinoid CB2 receptor	11 compounds Signal: Dams = 0.273 Offspring = 0.227	The receptor plays a role in supporting female fertility.	Cannabinoid CB2 receptor is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with cannabinoid CB2 receptor. Implement models as appropriate.
Tyrosine kinase non-receptor protein 2	1 compound Signal: Dams and Offspring = 1	The kinase is involved in signal transduction.	Tyrosine kinase non-receptor protein 2 is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with tyrosine kinase non-receptor protein 2. Implement models as appropriate.
Somatostatin receptor 3	1 compound Signal: Dams = 1 Offspring = 0.5	Pharmaceuticals targeting the receptor are classified as pregnancy category C and disrupt for female fertility.	Somatostatin receptor 3 is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with somatostatin receptor 3. Implement models as appropriate.
Gonadotropin-releasing hormone receptor	12 compounds Signal: Dams = 0.25 Offspring = 0.292	Drugs targeting the receptor are contraindicated for use during pregnancy.	Gonadotropin-releasing hormone receptor is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with gonadotropin-releasing hormone receptor. Implement models as appropriate.

- a. The values represent the signal for each target. The signal is calculated as the average score for compounds predicted to interact with the target, where compounds are assigned values according to the following rules: Selective toxicant = 1, Non-selective toxicant = 0.5 and Non-toxicant = 0.