

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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アプローチの実用化に関する研究

（H24-化学-指定010）

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成 27（2015）年 3月

目 次

I. 総括研究報告書（別添 3）

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_____ 1

本間 正充

II. 分担研究報告書（別添 4）

遺伝毒性の予測に関する研究_____ 1 5

本間 正充/ 森田 健/ 山田 雅巳

反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究_____ 5 9

広瀬 明彦/ 長谷川 隆一

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_____ 7 1

小野 敦

類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究_____ 8 5

吉田 緑

カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究_____ 9 5

西村 哲治

III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）_____ 1 0 3

IV. 研究成果の刊行物・別冊_____ 1 0 7

**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
（H24-化学-指定-010）**

研究代表者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨

化学物質のヒト健康リスク評価に、構造活性相関（QSAR）や、カテゴリーアプローチ手法の導入が注目されている。本研究ではこれら手法の実用化に向けた改良と、得られた成果を基にした評価ストラテジーの提案を行う。本年度は以下の研究結果を得た。

A) 遺伝毒性の予測に関する研究

エームス試験に関しては、QSAR 予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行った。今年度は安衛法エームス試験データ約 2 万物質を入手し、データベースを完成させた。約 2 万物質のうち、12,962 物質が、分子量 500 以下の化学物質データとして入力可能で有り、且つ QSAR のトレーニングセットとして利用できる。この 12,962 物質のエームス試験データベースを公開しエームス/QSAR モデルの予測精度向上のための国際共同研究を開始する。

これまで *in vitro* の試験データから QSAR モデルを開発してきたが、*in vitro* でのアラートを *in vivo* へ拡大し、*in vivo* 遺伝毒性予測モデルの構築にも着手した。その前提として、*in vivo* 試験データの精査と、データベースの構築を行った。CGX DB による 756 の齧歯類発がん物質と 183 の非発がん物質について、*in vivo* 小核（MN）試験と *in vivo* トランスジェニック突然変異（TG）試験のデータを収集・解析した結果、MN では 379 物質の、TG では 78 物質の知見が得られ MN の感受性は 41.0%で、特異性は 60.5%、TG の感受性は 72.9%であることが判明した。*In vivo* MN の感受性(41.0%)は *in vitro* 試験(Ames 58.8%、MLA 73.1%、MN 78.7%、CA 65.6%)と比較して低いものであったが、一方、特異性(60.5%)は Ames に次いで高いものであった(Ames 73.9%、MLA 39.0%、MN 30.8%、CA 44.9%)。

ブルガス大学との共同研究により変異原性カテゴリー予測のためのメカニズムベースのサマリーワークフローを導入した。これまでのワークフローに新たに機械論的な理解により情報化される試験法と評価のための統合アプローチ（IATA）を反映させた。変異原性分類を基準とした入手可能な変異原性データを用いて、精巧な IATA から一連の試験による発がん物質のカテゴリー化を行った。IATA を用いると、遺伝毒性によるがん原性陽性を、高感度（80～85%）で偽陽性の割合を低く抑え（15～20%）予測できることが認められた。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースの TG 試験予測モデルの開発を行った。本年度は NIHS からのデータの提供（TGR データセット）により感度および正確度が大幅に向上した。本研究で陽性適中率が比較的高い（50%以上）アラートが 4 種確認された。これら 4 種のアラートを拡大適用した場合、感度の向上は最大で 60%に達すると考えられた。さらに感度を高め

るためには、さらなる試験データベースの拡張が望まれる。

B) 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究：

肝毒性について、これまでに開発した Rapid Prototypes (RP) アラートのうち更に調査すべきアラートの優先順位付けを行い、必要に応じて正式な肝毒性アラートとするための検討を行った。今年度は、残された 21 種の RP のすべてについて専門家による簡易評価を行った。その結果、フルアラートへの変更の可能性の高い 2 アラートをフルアラートとして作成した。一方、8 つの RP は無効化した。これにより、トレーニングセット化合物群に対する肝毒性の予測精度は、肝毒性の予測において感度 39.5%、特異性は 77.9%となった。

C) 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

毒性フェノタイプからの評価モデル構築の検討として、病理変化とあわせて血液化学及び、血液生化学的变化のクラスタリング解析を行い、毒性学的に意味のあるパラメータセットの変動を示すエンドポイントクラスター化学物質群について科学的に妥当と考えられるに共通部分構造の抽出に成功した。無毒性量の評価アプローチの検討においては、評価対象を特定の部分構造を有する化学物質群に限定することで精度の高い予測式の構築が可能であることが示唆された。さらに、化学構造全体の類似度と無毒性量との関係を解析した結果、類似度 70%以上の化学物質について無毒性量が得られていれば無毒性量の評価がある程度可能であることが示された。

D) 類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究

日本で評価された農薬の毒性について公表データを基に構造別に分類し、子宮内膜腺癌が増加した農薬を抽出し、各剤の既知情報から考えられる発がん機序予測の可否と化学構造および作用機序を解析した。子宮癌はラットの慢性毒性発がん性併合試験のみ計 7 剤で投与により発生頻度が増加した。7 剤のうち 5 剤では機序試験が実施されており、このうち化学構造の異なる 4 剤では機序試験から発がん機序が予測できた。機序試験が実施されていない 2 剤は構造、作用機序および毒性プロファイルが類似していたが、発がん機序は予測できなかった。これらの結果から、子宮発がん性機序予測には機序試験が重要であることが確認された。

E) カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

有機リン系殺虫剤を対象物質群として、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性阻害を指標とした神経系への毒性に関して、作用と構造の関係を検討した。個々の物質の評価では、問題とする作用濃度ではないが、類似の基本骨格をもち、側鎖の構造は変化に富み多岐にわたることから、それらの環境に共存する状況における複合暴露については注意を払う必要がある。今後、さらにカテゴリー化を進め、詳細な検討を行うことが重要な課題である。

キーワード；化学物質管理、構造活性相関 (QSAR)、カテゴリーアプローチ、遺伝毒性、一般毒性

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

小野 敦

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部・主任研究官

山田 雅巳

国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部・室長

吉田 緑

国立医薬品食品衛生研究所 病理部・室長

森田 健

国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部・室長

長谷川 隆一

国立医薬品食品衛生研究所・客員研究員

西村 哲台

帝京平成大学 薬学部・教授

ゲットとしたアラート開発等により有用性に関する知見を得ている。

本研究では、得られたシステムのリスク評価への実用化に向けて、予測精度の向上を目指す。遺伝毒性に関してはエームス試験、染色体異常試験、小核試験、トランスジェニック突然変異 (TG) 試験の大規模データベースを再構築し、適切かつ多数の遺伝毒性アラートを抽出し、遺伝毒性の予測精度の格段の向上を行う。一方、反復毒性については、これまでのところ国際的に認められる信頼性の高い手法は提案されていない。本研究では、病理変化や生化学的変化などの毒性変化の組み合わせにより毒性の機序分類を行い、一方で化学構造面の類似性と毒性機序の類似性について相関性について解析を行う。これにより、高精度の予測モデルやカテゴリー候補物質群の構築および OECD で検討されている毒性パスウェイ (AOP) 候補となる情報を得ることが可能となる。さらに、同様の取り組みを行っている米国 EPA や EU および OECD における取組について情報収集を行い、国際強調に対応した利用法について検討し、最終的に、実際の評価過程でカテゴリーアプローチや、QSAR を用いるストラテジーを国際的に提案することで日本の国際貢献へも寄与することを目的とする。

A . 研究目的

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 (定量的) 構造活性相関 (Q)SAR) 手法やカテゴリーアプローチの化学物質評価における実用化を目的として、それぞれについて規制へ適用可能な手法を構築および改良を行うとともに、最終的に得られた成果をもとにした評価ストラテジーの提案を行うことを目的としている。数万種に及ぶ安全性評価未評価の既存化学物質のリスク管理は、世界的な課題となっており、カテゴリーアプローチや(Q)SAR の利用については、OECD を始めとして EC 諸国および米国 EPA においても検討されているが、実際のヒト健康リスク評価における利用は未だ限定的である。医薬品においては、変異原性不純物の評価に QSAR やカテゴリーアプローチが本格的に利用されつつあり、この流れは一般化学物質の評価・管理に波及することが予想される。我々は、これまでにヒト健康影響に関するスクリーニング試験の内、変異原性、染色体異常について 3 種のプログラムを用いた予測システムの開発を、反復毒性については肝毒性と腎毒性をター

B . 研究方法

1) エームス試験データベースの再構築

厚生労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質対策課より昨年度入手した。労働安全衛生法による届け出のあった化学物質には、混合物・ポリマーなども含まれている。構造活性相関はあくまでも化学物質の構造に基づく予測を行うので、そのような、「構造式が特定できない物質」は、Ames 試験結果があっても対象にならない。また、構造情報を得るために有用な CAS 番号の情報がない物質が約半数であったことから、CAS 番号の有無による振り分けを行った。以上のことを考慮し、現在までに 12,962 の化学物質の Ames 試験の情

報(物質名称と試験結果(陽性、陰性等の判定))を作成ソフトJChemに入力し、データベースを完成させた。

2) In vivo 遺伝毒性試験の発がん物質検出性との関連

カーランドらによる発がん性・遺伝毒性データベース(CGX DB)は、756の齧歯類発がん物質と183の非発がん物質について、4種の*in vitro* 遺伝毒性試験情報(Ames, MLA, *in vitro* MN, *in vitro* CA)が収載されている。*In vivo* MNに関するレビュー論文あるいは大規模試験報告書、EUリスク評価書やOECD SIDS文書などの国際的化学品評価文書、US NTPのデータベースサーチ、ならびにPubMed文献サーチを用いた。また、*in vivo* TGについては、OECDのレビュー文書および食品添加物の遺伝毒性試験報告書を用い、有用なデータを検索した。遺伝毒性試験結果とCPDBの発がん性データを比較し、その一致率を評価した。

3) 遺伝毒性エンドポイント予測のための段階的アプローチ: 化学物質の変異原性を予測するためのパスウェイベースのワークフロー

本研究の最初の部分では、これまで発表の一環として収集された162種類の化学物質のデータセット(Mekenyanら、2012年)に依拠した。これらの物質について入手可能なデータは、それぞれの試験の能力に従ってカテゴリー化した。組織に対する精緻化されたレベル全体の試験結果について、試験の能力を踏まえて再検討した。

データセットの対象とする試験系は、以下の試験タイプ由来とした。

- ・ 復帰突然変異検出のため、アミノ酸要求性の複数の細菌株を用いる細菌復帰突然変異試験(Ames試験)(OECD TG 471)
- ・ 染色体の構造異常および数異常を検出する哺乳類の染色体異常試験(OECD TG 473)
- ・ 遺伝子突然変異および染色体構造異常を検出するマウスリンフォーマ試験(OECD TG 476)
- ・ 肝細胞を用いる不定期DNA合成(UDS)(OECD TG 486)

- ・ アルカリ単細胞ゲル電気泳動法(コメットアッセイ)(現時点でOECD TGなし;国際的な同意が得られたプロトコールが入手可能(Olive and Banath(2006年)参照))
- ・ トランスジェニックげっ歯類突然変異試験(OECD TG 488)
- ・ マウス肝細胞を用いる*in vivo*小核試験(現時点でOECD TGなし;国際的な同意が得られたプロトコールが入手可能(Clietら、1989年参照))
- ・ 骨髄小核試験(OECD TG 474)

4) Derek Nexus を用いて in vivo 変異原性のエンドポイントを予測するためのトランスジェニックげっ歯類データの利用

NIHSより、188種の異なる化合物に関するTGRアッセイデータのデータセットが提供された。このデータセットは、OECDが発表したレビュー(Lambert et al)に提示されたTGRアッセイデータを用いてNIHSがまとめたものである。Lhasa社では、このデータセットにおけるTGRでの判定結果に基づき、以下のルールに従ってこれらの化合物を陽性(113化合物)または陰性(75化合物)の結果に振り分けた。

- ・ + = 標的組織で陽性(発がん性データが利用できる場合)。総合判定は陽性とする
- ・ - = 標的組織で陰性(発がん性データが利用できる場合)かつ試験対象とされたことがある他のいかなる組織でも陰性(コメント欄に記述)。総合判定は陰性とする。
- ・ na (+) = 標的組織で陰性(発がん性データが利用できる場合)であるが、コメント欄に記載されている他の組織で陽性。総合判定は陽性とする。
- ・ na (-) = 標的組織で陰性(発がん性データが利用できる場合)かつコメント欄に記載されている試験対象とされた他の組織で陰性。総合判定は陰性とする。

2014年に公開されたDerekの知識ベース(KB)を用い(Derek Nexus 4.0)、*in vitro*変異原性に関するアラートに対してこのデータセットを検討した。このKBには*in vitro*変異原性

に関するアラートが 118 種収録されており、これらのアラートのうち 39 種が TGR アッセイデータに関連するものであった。

5)反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究

5.1 データセット

昨年度と同様の反復投与毒性試験結果データのうち、より詳細な病理組織学データを含む 197 化合物のデータセットを使用した。

5.2 RPs の優先順位付け

RP の優先順位付けには、昨年度と同様に、データセットに含まれているアラートの裏付けとなる化合物数および Vitic に収録されているアラートをアクティブ化する肝毒性データを含む化合物数を考慮した。追加的な手順として、残されている RP のそれぞれについて簡易評価を行った。この分析には、残されている 22 種の RP アラートの各クラスに関する公開毒性データおよびメカニズムデータの解釈を含めた。これをもとに RP アラートの最終的なスプレッドシートを作成し、検討結果に基づいて各 RP アラートを以下のように分類した。

- ・ クラス 1 – フルアラート構築の可能性のあるアラート
- ・ クラス 2 – 保留 (フルアラート構築に利用できる公開データはあるが不十分、またはメカニズムに基づいた根拠が不十分)するアラート
- ・ クラス 3 – 無効化すべきアラート (公開文献中にデータなし、活性に当該 toxicophore との関連なし)

6)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

これまでの研究で整理した既存化学物質点検による試験結果データベースを用いて血液化学及び血液生化学的变化が有意に認められた用量分布についてパラメータごとに解析を行った。血液化学及び血液生化学的变化が有意に認められた最低用量及び病理変化が認められた最低用量をパラメータとしてフェノタイプ及び化学物質

のクラスタリング解析を行った。その中で毒性学的に意味のあると考えられた 2 つのクラスターについて共通する化学構造的特徴の検討を行い、さらに構造記述子や部分構造セットを用いた判別モデルを構築して化学構造からの評価の可能性を検討した。既存化学物質点検による試験結果データベースを用いて化学物質間の構造類似度と無毒性量の近似度について解析した。毒性の強い化学物質群に共通する特徴部分構造の幾つかに着目して、特徴構造を有する化学物質群のみに限定して基本的物性と無毒性量の相関性について検討を行った。

7)類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究

公表されている約 200 の農薬の報告書を基に、ラットおよびマウスの長期毒性試験(慢性毒性発がん性併合試験/発がん性試験)で投与により子宮内膜腺癌が増加した農薬を検索した。子宮腫瘍が増加した各剤について、農薬名 (common name) 農薬の分類、化学構造の特徴、農薬としての作用機序、毒性プロファイル(急性毒性、毒性の特徴、1 日許容摂取量 (ADI) とその設定根拠試験における最小毒性量 (LOAEL) と無毒性量 (NOAEL) 子宮癌の NOAEL と LOAEL) と評価年を記載した。

また公表データより機序試験の有無についても検索した。まず既知の子宮がん発生機序をタイプ A から E の 5 つに分けて評価した。

8)カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

ネオニコチノイド系殺虫剤であるアセタミプリド、イミダクロプリド、チアクロプリド、ニテンピラム、チアメトキサム、ジノテフラン、クロチアニジン、フィプロニル、フロニカミドに対して、ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした評価を行った。

C . 研究結果

1) エームス試験データベースの再構築

エームス試験データの内訳は以下の通りであ

る。

- ・ 入手したデータ数：20,761
- ・ 構造式が描けないと判断したデータ数：7,257（混合物・ポリマー等）
- ・ 入力済み：12,692（CAS#有：7,972 / CAS#無：4,990）
- ・ 入力保留中のデータ数（CAS#に関わらず）：467
- ・ 重複しているデータ数（CAS#に関わらず）：75

入力データの中で、陽性判定物質の割合は約14%で、そのうち3分の1が強い陽性とされるものであった。陰性判定物質は86%であった。

2) *In vivo* 遺伝毒性試験の発がん物質検出性との関連

In vivo MNの発がん性に対する感受性は41.0%（120/293）、特異性は60.5%（52/86）であり、一致性は45.4%（172/379）で良好といえるものではなかった。一方、*in vivo* TGの発がん性に対する感受性は、72.9%（54/74）と比較的高いものであった。また、Amesと*in vivo* MNを組合せた場合の感受性および特異性も評価した。発がん物質についてAmesと*in vivo* MNの両試験を実施して、少なくとも1つの試験で陽性となる感受性は68.7%で、カークランドらが2005年に報告したAmesと他の*in vitro*試験（MLA, MN, CA）との組合せによる感受性の75.3%～81.0%に比べると低かった。一方、非発がん物質についてAmesと*in vivo* MNの両試験を実施して、両方の試験で陰性となる特異性は45.3%で、Amesと他の*in vitro*試験（MLA, MN, CA）との組合せによる特異性の12.0%～34.6%に比べると高かった。

3) 遺伝毒性エンドポイント予測のための段階的アプローチ：化学物質の変異原性を予測するためのパスウェイベースのワークフロー

これまでのワークフロー（Mekenyan et al. 2012）では、起源に関係なく*in vitro* 変異原性試験の結果に基づき、陽性か陰性かでまず化学物質を細分した。次の分類は肝臓を用いる*in vivo* 遺伝毒性作用に基づき、続いて*in vivo* MNTの結

果とした。レベル全体の結果に不一致が生じた物質については、例えば*in vivo* のみの作用として、いわゆる基質チャネリングや化学物質の代謝的解毒の発生、骨髄など肝臓から離れた組織への接近の間にタンパク質（または他の生体分子）との相互作用能を獲得など、諸因子を考慮することにより可能な限り正当化された。こうした正当化は事例ごとの基準では可能であったが、レベルとは無関係に、少なくとも1つ陽性の変異原性データを不採用にすることが1つの欠点であった

例えば、レベル1の場合、最終的な変異原性が陽性であると、Ames-S9、CA、またはMLA由来データが陽性であることに基づく割り当てであると考えられる。これと同じ方法が、レベル2および3における*in vivo* 変異原性の割り当てに用いられると考えられる。故に、レベル1の最終的な変異原性の判定が、Ames試験データ陰性かつCAデータ陽性の結果に基づき陽性に割り当てられた場合、この化学物質はレベル2でなお陰性になることが考えられる。何故なら、レベル2で選択される試験には、CA試験に匹敵する試験の能力がなかったからである。そのため、この化学物質の場合、*in vitro* 試験では陽性、肝臓を用いる*in vivo* 試験では陰性であると判断され、実際には可能性がきわめて低い肝解毒作用関与の仮説が立てられると考えられる。今回の*in vitro*、*in vivo*における外挿のワークフローは、こうした欠点への対処のため精緻化された。

4) Derek Nexus を用いて *in vivo* 変異原性のエンドポイントを予測するためのトランスジェニックげっ歯類データの利用

検討対象とした7種のアラートのうち6種は*in vivo*での活性と関連性があると判断され、*in vivo*に拡大適用した。これらのアラートはいずれも*in vivo*データに対する十分な予測性能を有しており、活性のメカニズムは*in vitro*および*in vivo*のエンドポイントにおいて同一のものであると考えられた。また、哺乳類における推論レベルは、拡大適用としたアラートの大半（6種中5種）で「妥当」であるとみなした。これは、これらのアラートは陽性適中率が比較的高いこと、お

よび観察された活性は特定の toxicophore に起因するものであると予想されたことに基づいた判定である。

一方、芳香族アミンおよびアミドに対するアラート 352 については推論レベルを下げて「不確か」とし、このアラートの予測性能が信頼性に劣ることを示している。

TGR アッセイにおいていくつかの芳香族アゾ化合物が変異原性を示すことが報告されているが (Lambert et al.) これらの化合物はその活性に関与する可能性のある他の構造的特徴(すなわち、芳香族アミン基)も有していた。結果として、このアラートに対するコメントを更新したが、新たなルールは追加しなかった。

改良したアラートを含む新しい知識ベース (Derek KB 2014 + 第 8 年次 NIHS) の予測性能は、NIHS の TGR データセットを用いて評価した結果、感度 (10% から 41% に上昇) および正確度 (46% から 62% に上昇) に大幅な向上が認められ、これに伴う特異度の低下 (100% から 93%) はごくわずかであった。

5) 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究

簡易評価によるクラス分類の結果、クラス 1 には 9 アラート、クラス 2 は 5 アラート、クラス 3 には 8 アラートに分類することができた。

今年度は、クラス 1 のうち 2 つのアラート(「2-アミノピリミジン」、「スチレンまたはその誘導体」)についてフルアラートへの変更を行うことができた。さらに、フルアラートに変更することができないと思われるクラス 3 の 8 種の RP すべてを無効化することができた。

■ 新たなフルアラート

- ・ RP008 「2-アミノピリミジン」
- ・ RP024 「スチレンまたはその誘導体」

■ 無効化した RP アラート

- ・ RP003: ヒダントインまたはその誘導体
- ・ RP004: チオテトラゾールまたはその誘導体
- ・ RP006: チアゾリジノンまたはその誘導体

- ・ RP009: 硫化ジフェニル、スルホキシドまたはスルホン
- ・ RP018: ピロリジンまたはその誘導体
- ・ RP022: フルオロキノロン-3-カルボン酸
- ・ RP028: 第三級アルコールまたはエーテル
- ・ RP031: O-tert-ブチルエステルまたはカルバメート

以上、10 種の RP アラートを検討した結果、2 種の新規アラートを実行し、10 種の RP アラートを無効化した結果、データセットにおける Derek の肝毒性エンドポイント予測性能の変化を表 1 に示す。

表 1. 予測性能比較

	Hepatotoxicity		
	感度%	特異性%	一致率%
昨年度	45.4	75.5	64.3
今年度	39.5	77.9	63.6

¥

6) 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

血液学的検査では、RBC, Hct, Hgb の変化が他に比べ低い用量域で認められた。一方、血液生化学的变化については、いずれにおいても同様の用量域で変化が認められた。クラスタリングの結果、幾つかのフェノタイプクラスターで特徴的に変化する化合物群があることが示唆された。2 つのフェノタイプクラスターの変動が認められる化学物質群について、共通部分構造の抽出を試みた結果、脂質代謝への影響により肝肥大する化学物質を特徴づけるクラスターと判断された。特徴部分構造として、多種のアルキルベンゼン骨格が抽出された。また、RBC, Hct, Hgb の低下に特徴づけられる貧血を惹起する化学物質を特徴づけるクラスターと判断され、それに関する特徴部分構造として、アニリン骨格が抽出された。

最終的な判別モデルの予測率は学習セットについてはほぼ 100% であったが、評価用セットについては、50% 程度の予測率に留まった。類似度が 70% を超える物質の無毒性量は、評価対象物質と近似するのに対して、構造類似度が 50% 以

下の物質では、無毒性量の近似は認められず、構造類似度からの無毒性量の予測には利用出来ないことが示された。

7)類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究

検索した農薬において、投与によって子宮内腺癌の頻度が7化合物において増加し、これらは全てラット慢性毒性発がん性試験併合試験で認められた。農薬の分類では、殺虫剤が2剤、殺菌剤が3剤、除草剤が2剤であった。農薬としての作用機序の点からは、除草剤のピリミノバックメチル、メタゾスルフロンはアセト乳酸合成酵素(ALS)阻害作用、殺菌剤であるイソピラザム、セダキサンおよび殺虫剤シエノピラフェンはミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素阻害剤、殺菌剤のベンチアバルカルブイソプロピルと殺虫剤のスピロジクロフェンは脂質系生合成阻害を有する化合物であった。7剤の化学構造は、5剤は異なっていた。2剤(イソピラザム、セダキサン)のみピラゾールカルボキサミド系と類似した化学構造を有していた。

発がん用量の比較において、子宮内腺癌の増加は6剤で高用量のみに認められた。ADIの設定根拠試験との比較では、差が最も小さい剤がベンチアバルカルブイソプロピルであったが子宮癌が増加した投与量は318mg/kg体重以上と大量投与条件下であった。ピリミノバックツメチルではADI設定根拠試験との差が200倍近かった。

8)カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

ネオニコチノイド系殺虫剤は、イミダクリプリドが開発されて、-C-N-C-N-の構造を共通に有する類似の作用性を持つ殺虫剤として、開発されて登録されている(図1)。アセタミプリドとイミダクリプリド及びニテンピラムが類似の骨格構造を有し、チアクロプリド、チアメトキサム及びクロチアニジンが類似の骨格構造を有し、ジノテフランが他の2群と異なった構造をもつ。アセタミプリドが最も作用が強く、ダイアジノンオキソンに比較して、相対濃度として約1150倍

に相当する濃度(1150分の1の作用)でAChEの阻害を示した。アセタミプリド(1)に対して、ジノテフランが相対濃度として0.08であった他は0.1~0.3に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N-の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

D. 考 察

エームス試験に関しては、QSARによる予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行っている。これら試験データをQSARのトレーニングセットに組み入れることにより、格段の予測精度の向上が期待できる。昨年度から、安衛法エームス試験データ20,761物質を入手し、データベース化に着手した。うち、12,962物質が、分子量500以下の化学物質データとして入力可能で有り、これをすべてデータベース化した。

遺伝毒性*in vivo*試験に関しては、CGX DBによる756の齧歯類発がん物質と183の非発がん物質について、*in vivo* MNと*in vivo* TGのデータを収集・解析した。*In vivo* MNの発がん性に対する感受性は41.0%で、特異性は60.5%、*in vivo* TGの感受性は72.9%であることが判明した。また、Amesと*in vivo* MNを組合せた場合の感受性は68.7%で、特異性は45.3%であった。*In vivo* MNの感受性(41.0%)は*in vitro*試験(Ames 58.8%、MLA 73.1%、MN 78.7%、CA 65.6%)と比較して低いものであったが、一方、特異性(60.5%)はAmesに次いで高いものであった(Ames 73.9%、MLA 39.0%、MN 30.8%、CA 44.9%)。 *In vivo* - *in vitro*比較においては、*in vivo* MNと*in vitro* CAの一致性を検証した。発がん物質に対する両試験の一致性は53.2%、非発がん物質に対しては37.3%で、発がん物質と非発がん物質を統合すると49.2%であった。また、発がん物質と非発がん物質を統合した場合の*in vivo* TGとAmesの一致性は78.4%で、高かった。今後、*in vivo* MNと*in vitro* CAにおける一致性の低さの要因(*in vitro* CAにおける反応の代謝活性化系の有無や

in vivo MNの曝露経路の妥当性などを含む)あるいは化学物質群に対する特性等を解明することにより、より精度の高いQSARの開発につながるものと考えられる。

ブルガス大学との共同研究により変異原性カテゴリー予測のためのメカニズムベースのサマリーワークフローを導入した。これまで作成された遺伝毒性に関する *in vitro*、*in vivo* における外挿のワークフローを、試験の能力に基づいて精緻化した。今回、改訂ワークフローを通じ化学物質 162 種類のデータセットを再評価し、データの結果を解釈する際の欠点に対処した。これにより、最初の TIMES モデルを開発し、その見識を改善に用いた手法からさまざまな示唆が得られる。今回の改訂ワークフローでは、GHS の変異原性カテゴリーから陽性の遺伝毒性を予測する際、その実用性検討の取り組みまで範囲を広げた。試験の能力の類似性または相違性を明らかにした各種組み合わせの試験系について、その性能を評価してもほとんど差異が認められなかった。ただし、研究に利用可能な一連の試験が限られていたため、今回の結果には偏りが含まれていたことが考えられる。

今後の作業では、このワークフローを拡大し入手可能な TIMES モデルの結果を取り込み、体系的な利用に向け、このワークフローを実践的な IATA に取り入れていくことになる。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースのトランスジェニック突然変異 (TG) 試験予測モデルの開発を行った。本年度は NIHS からのデータの提供 (TGR データセット) により感度および正確度が大幅に向上した。本研究で陽性適中率が比較的高い (50%以上) アラートが 4 種確認された。これら 4 種のアラートを拡大適用した場合、感度の向上は最大で 60%に達すると考えられた。さらに感度を高めるためには、NIHS の TGR データセットに含まれる関連データを用いて、その他の *in vitro* 変異原性アラートを拡大適用する必要がある。しかし、これらのアラートの対象とされている活性化合物は 3 種未満であり、多くのアラート (32 種中 16 種) が 1 種のみ活性化合物を対象とするものである。したがって、NIHS の

TGR データセット以外に根拠となるデータが得られない限り、これらのアラートの多くは拡大適用に該当する可能性が低いと考えられる。従って、さらなる試験データベースの拡張が望まれる。

肝毒性の予測に関しては、これまでに開発した Rapid Prototypes (RP) アラートのうち更に調査すべきアラートの優先順位付けを行い、必要に応じて正式な肝毒性アラートとするための検討を行ってきている。今年度は、残された 21 種の RP のすべてについて専門家による簡易評価を行った。その結果、フルアラートへの変更の可能性の高い 2 アラートをフルアラートとして作成した。一方、8 つの RP は活性の理論的根拠を確立することができないか、同定された toxicophore と活性とに関連性がないと判断されこれらのアラートを無効化した。これにより、トレーニングセット化合物群に対する肝毒性の予測精度は、肝毒性の予測において感度 39.5%、特異性は 77.9% となった。本年度の検討により、既存の構造アラートを効果的に利用して関連する毒性メカニズムに基づいた新たなエンドポイントに関するアラートの構築を迅速化できることが実証された。また、RP を正確に優先順位付けすることがフルアラート構築の効果的な出発点となることが示された。

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。本研究では、反復投与毒性の化学構造からの評価について、毒性フェノタイプについての予測評価と無毒性量の予測評価の両面からのアプローチについて検討を進めてきた。血液化学及び血液生化学的变化を病理変化とあわせてクラスタリング解析を行った結果、毒性評価においてもそれぞれ関連する項目として評価される脂質代謝に関わる項目や貧血症状を示す項目がクラスターとして抽出された。これらをフェノタイプクラスターとして変動の認められた化学物質について共通部分構造の抽出を行った結果、脂質代謝異常については、アルキルベンゼン骨格が、貧血についてはアニリン骨格が抽出された。これ

らの結果は、おおよそ既知ではあるが、本解析アプローチの妥当性及び有用性を示していると考察された。本年度の解析結果から、対象物質の無毒性量については、構造類似度が高い化学物質の情報からの予測評価の可能性及び特定の部分構造を有する化学物質に限定した予測評価式構築の可能性が示された。構造類似度からの評価や特定の部分構造からの評価モデルについて適用範囲を明確化し、それぞれの評価モデルの適用範囲であると評価された化学物質について評価を行うことで、適用範囲の化学物質についてのみではあるが、実用的な評価が可能になるとともに、さらに、適用範囲の異なる複数のモデルを構築し組み合わせることにより多くの化学物質についての評価を可能にする評価スキームの構築が可能であると考えられる。

ラットの子宮発がん作用機序として、エストロゲン作用、持続的な相対的高エストロゲン状態の持続、あるいは肝臓におけるエストロゲン代謝変調によるカテコールエストロゲンの産生の3つの経路が知られている。今回検索した7剤中5剤については機序試験が実施され、そのうち各2剤が相対的高エストロゲン状態の持続およびエストロゲン代謝変調によるカテコールエストロゲンの産生であったことから、これら4剤の試験では適切な機序試験が実施されていると判断され、長期毒性試験で発がん性が認められた場合の適切な機序試験の実施が発がん機序予測さらにはヒトへの外挿性予測のためには重要であると結論した。

一方、今回の検索結果より化学構造から子宮発がん機序を予測することはできなかった。しかし興味ある点として、化学構造が類似していた2剤では適切な機序試験が実施されていないために発がん機序を予測することはできなかったが、毒性のプロファイルも類似していることから同様の機序により子宮内膜腺癌が増加した可能性が示唆された。

ネオニコチノイド系殺虫剤は、天然物であるニコチンと同様、神経のシナプス後膜に局在するアセチルコリン受容体に結合し、神経興奮を遮断することにより毒性作用を発現されるとされてい

る。

ネオニコチノイド系殺虫剤7物質の間で、アセタミプリドが、AChE に対して最も作用が強く、ダイアジノンオキソンに比較して、相対濃度として約 1150 倍に相当する濃度（1150 分の一の作用）で AChE の阻害を示した。アセタミプリド（1）に対して、ジノテフランが相対濃度として 0.08 であった他は、0.1~0.3 に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N- の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

E. 結論

本研究では、構造活性相関やカテゴリーアプローチ手法の化学物質のヒト健康リスク評価における実用化に向けた改良と、得られた成果を基にしたストラテジーの提案を行う。本年度は計画通りの研究結果を得た。今後の方向性としては、エームス試験に関しては、既存の QSAR ツールの予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行う。公開可能なデータを公開し、QSAR ツールの予測性向上のための国際共同研究を組織し、この分野で国際的イニシャティブを取る。In vitro の試験データから QSAR モデルを開発してきたが、in vitro でのアラートを in vivo へ拡大し、in vivo 遺伝毒性予測モデルの構築にも着手した。その前提として、in vivo 試験データの精査と、データベースの構築を行う。Ames 試験の予測だけでなく、他の遺伝毒性エンドポイントの予測モデルも着実に開発を続ける。

反復毒性については、予測対象の毒性指標を毒性学的な観点から整理してデータベース化し毒性機序の分類を行い、化学構造面の類似性と毒性の類似性について相関解析を行うことで、高精度の予測モデルやカテゴリー評価法を構築することで実用化に貢献する。今回、その結果、2つのフルアラート作成と、8つの RP の無効化により肝毒性の予測精度は、感度 39.5%、特異性は 77.9%となった。

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、信頼出来る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た。幅広い化学構造に対応したデータベースの拡充が今後の課題である。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。また、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については、化学構造のみで評価を行うのではなく、毒性発現メカニズムに立脚した *in vitro* 試験や少数例の動物試験との組み合わせによる評価手法の検討も重要である。

毒性エンドポイントに関しては、これまでの肝毒性、腎毒性だけでなく、血液毒性、脾臓毒性、神経毒性にも目を向けた。ここでの蓄積データについては、OECD 等で提案される手法の評価等に再利用可能な既知見情報になり得る。本研究成果をもとに OECD や諸外国との情報交換を行い、最終的に実際の評価過程で、カテゴリアプローチや QSAR を使うための評価ストラテジーを提案し、国際貢献に寄与したい。

F . 研究発表

研究発表

誌上発表

1. Petkov, PI, Patlewicz, G, Schultz, TW, Honma, M, Todorov, T, Kotov, Dimitrov, SD, Donner, M, Mekenyan, OG, A feasibility study: Can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity? Regul. Tox. Pharm., 72, 17-25 (2015)
2. Morita, T., Miyajima, A., Hatano, A., Honma, M.: Effects of the proposed top concentration limit on an *in vitro* chromosomal aberration test to assay

sensitivity or to reduce the number of false positives, Mutation Research, 769, 34–49 (2014)

3. Kirkland, D, Zeiger, E, Madia, F, Gooderham, N, Kasper, P, Lynch, A, Morita, T, Ouedraogo, G, Morte, JM, Pfuhler, S, Rogiers, V, Schulz, M, Thybaud, V, Benthem, J, Vanparys, P, Worth, A, Corvi, R., Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop, Mutation Research 755, 55–68, (2014)
4. Ema, M., Endoh, K., Fukushima, R., Fujii, S., Hara, H., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Hojo, H., Horimoto, M., Hoshino, N., Hosokawa, Y., Imai, Y., Inada, H., Inawaka, K., Itoh, K., Katsumata, Y., Izumi, H., Kato, H., Maeda, M., Matsumoto, K., Matsuo, S., Matsuoka, T., Matsuura, I., Mineshima, H., Miwa, Y., Nakano, N., Naya, M., Noyori, H., Ohta, T., Oku, H., Ono, A., Shimizu, T., Shimomura, K., Takakura, I., Tanaka, R., Tateishi, T., Tominaga, Y., Uesugi, T., Urakawa, C., Yabe, K., Yamashita, A., Yamauchi, T. and Yokoi, R., Historical control data on developmental toxicity studies in rodents. Congenit. Anom. (Kyoto). 54, 150-161, 2014.
5. Kato, H., Fujii, S., Takahashi, M., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. and Hirose, A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluorododecanoic acid in rats. Environ Toxicol doi: 10.1002/tox.21996. [Epub ahead of print]
6. Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M.,

- Yokoyama, K. and Hirose, A., Evaluation of *in vivo* mutagenicity of hydroquinone in Muta™ mice. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 775-776, 94-98, 2014.
7. Yamada T, Tanaka Y, Hasegawa R, Sakuratani Y, Yamazoe Y, Ono A, Hirose A, Hayashi M. (2014) Development of a category approach to predict the testicular toxicity of chemical substances structurally related to ethylene glycol methyl ether. *Regul Toxicol Pharmacol*. 70, 711-719.
 8. 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 平田睦子, 小野敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦, OECD 化学物質対策の動向(第 24 報) - 第 3 回 OECD 化学物質共同評価会議(2012 年ルツェルン), 化学生物総合管理, 10, 25-36, 2014.
 9. 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 小林克己, 平田睦子, 小野敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦, OECD 化学物質対策の動向(第 25 報) - 第 4、5 回 OECD 化学物質共同評価会議(2013 年パリ、ワシントン DC), 化学生物総合管理, 10, 46-57, 2014.
 10. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, OECD 化学物質共同評価プログラム: 第 5 回化学物質共同評価会議概要, 化学生物総合管理, 10, 37-45, 2014.
 11. Kobayashi, K., Pillai, K., Michael, M., Cherian, K., Ono, A.: Transition of Japan's statistical tools by decision tree for quantitative data obtained from the general repeated dose administration toxicity studies in rodents, *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3:507-520, 2014.
 12. Takahashi, M., Ishida, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Hirose, A.: Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats., *J Toxicol Sci*, 39:97-108, 2014.

学会発表

1. 本間正充: 医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理, 第 350 回 CBI 学会研究講演会 2014 年 5 月 東京
2. 本間正充: 日本環境変異原学会レギュラトリーサイエンス WG 活動, 日本環境変異原学会公開シンポジウム 2014 年 5 月 東京
3. Honma, M et al.: Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing genotoxicity by targeted mutagenesis, 43rd EEMS Annual Meeting 2014 年 7 月 ランカスター・英国
4. M. Honma: Use of QSAR Tools for Hazard Identification of Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, 9th World Congress on Alternative and Animal Use Sciences (WC9), 2014 年 8 月 プラハ・チェコ
5. 本間正充: インシリコによる医薬品中不純物の安全性評価と、その向上に向けた国際共同研究, CBI 学会 2014 年大会プレミィングセッション 2014 年 10 月 東京
6. Honma, M.: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014 年 11 月 上海・中国
7. 本間正充: 遺伝毒性インテリジェントテストシステム, 日本環境変異原学会第 43 回大会 2014 年 11 月 東京
8. 本間正充: QSAR を利用した医薬品中の遺伝毒性不純物の評価と管理, 日本動物実験代替法学会第 27 回大会 2014 年 12 月 横浜
9. M. Honma et al.: Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014 年 12 月 コルカタ・インド
10. Takeshi Morita and Shuichi Hamada: The Rat Liver Micronucleus Test: Summary of the 2013 IWGT Working Group on the

- Liver Micronucleus Test, 2014 GTA
(Genetic Toxicology Association) ,
Newark, US, 7 May 2014.
11. 森田 健: Ames 陽性知見は、発がん性や遺伝毒性リスクを全て同じレベルで示唆するか? JEMS・BMS 研究会 第 51 回定例会 (2014 年 6 月 6 日、大橋会館、東京)
 12. 森田 健、古田光子、春日文子: 有害性物質の毒物劇物への該当性評価、第 36 回日本中毒学会総会(2014 年 7 月 25-26 日、板橋、東京)
 13. Morita, T, Kasuga, F: Comparison of GHS classification of CMR substances in EU and Japan, 2014 EuroTox, The 50th Congress of the European Societies of Toxicology (2014.9 , Edinburgh, UK)
 14. Hamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada S, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Sui H, Shimada Y, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Terashima Y, Takasawa H, Narumi K, Wako Y, Kawasako K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus Assay Using Young Adult Rats (IV) : Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS., Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS), 45th Annual Meeting 2014: Hilton Orlando Lake Buena Vista, Orlando, Florida September 13–17, 2014.
 15. 森田健、小宮佐知子: EU、ドイツおよび日本における生殖細胞変異原の分類比較、日本環境変異原学会第 43 回大会、2014 年 12 月 4-5 日、東京
 16. Hirose, A, Fujii, S., Suzuki, T., Kato, H., Kawamura, T., Takahashi, M., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Nishimaki-Mogami, T., Nishimura, T. and Ema, M. Combined repeated dose toxicity studies with the reproduction/developmental toxicity screening tests for long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国, エジンバラ)
 17. Hirose, A., Kosugi, Y., Suzuki, T., Fujii, S., Kato, H., Takahashi, M., Kawamura, T., Matsumoto, M., Ono, A. and Hirata-Koizumi, M. Chain length-dependent difference in the toxic potency of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) in rats: Determination of the serum pfca concentrations. DIOXIN2014 (2014.8, スペイン, マドリッド)
 18. Hirose, A., Kosugi, Y., Suzuki, T., Fujii, S., Ema, M., Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. Analysis of the serum perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) levels for repeated-dose toxicity studies conducted for long-chain PFCAs in rats, 第 54 回米国トキシコロジー学会(2015.3, San Diego, California, USA)
 19. Ono, A., Kobayashi K., Matsumoto, M., Ema, M., Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A. Initial risk assessment of β -bromostyrene, 第 54 回米国トキシコロジー学会(2015.3, San Diego, California, USA)
 20. Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamazoe, Y., Ono, A., Hirose, A. and Hayashi, M. Hazard evaluation support system (Hess) : Category approach to screen chemicals which are metabolized to methoxy- or ethoxyacetic acid responsible for testicular toxicity. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国, エジンバラ)
 21. 広瀬 明彦, 藤井 咲子, 鈴木 俊也, 加藤 日奈, 川村 智子, 松本 真理子, 高橋 美加,

- 平田 睦子, 西村 哲治, 江馬 眞, 小野 敦 :
パーフルオロアルキル (C14, C16) カルボ
ン酸の反復投与および生殖・発生毒性. 第 41
回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
22. 山田 隆志, 長谷川 隆一, 三浦 稔, 櫻谷 祐
企, 山添 康, 小野 敦, 広瀬 明彦, 林 真 :
有害性評価支援システム統合プラットフォ
ーム (HESS) - 精巢毒性に係わるアルコ
キシ酢酸を生成する化学物質のスクリーニ
ング - . 第 41 回日本毒性学会学術年会
(2014.7, 神戸)
23. A. Ono :Toxicogenomics as alternative of
traditional toxicological endpoints. Korean
Society for Alternatives to Animal
Experiments 11th Annual Meeting
(2014.11, Korea)
24. A. Ono, M. Takeyoshi, Y. Maeda, N.
Suzuki, H. Kojima, S. Takeuchi, J. Hong,
H. Lee, A. Vinggaard, J. Odum, S. Laws
and H. Kojima :Inter-laboratory validation
study of Androgen receptor stably
transfected transcriptional activation
(STTA) assay for new OECD test guideline.
The 9th World Congress on Alternatives
and Animal Use in the Life Sciences
(2014.8, プラハ、チェコ)
25. 小野 敦 :トキシコゲノミクスによる肝毒性
バイオマーカー. 第41回日本毒性学会学術
年会 (2014.7, 神戸)
26. Midori Yoshida, Kaoru Inoue, Miwa
Takahashi. Predictive MOAs of uterine
adenocarcinoma development induced by
pesticides. SOT2015 (San Diego, March
2015)

G . 知的所有権の取得状況

(該当なし)

平成 26 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

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（H24-化学-指定-010）

- 遺伝毒性の予測に関する研究 -

研究代表者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部・部長
研究分担者	山田 雅巳	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部・第一室長
研究分担者	森田 健	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部・第四室長
研究協力者	増村 健一	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部・第三室室長
研究協力者	北澤 愛莉	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第一室
研究協力者	小宮佐知子	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室
研究協力者	O. Mekenyan	ブルガス大学数学化学研究室・教授
研究協力者	P. Petkov	ブルガス大学数学化学研究室
研究協力者	S. Canipa	ラーサ研究所
研究協力者	A. Cayley	ラーサ研究所
研究協力者	L. Fisk	ラーサ研究所

研究要旨

本研究では、化学物質の遺伝毒性を従来の試験によらず、データベース検索や(Q)SAR の利用により、迅速、且つ正確に予測するシステムの構築と、その実用化を目指す。本研究は最終的に化学物質のヒト健康リスク評価の効率化や動物愛護に貢献する。

エームス試験に関しては、予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行った。今年度は安衛法エームス試験データ約 2 万物質を入手し、データベース化に着手した。2 万物質のうち、12,962 物質が、分子量 500 以下の化学物質データとして入力可能で有り、これまで、約 8 千化合物をデータベース化した。このデータを公開し QSAR ソフト精度向上のための国際共同研究を開始する。

これまで *in vitro* の試験データから QSAR モデルを開発してきたが、*in vitro* でのアラートを *in vivo* へ拡大し、*in vivo* 遺伝毒性予測モデルの構築にも着手した。その前提として、*in vivo* 試験データの精査と、データベースの構築を試みている。CGX DB による 756 の齧歯類発がん物質と 183 の非発がん物質について、*in vivo* MN と *in vivo* TG のデータを収集・解析した結果、*in vivo* MN では 379 物質の、*in vivo* TG では 78 物質の知見が得られ、*in vivo* MN の感受性は 41.0%で、特異性は 60.5%、*in vivo* TG の感受性は 72.9%であることが判明した。*In vivo* MN の感受性(41.0%)は *in vitro* 試験(Ames 58.8%、MLA 73.1%、

MN 78.7%、CA 65.6%)と比較して低いものであったが、一方、特異性(60.5%)はAmesに次いで高いものであった(Ames 73.9%、MLA 39.0%、MN 30.8%、CA 44.9%)。In vivo TGの感受性(72.9%)はAmes(58.8%)よりも高く、偽陽性が多いとされるin vitro 哺乳類細胞試験(65.6%~78.7%)と同程度であった。In vivo-in vitro比較においては、in vivo MNとin vitro CAの一致性を検証した。発がん物質に対する両試験の一致性は53.2%、非発がん物質に対しては37.3%で、発がん物質と非発がん物質を統合すると49.2%であった。また、発がん物質と非発がん物質を統合した場合のin vivo TGとAmesの一致性は78.4%で、高かった。今後、in vivo MNとin vitro CAにおける一致性の低さの要因(in vitro CAにおける反応の代謝活性化系の有無やin vivo MNの曝露経路の妥当性などを含む)あるいは化学物質群に対する特性等を解明することにより、より精度の高いQSARの開発につながるものと考えられる。

ブルガス大学との共同研究により変異原性カテゴリー予測のためのメカニズムベースのサマリーワークフローを導入した。これまでのワークフローに新たに機械論的な理解により情報化される試験法と評価のための統合アプローチ(IATA)を反映させた。変異原性分類を基準とした入手可能な変異原性データを用いて、精巧なIATAから一連の試験による発がん物質のカテゴリー化を行った。IATAを用いると、遺伝毒性によるがん原性陽性を、高感度(80~85%)で偽陽性の割合を低く抑え(15~20%)予測できることが認められた。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースのトランスジェニック突然変異(TG)試験予測モデルの開発を行った。本年度はNIHSからのデータの提供(TGRデータセット)により感度および正確度が大幅に向上した。本研究で陽性適中率が比較的高い(50%以上)アラートが4種確認された。これら4種のアラートを拡大適用した場合、感度の向上は最大で60%に達すると考えられた。さらに感度を高めるためには、NIHSのTGRデータセットに含まれる関連データを用いて、その他のin vitro変異原性アラートを拡大適用する必要がある。しかし、これらのアラートの対象とされている活性化化合物は3種未満であり、多くのアラート(32種中16種)が1種だけの活性化化合物を対象とするものである。したがって、NIHSのTGRデータセット以外に根拠となるデータが得られない限り、これらのアラートの多くは拡大適用に該当する可能性が低いと考えられる。従って、さらなる試験データベースの拡張が望まれる。

キーワード: エームス試験、染色体異常試験、小核試験、トランスジェニック突然変異(TG)試験、(Q)SAR、アラート、代謝

I. 微生物試験を用いた発がんリスクの定量的評価手法の構築
- 世界最大規模の Ames 試験データベース構築 - (研究分担：山田雅巳)

研究分担者 山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 第一室長
研究協力者 北澤 愛莉 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 第一室

I-1 . 研究目的

OECD を初めとしたEU 諸国および米国EPA においては、既存化学物質のリスク管理の目的で、安全性評価未実施の物質を対象にカテゴリーアプローチおよび(定量的)構造活性相関(Q)SAR) の利用が検討されている。特に、医薬品における変異原性不純物の評価には実際に(Q)SAR の利用を取り入れたICH M7ガイドラインが整備され2014年7月にweb公開されたことから、一般化学物質のヒト健康リスク評価・管理への適用にも拍車がかかると思われる。

本研究課題では、初年度より(Q)SARソフトによるAmes試験結果の予測精度向上を目的に、我が国で行われたGLP 試験データを収集し、遺伝毒性試験の大規模データベースを再構築してきた。本データベースは世界最大規模になると予想され、かつ、信頼性の高いデータベースである。したがって、そこから抽出される遺伝毒性アラートは、遺伝毒性の予測精度の向上および、QSAR モデルの開発に大いに貢献できると期待される。

I-2 . 研究方法

(1) Ames試験データベースの再構築：

労働安全衛生法 第五十七条の三 第一項では、新規化学物質を製造もしくは輸入し

ようとする事業者には、あらかじめその有害性の調査を義務付け、物質名称と共に調査結果の届け出を義務付けている。有害性の調査はAmes試験の実施による。現在までに、20,000を超える化学物質が届け出られており、その中で、強い変異原性を示すとされた物質(平成27年4月時点：新規化学物質831物質、既存化学物質169物質)は厚生労働省ホームページの関連サイト(<http://anzeninfo.mhlw.go.jp/user/anzen/kag/ankgc02.htm>)にその名称が公開されている。今年度は、厚生労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質対策課より昨年度入手した、現在までにAmes試験が実施された化学物質の情報(物質名称と試験結果(陽性、陰性等の判定))の、データベース作成ソフトJChemへの入力を終了した。

【精査手順】

労働安全衛生法による届け出のあった化学物質には、混合物・ポリマーなども含まれている。構造活性相関はあくまでも化学物質の構造に基づく予測を行うので、そのような、「構造式が特定できない物質」は、Ames試験結果はあっても対象にならない。また、構造情報を得るために有用なCAS番号の情報がない物質が約半数であったことから、CAS番号の有無による振り分けが必要になった。それに付随して、CAS番号が

正しいものであるかどうかの確認作業も発生した。さらに、Ames試験結果(判定)は基本的に3種類(陰性・陽性 強いものとそうでないもの)だが、中には判定が保留

になっているもの、データが2つあって判定が一致しないものも含まれていた。

以上を踏まえ、以下のフローチャート(図1)で入手したデータを精査した。

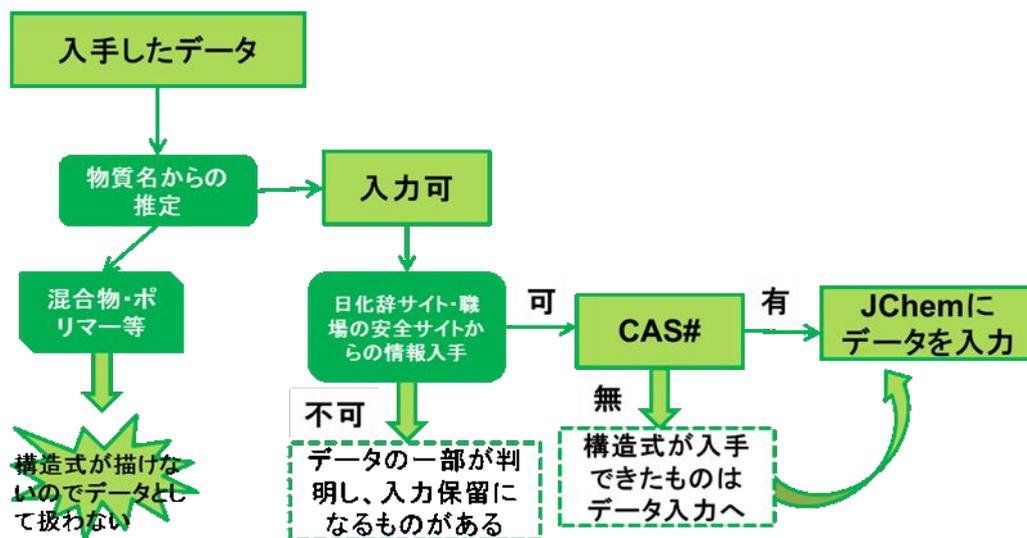


図1 20,761化合物のデータの振り分けフローチャート

I-3. 研究結果及び考察

(1) Ames試験データベースの再構築

図1のフローチャートに沿って振り分けたデータの数は以下のとおり。

- ・ 入手したデータ数：20,761
- ・ 構造式が描けないと判断したデータ数：7,257 (混合物・ポリマー等)
- ・ 入力済み：12,692 (CAS#有：7,972 / CAS#無：4,990)
- ・ 入力保留中のデータ数(CAS#に関わらず)：467
- ・ 重複しているデータ数(CAS#に関わらず)：75

入力データの中で、陽性判定物質(表1、内

訳AとB)の割合は約14%で、そのうち3分の1が強い陽性(表1、内訳A)とされるものであった。陰性判定物質(表1、内訳C)は86%である。

図2は、JChemに入力したデータベースの一部を示すものである。左端カラムのSerial_Idにより7,058の物質が特定できる。resultのカラムはAmes試験結果の判定(陽性、陰性の別、及び、陽性の程度)を示す。ANEI_No.は官報公示番号を示している。SMILES(Simplified molecular input line entry specification syntax)は、化学構造(Structure)をASCII符号の英数字で文字列化した表記方法であり、多くの種類の分子エディタでインポート可能であるため、付記している。SMILESを入力することで

QSARソフトに構造式が自動的に入力できる。Chemical_Nameは英語表記と日本語表記があるが、適用するソフトウェアは海外製が多いため、英語表記を使用した。

入力データの総数は約 2 万である。データを公開し QSAR ソフト精度向上のための国際共同研究を開始した。

I-4. 結 論

Ames データベースの再構築を終了した。

表1 有害性の調査が実施された物質

20,761	未入力物質(ポリマー、有機金属、縮合物等)	入力済み	内訳	入力保留	重複除外
総数	7,257	12,962	A: 652 B: 1161 C: 11149	467	75
CAS#有	1,811	7,972	A: 396 B: 721 C: 6855	263	63
CAS#無	5,446	4,990	A: 256 B: 440 C: 4294	204	12

Serial_id	result	ANEI_No	CAS#	SMILES	Structure	Chemical_Name
73		4-(7)-1305	68391-42-4	[O-][N+](=O)c2ccc(/N=N/c1ccc(N(CCC		2-((2-Cyanoethyl)(4-((E)-4-nitrophenyl)diazonyl)phenyl)amino)ethylacetate
75		8-(7)-691	34052-90-9	C1COC(=N1)C2=CC(=CC=C2)C3=NC		1,3-Bis(4,5-dihydro-2-oxazolyl)benzene
76		2-(6)-1075	4220-30-8	N#CCCN(CCC#N)CC(O)CO		(2,3-dihydroxypropyl)bis(2-cyanethyl)amine
77		7-(4)-691	90327-04-1	CC(CC(C1=CC(C)=CC(C)=C1O)C1=C		1-(2-Hydroxy-3,5-dimethylphenyl)-1-(2-benzoyloxy-3,5-dimethylphenyl)-3,5,5-trimethylhexane

図2 JChemソフトで作成したAmes試験データベースの一部

表2 データベース再構築に用いたデータのソース別総数一覧 (2015年4月17日現在)

データ名称	データ出典	データ入手総数	重複を除いた数*
Ames_DB903	<ul style="list-style-type: none"> 労働安全衛生法に基づき実施された変異原性試験結果 医薬品関連情報 既存化学物質毒性データベース 微生物を用いる変異原性試験データ集 	903	903
labor	労働安全衛生法に基づき実施された変異原性試験結果	20,761	12,962**
Kasinhou	化審法 審査シート	379	379
food	食品安全委員会 評価書	104	104
JECFA	Food and Chemical Toxicology, 50, 1538-1546 (2012) 掲載分	367	283
Hansen	J. Chem. Inf. Model., 49, 2077-2081 (2009) 掲載分	6512	5978
合計		29,015	20,609

*AmesDB903、Kasinhou、foodの間で重複は無く、重複があった物質のデータは国内>JECFA>Hansenの順で計数しているため、JECFAとHansenの数が入手総数から減っている

**未入力を除いた数

II. *In vivo* 遺伝毒性試験の発がん物質検出性との関連 (研究分担：森田健)

研究分担者 森田 健 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室室長
研究協力者 増村 健一 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第三室室長
研究協力者 小宮佐知子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室

II-1. 研究目的

(定量的)構造活性相関(QSAR)による染色体異常誘発性の予測においては、これまで、哺乳類培養細胞を用いる*in vitro*染色体異常試験(CA)の試験最高濃度の低減化の影響を検討し、一般化学物質に対する影響は、その分子量の大きさから極めて小さいことを示してきた。一方、染色体異常誘発性については、*in vitro*試験では陽性を示すものの*in vivo*試験では陽性が示されないケースも多く知られている。そのため、より精度の高い染色体異常予測率を示すQSARモデルの構築には、*in vivo*試験の発がん物質検出性を評価し、*in vitro*と*in vivo*のギャップの要因を検証することが必要と考えられる。ここでは、*in vivo*染色体異常誘発性として赤血球小核試験(骨髄あるいは末梢血)を選択し、*in vivo*小核試験(MN)の齧歯類発がん物質に対する感受性ならびに非発がん物質に対する特異性を検証した。加えて、トランスジェニック齧歯類による*in vivo*遺伝子突然変異試験(TG)についても同様の検証を行い、Ames試験を含めた遺伝毒性QSARモデルの予測率の向上に資することとした。

II-2. 研究方法

2.1. 使用データベース

カークランドらによる発がん性・遺伝毒性データベース(CGX DB、ver. 2、2007年4月、<http://www.lhasalimited.org/cgx.htm>)を用いた。CGX DBは、756の齧歯類発がん物質と183の非発がん物質について、4種の*in vitro*遺伝毒性試験情報(Ames, MLA, *in vitro* MN, *in vitro* CA)が収載されている。

2.2. *In vivo* 遺伝毒性データの検索

In vivo MNに関するレビュー論文あるいは大規模試験報告書、EUリスク評価書やOECD SIDS文書などの国際的的化学物質評価文書、US NTPのデータベースサーチ、ならびにPubMed文献サーチを用いた(表1)。また、*in vivo* TGについては、OECDのレビュー文書(Detailed review paper on transgenic rodent mutation assays, Series on testing and assessment, Number 103, OECD, Paris, July 23, 2009. ENV/JM/MONO(2009)7, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)7&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)7&doclanguage=en))および食品添加物の遺伝毒性試験報告書(厚生労働省、2008~2012年、非公表)を用いた。

2.3. データの評価

In vivo MNの結果はCGX DB (2005年版)における記載に基づき以下の3つに分類した。すなわち、+ : 陽性、- : 陰性、およびE (equivocal) : 反応が弱いものや、試験間あるいは試験施設間での再現性が認められないなどの、あいまいな結果。また、*in vivo* TGの結果は、以下の4つに分類した。すなわち、+ : 少なくとも1つの発がん標的部位で陽性、- : TGで評価したすべての発がん標的部位で陰性、na (+) : TGで陽性だが発がん標的部位ではない、na (-) : TG陰性だが発がん標的部位ではない。なお、*in vitro*試験結果については以下を追加した。すなわち、TC (technically compromised) : 試験の適切性において、本質的な基準的規範に適合していないことなどにより試験結果に疑問がある(技術的問題点あり、CGX DBの記載による)および + at >10 mM : 10 mM超の濃度での陽性 (*in vitro* CAのみで評価、最終判断は陰性評価(-))。なお、+ at >10 mM (10 mM超の濃度での陽性)の知見は、昨年度までの研究成果²⁾に基づいた。すなわち、CGX DB(2005年版)で*in vitro* CA陽性と評価された19物質(10発がん物質および9非発がん物質)は、10 mMを超えての陽性知見であったため、本解析では陰性と評価した。

II-3. 研究結果

3.1. 収集された*in vivo*遺伝毒性試験データ

CGX DB収載の939物質(発がん物質756、非発がん物質183)について認められた*in vivo*遺伝毒性試験データは、*in vivo* MNにおいては379物質(発がん物質293、非発がん物質86)であり、うち、発がん物質およ

び非発がん物質について、それぞれ陽性が120および22物質、陰性が163および52物質、あいまいが10および12物質であった(表2)。また、*in vivo* TGにおいては78物質(発がん物質74、非発がん物質4)であり、非発がん物質のデータは極めて少なくそれらはすべて陰性であった。74の発がん物質について陽性(na(+))を含む)が54物質、陰性(na(-))を含む)が20物質であった(表3)。

In vivo MNにおける特記すべき個別物質の評価は以下のとおり：

発がん物質

- C179, Chlorpromazine hydrochloride
低体温による陽性知見とされている。
- C197, C.I. Sovent yellow 3 (o-aminoazotoluene)
マウスの陽性知見に基づいたが、ラットでは陰性であり、種差が認められた。
- C246, 1,2-dibromoethane
本物質は液体であるが、経口投与では陰性だが吸入曝露では陽性であり、妥当性評価が困難であることからE (equivocal、あいまい)とした。
- C285, 3,3'-dimethoxybenzidine 2HCl
遊離塩基(119-90-4)の陰性知見に基づいた。
- C378, Haloperidol
マウスでは低体温による陽性知見とされている。ラットでは陰性知見がある。
- C466, 4,4'-methylenedianiline 2HCl
本物質についての陽性知見に基づいたが、遊離塩基(101-77-9)については陰性とされている。
- C478, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyrridyl)-1-(butanone) (NNK)
陰性と陽性の知見がそれぞれ1つずつあり、

妥当性評価が困難であることからEとした。

- C509, Nitrite, sodium

陰性と陽性の知見がそれぞれ1つずつあり、妥当性評価が困難であることからEとした。なお、OECDのSIDSでは陽性と評価している。

- C631, Phenylhydrazine HCl

遊離塩基 (100-63-0) の陽性知見に基づいた。

- C691, 1,1,2,2-tetrachloroethane

長期投与によるマウス赤血球における陽性知見に基づいた。

- C711, o-Toluidine

ラットの陽性知見に基づいたが、マウスで陰性であり、種差が認められた。

非発がん物質

- NC8, dl-Amphetamine sulfate

遊離塩基 (300-62-9) の陽性知見に基づいた。

- NC52, 2,6-Diaminotoluene.2HCl

カークランドらの総説3)での評価に基づきEとしたが、遊離塩基 (823-40-5) を用いた最近の試験における陰性知見がある。

- NC73, EDTA, trisodium salt trihydrate

disodium salt (6381-92-6) の陰性知見に基づいた。

- NC91, Fluoride, sodium

総説3)での評価は単一の試験に基づき陽性 (+) だが、別の試験における陰性知見が認められたため、Eとした。

- NC138, Phenol

低体温による陽性知見とされている。

- NC151, Propyl gallate

総説3)での評価は単一の試験に基づき陽性

(+) だが、別途陽性知見1件、陰性知見2件が認められたため、Eとした。

また、*in vivo* TGにおいてna (+) (TGで陽性だが発がん標的部位ではない) とされた6物質ならびにna (-) (TG陰性だが発がん標的部位ではない) とされた4物質 (計10物質、いずれも発がん物質) の評価対象臓器は以下のとおり：

na (+) (TGで陽性だが発がん標的部位ではない)

- C16, Acrylamide

骨髄で陽性だが、肝臓および精巣生殖細胞で陰性

- C244, 1,2-dibromo-3-chloropropane
- 精巣で陽性だが、肝臓で陰性

- C340, Ethyl methanesulphonate

骨髄精巣上体精子および肝臓で陽性だが、脳および小腸で陰性

- C457, 3-methylcholanthrene

肝臓で陽性

- C492, Mitomycin C

骨髄および肝臓で陽性だが、小腸および精巣で陰性

- C702, Thio-tepa

脾臓リンパ細胞で陽性

na (-) (TG陰性だが発がん標的部位ではない)

- C17, Acrylonitrile

骨髄、脳、肺および脾臓リンパ細胞で陰性

- C257, 1,2-dichloroethane

肝臓および精巣で陰性

- C489, Metronidazole

胃で陰性

- C683, SX Purple

肝臓および胃で陰性

3.2. 感受性・特異性解析

In vivo MNの発がん性に対する感受性、特異性および一致性を表4に示す。E (Equivocal)を陽性にも陰性にも計数しなかった場合、感受性は41.0% (120/293)、特異性は60.5% (52/86)であり、一致性は45.4% (172/379)で良好といえるものではなかった。一方、*in vivo* TGの発がん性に対する感受性は、na(+)を陽性、na(-)を陰性に加えた場合、72.9% (54/74)と比較的高いものであった(表4)。なお、*in vivo* TGにおいては、非発がん物質に対するデータが合計4件と極めて少なかったため、特異性ならびに一致性については計算しなかった。

また、Amesと*in vivo* MNを組合せた場合の感受性および特異性をそれぞれ表5および表6に示した。発がん物質についてAmesと*in vivo* MNの両試験を実施して、少なくとも1つの試験で陽性となる感受性は68.7%で、カークランドらが2005年に報告1)したAmesと他の*in vitro*試験 (MLA, MN, CA)との組合せによる感受性の75.3%~81.0%に比べると低かった。一方、非発がん物質についてAmesと*in vivo* MNの両試験を実施して、両方の試験で陰性となる特異性は45.3%で、Amesと他の*in vitro*試験 (MLA, MN, CA)との組合せによる特異性の12.0%~34.6%に比べると高かった。

3.3. *In vitro* - *in vivo* 間の比較

CGX DBでは*in vitro* MNのデータが収載されているが、発がん物質に対する試験データ数は89件であり、*in vitro* CAの352件に比べ圧倒的に少ない。そこで、*in vivo*

MNに対する染色体異常を指標とする*in vitro*試験との比較においては*in vitro* CAを選択した。*In vivo* MNと*in vitro* CAの一致性を発がん物質については表7に、非発がん物質については表8に、両物質を合計した場合については表9に示した。*In vivo* MNと*in vitro* CAの一致性、すなわち両試験結果共に陽性あるいは陰性を示したのは、発がん物質では53.2% (118/222)、非発がん物質では37.3% (28/75)であり、発がん物質に対する一致性の方が高かった。両物質を合計した場合の一致性は49.2% (146/287)であった。また、CGX DBでは遺伝子突然変異を指標とする*in vitro*試験として、哺乳類細胞を用いたMLAのデータが収載されているが、MLAは染色体異常誘発性をも検出可能な試験系であることから、細菌を用いた系ではあるが、Ames試験を*in vivo* TGの対照*in vitro*試験として選択した。*In vivo* TGとAmesの一致性を発がん物質および非発がん物質を合計して表10に示した。評価対象物質数は*in vivo* MNと比べ少ないものの、高い一致性(78.4%、58/74)を示した。

II-3. 考 察

CGX DBによる756の齧歯類発がん物質と183の非発がん物質について、*in vivo* MNと*in vivo* TGのデータを収集・解析した結果、*in vivo* MNでは379物質の、*in vivo* TGでは78物質の知見が得られ、*in vivo* MNの感受性は41.0%で、特異性は60.5%、*in vivo* TGの感受性は72.9%であることが判明した。なお、非発がん物質に対する*in vivo* TGのデータは極めて少なかったため、*in vivo* TGの特異性評価は行わなかった。また、

Amesと*in vivo* MNを組合せた場合の感受性は68.7%で、特異性は45.3%であった。*In vivo* MNの感受性(41.0%)は*in vitro*試験(Ames 58.8%、MLA 73.1%、MN 78.7%、CA 65.6%)と比較して低いものであったが、一方、特異性(60.5%)はAmesに次いで高いものであった(Ames 73.9%、MLA 39.0%、MN 30.8%、CA 44.9%)。ICHにおける医薬品の遺伝毒性試験の組合せにおけるオプション2(Amesおよび2種の*in vivo*試験、1種は通常*in vivo* MN)において検討される可能性のあるAmesと*in vivo* MNの組合せによる感受性(68.7%)は*in vitro*試験同士の組合せ(Ames+MLA 81.0%、Ames+MN 85.9%、Ames+CA 75.3%、MLA+MN 87.0%、MLA+CA 81.3%)と比較すると低かったが、特異性(45.3%)は高かった(Ames+MLA 32.4%、Ames+MN 12.0%、Ames+CA 34.6%、MLA+MN 10.0%、MLA+CA 27.1%)。このことは、2つ目の*in vivo*試験を適切に選択すれば、発がん物質あるいは*in vivo* 遺伝毒性物質を偽陽性なく的確に検出できることを示しており、オプション2の妥当性が傍証された。*In vivo* TGの感受性(72.9%)はAmes(58.8%)よりも高く、偽陽性が多いとされる*in vitro*哺乳類細胞試験(65.6%~78.7%)と同程度であった。*In vivo* - *in vitro*比較においては、*in vivo* MNと*in vitro* CAの一致性を検証した。発がん物質に対する両試験の一致性は53.2%、非発がん物質に対しては37.3%で、発がん物質と非発がん物質を統合すると49.2%であった。また、発がん物質と非発がん物質を統合した場合の*in vivo* TGとAmesの一致性は78.4%で、高かった。今後、*in vivo* MNと*in vitro* CAにおける一致性の低さの

要因(*in vitro* CAにおける反応の代謝活性化系の有無や*in vivo* MNの曝露経路の妥当性などを含む)あるいは化学物質群に対する特性等を解明することにより、より精度の高いQSARの開発につながるものと考えられる。

参考文献

- 1) D. Kirkland, M. Aardema, L. Henderson, L. Müller, Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutat. Res.* 584 (2005) 1-256.
- 2) T. Morita, A. Miyajima, A. Hatano, M. Honma, Effects of the proposed top concentration limit on an *in vitro* chromosomal aberration test to assay sensitivity or to reduce the number of false positives, *Mutation Research* 769 (2014) 34-49.
- 3) Kirkland D, Reeve L, Gatehouse D, Vanparys P. A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins. *Mutat Res*, 721 (2011), 27-73.

表1 *In vivo* 小核試験データの収集に用いた主な資料

<p>レビュー論文</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Mavournin et al (1990) The <i>in vivo</i> micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. <i>Mutat Res.</i> 239, 29-80. ➤ Kirkland et al (2008) Recommended lists of <i>genotoxic</i> and <i>non-genotoxic</i> chemicals for assessment of the performance of new or improved <i>genotoxicity</i> tests: a follow-up to an ECVAM workshop. <i>Mutat Res.</i> 653, 99-108. ➤ Kirkland et al (2008) Evaluation of the ability of a battery of three <i>in vitro</i> <i>genotoxicity</i> tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing <i>in vivo</i>. <i>Mutat Res.</i> 654, 114-132. ➤ Kirkland et al (2011) A core <i>in vitro</i> <i>genotoxicity</i> battery comprising the Ames test plus the <i>in vitro</i> micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and <i>in vivo</i> <i>genotoxins</i>. <i>Mutat Res.</i> 721, 27-73. <p>大規模試験報告書</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Shelby et al (1993) Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. <i>Environ Mol Mutagen</i>, 21, 160-179. ➤ Morita et al (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B). The summary report of the sixth collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. <i>Mutat Res.</i> 389, 3-122. ➤ Wakata et al (1998) Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. <i>Environ Mol Mutagen.</i> 32, 84-100. ➤ Witt et al (2000) <i>Micronucleated Erythrocyte Frequency in Peripheral Blood of B6C3F1 Mice from Short-Term, Prechronic, and Chronic Studies of the NTP Carcinogenesis Bioassay Program.</i> <i>Environ. Mol. Mutagen.</i> 36, 163-194. ➤ Hamada et al (2001) Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: Summary of the 13th collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). <i>Environ Mol Mutagen</i> 37, 93-110. <p>国際的化学物質評価文書</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ EU RAR: EU RAR Search, http://esis.jrc.ec.europa.eu/index.php?PGM=ora ➤ SIDS: SIDS Search, http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/sidspub.html OR ↓ OECD Existing Chemicals Database Search, http://webnet.oecd.org/hpv/UI/Search.aspx ➤ EHC, CICAD, IARC: IPCS INCHEM Search, http://www.inchem.org/ <p>NTP データサーチ</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ NTP Database Search Home Page, http://tools.niehs.nih.gov/ntp_tox/ <p>PubMed 文献サーチ</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ (検索語 : CAS 番号あるいは化学物質名、<i>micronucle*</i>, rodent)

表 2 CGX DB 収載物質における *in vivo* MN データの要約 (n=379)

化学物質	物質数				
	陽性 (+)	陰性 (-)	あいまい (E)	データなし	計
発がん物質	120	163	10	463	756
非発がん物質	22	52	12	97	183
計	142	215	22	559	939

表 3 CGX DB 収載物質における *in vivo* TG データの要約 (n=78)

化学物質	物質数					
	陽性 (+)	陽性 (na(+))	陰性 (-)	陰性 (na(-))	データなし	計
発がん物質	48	6	16	4	682	756
非発がん物質	0	0	4	0	179	183
計	48	6	20	4	861	939
計	54		24		861	939

表 4 各 *in vivo* 遺伝毒性試験の感受性、特異性の要約 a

発がん性	in vivo MN				in vivo TG		
	+	E	-	計	+ ^b	- ^c	計
+	120	10	163	293	54(6)	20(4)	74
-	22	12	52	86	0	4	4
感受性	41.0% (120/293)				72.9% (54/74)		
特異性	60.5% (52/86)				計算せず		
一致性	45.4% (172/379)				計算せず		

a: E (Equivocal、あいまい)は、総数には含むが、陽性、陰性いずれにも計数していない

b: na(+)を含む(n=6)

c: na(-)を含む(n=4)

表5 Ames と *in vivo* MN の組合せによる齧歯類発がん物質の検出性（感受性）

Ames	<i>in vivo</i> MN			計
	+	E	-	
+	79	5	74	158
E	2	0	2	4
-	33	4	82	119
計	114	9	158	281

Ames + *in vivo* MN

両試験で試験した発がん物質数(A)： 281

両試験での陽性物質数(B)： 79(28.1%)

両試験の1つのみでの陽性物質数(C)： 114(40.6%)

感受性(両試験を実施して少なくとも1つの試験で陽性) ($[B+C]/A$)： 68.7%

表6 Ames と *in vivo* MN の組合せによる非齧歯類発がん物質の検出性（特異性）

Ames	<i>in vivo</i> MN			計
	+	E	-	
+	6	2	11	19
E	1	1	2	4
-	15	9	39	63
計	22	12	52	86

Ames + *in vivo* MN

両試験で試験した非発がん物質数(A)： 86

両試験での陰性物質数(B)： 39

特異性(B/A)： 45.3%

両方の試験であいまい(E)、あるいは1つの試験であいまいでかつもう1つの試験で陰性の非発がん物質数(C)： 12

Eを陰性とした場合の特異性上限 ($[B+C]/A$)： 59.3%

表 7 発がん物質に対する *in vivo* MN と *in vitro* CA の一致性 ^a

in vitro CA	in vivo MN			計
	+	E	-	
+	70	5	70	145
E	1	0	7	8
-	19	2	48	69
計	90	7	125	222
一致性	53.2% (118/222)			

a: E (Equivocal、あいまい)は、総数には含むが陽性、陰性いずれにも計数していない

表 8 非発がん物質に対する *in vivo* MN と *in vitro* CA の一致性 ^a

in vitro CA	in vivo MN			計
	+	E	-	
+	8	6	20	35
E	2	0	6	8
-	10	3	20	32
計	20	9	46	75
一致性	37.3% (28/75)			

a: E (Equivocal、あいまい)は、総数には含むが陽性、陰性いずれにも計数していない

表9 発がん物質および非発がん物質に対する *in vivo* MN と *in vitro* CA の一致性 ^a

in vitro CA	in vivo MN			計
	+	E	-	
+	78	12	90	180
E	3	0	13	16
-	29	4	68	101
計	110	16	171	297
一致性	49.2% (146/297)			

a: E(Equivocal、あいまい)は、総数には含むが陽性、陰性いずれにも計数していない

表10 発がん物質および非発がん物質に対する Ames 試験と *in vivo* TG の一致性 ^a

Ames	in vivo TG		計
	+ ^b	- ^c	
+	46 (5)	10 (3)	56
E	1 (1)	0	1
-	5	12	17
計	52	22	74
一致性	78.4% (58/74)		

a: E(Equivocal、あいまい)は、総数には含むが陽性、陰性いずれにも計数していない

b: na(+)を含む(n=6)

c: na(-)を含む(n=3)

III. 遺伝毒性エンドポイント予測のための段階的アプローチ：化学物質の変異原性を予測するためのパスウェイベースのワークフロー（研究分担：本間正充）

研究協力者	O. Mekenyan	ブルガス大学数学化学研究室・教授
研究協力者	P. Petkov	ブルガス大学数学化学研究室

III-1. 研究目的

がん原性は毒性学的エンドポイントの 1 つであり、特に高い関心が持たれる。その一方、がん原性の評価に用いられるげっ歯類によるバイオアッセイを実施すると、時間、金額、動物数に関する損失が大きい。そのため、がん原性では、遺伝毒性によるがん原性について予測可能な（本質的に *in vitro* と *in vivo* の両者における）短期試験（STT）の開発を目的とする多くの取り組みが行われてきた。利用可能な遺伝毒性試験により、ヒトのがん、または DNA 損傷に基づく遺伝毒性作用を導く物質については、がん原性の評価が容易になる。このような遺伝毒性試験データは、規制および化学物質管理の目的から、物質の危険有害性の特定とリスク判定の双方に用いられる。

遺伝毒性に関する危険有害性の特定は主に *in vitro* 試験に依拠し、既存の文献や SAR/QSAR の事前スクリーニングを最初に検討後、細菌および哺乳類細胞における物質の変異原性を判定する。物質の遺伝毒性の指標は、DNA 損傷、DNA 鎖切断または DNA 付加体の形成などインディケータ試験結果の評価により得られることもあ

る。*In vivo* 試験は遺伝毒性のさらなる評価に用いられ、通常は *in vitro* における観察結果の確認のため実施される。

変異原性の作用機序が複雑であることを考慮すると、化学物質の遺伝毒性判定において頑健性を得るには、多数の各種試験を必要とする。そのため、化学物質の変異原分類、またはがん原性の評価へのさらなる取り組みの両観点から、変異原性の評価に関する戦略を検討する取り組みが多数行われてきた。実際の遺伝毒性試験は、通常 3 段階の試験体系の一部として用いられてきた。すなわち、段階 I の微生物を用いた *in vitro* 試験法に続き、段階 II の体細胞を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験法では、先行する *in vitro* 試験陽性の化学物質を対象に、*in vivo* での生物学的関連性が判定される。段階 III の *in vivo* 試験法は、生殖細胞を用いる試験および *in vivo* 世代間試験からなると考えられる。最もよくみられる遺伝毒性バッテリー試験法には、遺伝子突然変異（すなわち、単一遺伝子または一群の遺伝子に影響を及ぼす点突然変異）、染色体異常誘発性（すなわち、染色体構造異常）、異数性（すなわち、染色体の数的異常）の測定試験が挙げられる。実際に、米国環境保護庁（US

EPA) のバッテリー試験は 3 段階の体系であり、段階 I の遺伝子突然変異に関する細菌復帰突然変異試験(例えば、Ames 試験)、段階 II の哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験(例えば、マウスリンフォーマ試験)が挙げられ、また段階 III は哺乳類の骨髄を用いる *in vivo* 染色体異常試験か、赤血球を用いる *in vivo* 小核試験のいずれかからなる。また、日本の国立医薬品食品衛生研究所(NIHS)は、同様の試験実施戦略を用いている。*In vitro* 遺伝毒性試験に関する結果が陽性であり、化学物質に対する内因性の遺伝毒性活性が立証されても、この結果は極端な条件下であることが多いため、*in vivo* 遺伝毒性と関連性がない場合がある。

結果として、*in vitro* 試験(特に染色体異常試験)により「不適切な陽性」という結果が高頻度で検出されても、*in vivo* 試験による追跡では確認されないように思われる。予測能向上の取り組みの中で、戦略的な試験法が統合的試験戦略(integrated test strategy; ITS)の形で確立された。ITSの目的は、すべての科学関連情報の使用を最大化し、可能であれば動物による試験法の使用を回避することであり、REACH 技術ガイダンス(REACH Technical Guidance、欧州化学物質庁(ECHA)、2013 年)記載の ITS はその好例である。

さらに最近、分子起始反応(MIE)、介在する重要事象(KE)、規制上懸念される有害転帰(AO)の 3 者間の因果関係に関する情報を提供する有害性転帰経路(Adverse outcome pathway; AOP)の枠組みが開発され、これは規制に関する意思決定に用いる(ITS を包含する)試験法と評価のため

の統合アプローチ(integrated approaches to testing and assessment; IATA)開発促進の生物学的な背景となっている。IATA は、危険有害性の特定、危険有害性の特徴付け、および/または単一化学物質または一群の化学物質の安全性評価のため、各種データの統合および重み付けを行う体系化された手法である。

これまで我々は、各種短期遺伝毒性試験を共に関連付ける手段として *in vitro*、*in vivo* における外挿のワークフローを導入した。本ワークフローは、新たな TIMES モデルの開発促進、および戦略的試験法志向の方法として、生物学的組織に対する試験の順番を基準とする。また、肝臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験、骨髄を用いる *in vivo* 小核試験の 2 つの(Q)SAR モデルが開発された。その実行では、*in vitro* および *in vivo* 試験系間の代謝の差異を明らかにするなど、複数の難問が顕著になった。ワークフローは 3 ステップ構造からなり、ステップ 1 では *in vitro* 変異原性試験の結果に基づき、化学物質を陽性または陰性のカテゴリーに細分した。ステップ 2 では肝臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験の結果に基づき同様のカテゴリー化が行われ、ステップ 3 は骨髄を用いる *in vivo* 小核形成結果が基準とされた(Mekenyan ら、2012 年)。最終的な結果は 5 段階レベルの枠組みに分類され、3 ステップの生物学的組織の結果が 3 つ同時に陰性であればレベル 1、結果が 3 つ同時に陽性であればレベル 5 とした。

AOP の開発および AOP の情報に基づく IATA に関する最近の取り組みを踏まえ、本研究では各試験系の機械論的な基準(試験の能力)を因子にすることにより、*in vitro*、

*in vivo*における外挿のワークフローの精緻化を開始した。その目的は機械論的な情報に基づく IATA の作成とし、IATA の要素は試験の能力に基づいてグループ化された各種 STT とした。次に、IATA の結果を適用し、化学品の分類および表示に関する世界調和システム (GHS) の変異原性カテゴリーに従って、一連の試験による genotoxic carcinogens の分類について予測した。

III-2. 研究方法および材料

本研究の最初の部分では、これまで発表の一環として収集された 162 種類の化学物質のデータセット (Mekenyan ら、2012 年) に依拠した。これらの物質について入手可能なデータは、それぞれの試験の能力に従ってカテゴリー化した。組織に対する精緻化されたレベル全体の試験結果について、試験の能力を踏まえて再検討した。

データセットの対象とする試験系は、以下の試験タイプ由来とした。

- ・ 復帰突然変異検出のため、アミノ酸要求性の複数の細菌株を用いる細菌復帰突然変異試験 (Ames 試験) (OECD TG 471)
- ・ 染色体の構造異常および数的異常を検出する哺乳類の染色体異常試験 (OECD TG 473)
- ・ 遺伝子突然変異および染色体構造異常を検出するマウスリンフォーマ試験 (OECD TG 476)
- ・ 肝細胞を用いる不定期 DNA 合成 (UDS) (OECD TG 486)
- ・ アルカリ単細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ) (現時点で OECD TG なし; 国際的な同意が得られたプロトコールが入手可能 (Olive and Banath (2006 年) 参

照))

- ・ トランスジェニックげっ歯類突然変異試験 (OECD TG 488)
- ・ マウス肝細胞を用いる *in vivo* 小核試験 (現時点で OECD TG なし; 国際的な同意が得られたプロトコールが入手可能 (Cllet ら、1989 年参照))
- ・ 骨髄小核試験 (OECD TG 474)

IATA の結果を、世界調和システム (GHS) の変異原性カテゴリー (GHS、2013 年) に従って実際に遺伝毒性化学物質の分類に適用するため、一連の試験による 214 種類の化学物質を OECD QSAR Toolbox v3.2 の ISSCAN v4a データベースから収集した。本データベースは、OECD QSAR Toolbox v3.2 で入手可能なデータベースから重複する遺伝毒性/がん原性データを抽出したことにより補完された。ISSCAN データベースはイタリア高等保健研究所 (Istituto Superiore di Sanita) のウェブサイトからも自由に入手可能である。

ISSCAN データベースには、がん原性に関する情報およびがん原性に関する判定の要約が含まれており、がん原性データベース (Carcinogenic Potency DataBase : <http://potency.berkeley.edu/cpdb.html>) から得られる。がん原性は、ラットおよびマウスを用いて測定される TD50 値に基づいて評価される。TD50 は、投与量がゼロであったら腫瘍を発生しなかったと考えられる供試動物を対象に、その半数に腫瘍を誘導する一生を通じた 1 日あたりの投与量の割合で、mg/kg 体重/日を単位とする。報告される TD50 値は、ラットおよびマウスの各実験結果が陽性の場合から得られた最も強力な TD50 値の調和平均である。本研

究では、化学物質に関するがん原性の結果の要約に不一致という結果（すなわち、陰性と陽性の両結果が混在）があれば、陽性、すなわち最悪のシナリオとした。

GHS では、生殖細胞の変異原性に基づいた化学物質の分類が必要とされる。GHS は 2013 年に最新版に更新され、http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html から入手可能である。GHS の下で生殖細胞の変異原性は、証拠の重み付けに基づき 2 つのカテゴリーの 1 つに分類される（GHS、2013 年）。変異原性カテゴリー予測のため、GHS ガイダンスを用いて試験系の組み合わせを導いた。

III-3. 結果および考察

3.1. 試験の能力に従った *in vitro*、*in vivo* におけるワークフローの精緻化

データセットに反映された各試験について、その予測される試験の能力に従ってサブカテゴリー化した。カテゴリー化の結果を図 1 に示す。

細菌を用いて *in vitro* 変異原性を検討するレベル 1A は、ラット肝 S9 の外因性活性による Ames 試験に代表される。本試験で明らかにされるのは、短鎖長（例えば、2～3 核酸塩基）の DNA 損傷のみである。レベル 1B は、哺乳類を用いる染色体異常で評価される *in vitro* 変異原性（*ivt* CA）試験により特徴付けられ、DNA および/またはタンパク質の損傷を明らかにし、マウスリンフォーマ試験（MLA）では、染色体の構造異常、異数性、ヘテロ接合性を喪失する組換え現象（例えば、遺伝子変換）が検出される。レベル 1 の試験は、試験の能力が異なるが相補的であることを示す。レ

ベル 2 は A、B、C の 3 つのグループに細分される。グループ A は、コメットアッセイおよび不定期 DNA 合成（UDS）試験で評価される、肝臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性について検討する。コメットアッセイでは、長鎖長（例えば、20～30 核酸塩基）の DNA 損傷が明らかにされる。肝臓を用いる不定期 DNA 合成（UDS）試験は、DNA 修復機能について評価する。両試験とも Ames 試験と類似しているが、DNA 損傷範囲により一部に不一致が予測される。グループ B は、*in vivo* トランスジェニックげっ歯類突然変異（TRM）試験に代表され、本試験では点突然変異を検出する。TRM 試験は Ames 試験と同タイプの範囲の損傷（すなわち短鎖長の DNA 損傷）を明らかにすることから、Ames 試験に匹敵する能力がある。グループ C の哺乳類を用いる染色体異常試験（CA）で評価される *in vivo* 変異原性では、染色体異常誘発性の事象（例えば、染色体構造異常、異数性）が特定される。哺乳類を用いる *in vivo* 染色体異常（CA）は、レベル 1B に示す *ivt* CA 試験の範囲と類似している。レベル 3 のカテゴリーは *in vivo* 変異原性の 1 つのみで、試験も骨髓小核試験（MNT）の 1 つのみである。本試験は、変異原性化学物質に対する主要な代謝活性部位である、肝臓から離れた領域の染色体異常誘発活性を検出する。レベル 2A のコメットアッセイ、レベル 2B の肝臓を用いる *in vivo* TRM 試験、レベル 2C の *in vivo* CA は、*in vivo* MNT を補完する。

これまでのワークフロー（Mekenyan ら、2012 年）では、起源に関係なく *in vitro* 変異原性試験の結果に基づき、陽性が陰性かですまず化学物質を細分した。次の分類は肝

臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性作用に基づき、続いて *in vivo* MNT の結果とした。レベル全体の結果に不一致が生じた物質については、例えば *in vivo* のみの作用として、いわゆる基質チャネリングや化学物質の代謝的解毒の発生、骨髄など肝臓から離れた組織への接近の間にタンパク質（または他の生体分子）との相互作用能を獲得など、諸因子を考慮することにより可能な限り正当化された。こうした正当化は事例ごとの基準では可能であったが、レベルとは無関係に、少なくとも 1 つ陽性の変異原性データを不採用にすることが 1 つの欠点であった。これまでの試験系およびサブカテゴリー化の方法について、[図 2](#) に示す。

例えば、レベル 1 の場合、最終的な変異原性が陽性であると、Ames-S9、CA、または MLA 由来データが陽性であることに基づく割り当てであると考えられる。これと同じ方法が、レベル 2 および 3 における *in vivo* 変異原性の割り当てに用いられると考えられる。故に、レベル 1 の最終的な変異原性の判定が、Ames 試験データ陰性かつ CA データ陽性の結果に基づき陽性に割り当てられた場合、この化学物質はレベル 2 でなお陰性になることが考えられる。何故なら、レベル 2 で選択される試験には、CA 試験に匹敵する試験の能力がなかったからである。そのため、この化学物質の場合、*in vitro* 試験では陽性、肝臓を用いる *in vivo* 試験では陰性であると判断され、実際には可能性がきわめて低い肝解毒作用関与の仮説が立てられると考えられる。今回の *in vitro*、*in vivo* における外挿のワークフローは、こうした欠点への対処のため精緻化された。

3.2. ワークフロー全体からみた Ames 試験における化学物質の位置付け

実際に改訂ワークフローの有用性を検討するため、162 種類の化学物質のデータセットについて、試験のタイプによる特性別にカテゴリー化した。レベル 1A（すなわち Ames 試験）陽性の化学物質のワークフロー全体について、結果を[図 3](#) に示す。

9 種類の化学物質は比較できなかったが、*in vitro* Ames 試験陽性の化学物質の多くは *in vitro* CA 試験において陽性であることが認められた（70/78）。*in vitro* CA 試験で陰性または評価されなかった化学物質は、肝臓を用いる *in vivo* コメットアッセイおよび / または UDS 試験で多くに陽性が認められた（14/17）。このことから、これらレベル 2A の試験とレベル 1A の Ames 試験との間に一致した試験の能力があるとの予測が裏付けられる。*in vitro* Ames 試験および CA 陽性の化学物質と、*in vivo* コメットアッセイまたは UDS の結果との比較には、2 種類のシナリオが提唱される。レベル 1A およびレベル 1B で陽性の化学物質 37 種類は、レベル 2A の試験でも陽性である。これらの化学物質について、肝臓を用いる反応が陽性であることを確認するデータは、レベル 2B にもレベル 2C にもない。その一方、このうち多くの化学物質が *in vivo* MNT（すなわちレベル 3）では陰性になる。

レベル 2A でデータがない 17 種類の化学物質について、レベル 1 の結果が陽性であることは、レベル 2B の肝臓を用いる *in vivo* TRM 試験により確認される。すなわち、これらの化学物質が示す能力は、Ames 試験と同じである。Ames 試験陽性の 16 種類の化学物質は、レベル 2A では陰性である。

レベル 2A の結果が陰性であることを確認可能なデータはレベル 2B にも 2C にもないが、これらの化学物質は MNT(すなわちレベル 3) 陰性であることから肝解毒作用が示唆される。*In vivo* CA 試験では、*in vitro* CA 陽性の化学物質の最終結果を検討する入手可能なデータが不十分である。

生物学的組織レベル全体からみた、*in vitro* Ames 試験陰性の化学物質の結果も再検討した。そのワークフローを図 4 に示す。

レベル 1A で陰性の化学物質 74 種類のうち、レベル 1B でも陰性なのは 28 種類のみであった。この 28 種類の化合物のうち、レベル 2A では 6 種類が評価されなかったが、22 種類中 21 種類がレベル 2A およびレベル 3 で陰性であった。一方、レベル 1A で陰性の化学物質 74 種類のうち、レベル 1B では 41 種類が陽性である。こうした結果については、CA 試験陽性が DNA かタンパク質いずれかの損傷を示すのに対し、Ames 試験では DNA 損傷のみを評価することから予測可能である。レベル 1A で陰性かつレベル 1B で陽性の化学物質 41 種類の *in vivo* 試験における最終結果を解析すると、可能性として 2 つのシナリオが得られる。レベル 1B で陽性の化学物質のうち 21 種類はレベル 2A で陰性であり、レベル 1A と同じ結果が得られる。試験の能力を因子にする場合、これらの化学物質を、CA 陽性である一方コメットアッセイ陰性のデータにより示されるとおりに肝解毒作用に関与させるべきでないことは明らかである。

興味深いことに、レベル 1A で陰性の化学物質のうち、レベル 1B とレベル 2A のいずれも陽性の物質が 15 種類みられる。コメットアッセイと Ames 試験との間には、試

験の能力に類似性があるにも関わらず、2 つの試験系間の DNA 損傷範囲が異なるのである。これらの化学物質について、レベル 2B で最終結果を解析する入手可能なデータはないが、レベル 3 の陽性データによれば、これらの化学物質は *in vivo* 試験すべてで陽性を維持している。

したがって、変異原性陰性(または解毒作用)を明らかにする場合には、コメットアッセイは Ames 試験と類似の能力を有するが、変異原性陽性を明らかにする場合には、コメットアッセイおよび UDS 試験は CA 試験との類似性がより高くなる。

試験の能力を因子とすることで、各種試験の結果を解釈する機能が強化され、その後の戦略的試験法の志向をより有効なものにできることは明らかである。

化学物質の変異原性カテゴリーへの分類
今回の改訂ワークフローから得られる見識を実際に適用する観点から研究を行い、GHS の下で変異原性の分類および表示のカテゴリーを予測する際のワークフローの有用性について判定した。

GHS の下では、変異原性について 2 種類のカテゴリー(カテゴリー 1A、カテゴリー 1B、カテゴリー 2)が定義されている。ヒト疫学研究に基づき遺伝性の突然変異を誘発することが知られている化学物質は、カテゴリー 1A と定義され、一方、哺乳類の研究に基づき遺伝性の突然変異を誘発するとみなされる化学物質は、カテゴリー 1B と定義される。ヒト集団の突然変異の発生率、またはその頻度上昇の可能性に関する諸研究から信頼性の高い情報を得るのはきわめて困難であることから、今回の研究では、遺伝性の突然変異を誘発することが知られ

ているか、誘発するとみなされる化学物質は単一のカテゴリー（カテゴリー1）に統合した。したがって、カテゴリー1の物質とするには、

ヒトまたは哺乳類の生殖細胞の突然変異について陽性の証拠（優性致死試験など）が必要とされる。

カテゴリー2では、哺乳類の *in vivo* 体細胞変異原性試験または体細胞遺伝毒性試験で得られた陽性の証拠、また一部の例では *in vitro* 試験の裏付けを示す試験法から陽性の結果が必要とされる。換言すると、カテゴリー2は変異原性および遺伝毒性データの組み合わせに基づき、体細胞から生殖細胞まで、および哺乳類からヒトまで外挿する。

本研究では、既存の GHS 分類を補完するため、追加カテゴリーであるカテゴリー3を仮定した。こうした仮定は、GHS 分類を正式に拡大するためではなく、遺伝毒性対変異原性の評価試験間の識別に寄与することを目的としたものである。よって、*in vivo* 体細胞変異原性試験陽性データが得られ、*in vitro* 変異原性試験の裏付けがある化学物質は、カテゴリー2の変異原であると判断する。既に *in vitro* 変異原性陽性データによる裏付けがある場合、*in vivo* 変異原性陽性データではなく *in vivo* 遺伝毒性陽性データ（例えば、コメットアッセイまたは UDS）が用いられる状況を明らかにするには、新たに設けたカテゴリー3が提唱される。

生殖細胞の情報の必要性を明らかにするため、IATAの範囲を拡大し優性致死試験を特徴付ける要素を得た。その IATA のワークフローについて図5に概要を示す。

優性致死試験陽性の化学物質はカテゴリー1の変異原に分類され、生殖細胞の突然変異を裏付ける追加的な変異原性陽性データは必要とされない。これは、GHS分類によれば、生殖細胞の変異原性が最終的（apical）エンドポイントとみなされることによる。生殖細胞を用いる試験がさまざまな国の規制に果たす役割は、なお協議中である。US EPA、米国食品医薬品局（US FDA）、カナダ、英国、EU、日本では、生殖細胞を用いる試験を段階2および段階3に配置している。しかし、インド、オーストラリアにあるのは段階1の試験のみであり、生殖細胞を用いる試験は含まれていない。US FDA、US EPA、欧州食品安全機関（EFSA）によれば、体細胞を用いる試験が陽性である化学物質の場合、通常は生殖細胞に到達することが想定されるため、生殖細胞変異原であると考えられる（EFSA、2011年）。体細胞を用いる試験が陰性である化学物質の場合、生殖細胞でも陰性が想定されると考えられる。したがって、生殖細胞の遺伝毒性/変異原性について日常的に試験を行う必要はないと結論付けられる。日本の国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）では、体細胞の強力な変異原でがん原性がない矛盾する状況の解決の際、生殖細胞を用いる試験は有用であると判断している。この場合、変異原性の作用から遺伝性疾患が最終的に生じると考えられるか否か評価するため、生殖細胞による試験を実施すべきであることが推奨される。

In vitro 変異原性陽性かつ *in vivo* 変異原性陽性であるデータの化学物質は、カテゴリー2の変異原に分類される。すなわち、 5 の *in vitro* Ames 試験および肝臓を用

いる *in vivo* TRM 試験で陽性が認められる化学物質は、カテゴリー2 の変異原であるとみなされる。

この例でカテゴリー2 の変異原を定義する基準となるのは、試験の能力が同一である試験の組み合わせ（すなわち DNA 損傷）である。ただし、*in vitro* および *in vivo* 変異原性試験にはさまざまな組み合わせがあり、化学物質をカテゴリー2 の変異原に分類するには、その組み合わせに依拠することも考えられる。同一の能力の試験に基づきカテゴリー2 の変異原に分類される例には、*in vitro* Ames 試験と骨髄を用いる *in vivo* TRM 試験、*ivt* CA と肝臓を用いる *in vivo* CA、*ivt* CA と *in vivo* MNT の組み合わせが挙げられる。カテゴリー2 の変異原に分類される例は、*in vitro* Ames 試験と肝臓を用いる *in vivo* CA、*in vitro* Ames 試験と *in vivo* MNT、*ivt* CA と *in vivo* TRM、*ivt* CA と骨髄を用いる *in vivo* TRM 試験の組み合わせなど、異なる能力の試験に基づく場合もある。

実際に、ECHA の ITS は、異なる能力の試験の組み合わせに依拠している（ECHA、2013 年）。例えば、変異原性が、*in vitro* Ames 試験および / または *ivt* CA および *in vivo* MNT の組み合わせに基づいて割り当てられる場合がある。この例では、*in vitro* Ames 試験と *in vivo* MNT の組み合わせが、カテゴリー2 の変異原の分類には望ましいと考えられる。対照的に、医薬品の不純物を評価する NIHS のワークフローでは、同一の能力を持つ試験の組み合わせ、すなわち *in vitro* Ames 試験と肝臓を用いる *in vivo* TRM 試験の組み合わせが必要とされる。類似の能力か異なる能力かいずれの試

験の組み合わせによる分類に基づいても、利点と欠点の双方が認められる。同一の能力を持つ試験の組み合わせに基づいて変異原性を分類すると、変異原性の経路全体からみた予測の確実性が高まる利点があり、他方、異なる能力の試験では広範な領域の検討を可能にする利点がある。

カテゴリー3 は、同一の能力または異なる能力を持つ *in vitro* および *in vivo* 試験の組み合わせにより定義できる。例えば、*in vitro* Ames 試験と *in vivo* コメットアッセイ（または UDS）を組み合わせた結果から、DNA に基づく遺伝毒性の結果を明らかにすることにより、カテゴリー3 の変異原であることを定義できる。一方、*ivt* CA と *in vivo* コメットアッセイ（または UDS）を組み合わせた結果から、DNA およびタンパク質に基づく変異原性の結果を明らかにすることにより、カテゴリー3 の変異原であることを定義できる。

3.3. げっ歯類のがん原性予測に関する変異原性カテゴリーの性能

一連の試験のデータを用いたげっ歯類のがん原性陽性の予測について、試験の能力の類似か相違のいずれかに基づく試験の組み合わせを検討する前に、まず個別の *in vitro* および *in vivo* 試験の性能を検討した。表 1 に、げっ歯類のがん原性予測に関する個別の試験の性能を示す。

変異原性試験の多く（例えば、Ames 試験、コメットアッセイ、MNT、げっ歯類優性致死（RDL）試験）がげっ歯類のがん原性に高感度を示し、特異度に関し中位を上回る性能が認められたのは、*in vitro* Ames 試験および *ivt* CA 試験のみであった。最終的に本研究結果は、がん原性の予測に関する

る偽陽性の割合の高さを代償に、高感度を得ていることを示す。

偽陽性の割合が高い結果であることは、欧州代替法評価センター (ECVAM) が開催したワークショップ期間中に取り上げられ議論された (EFSA、2011 年参照)。ヒトには無関係とみなされる陽性の結果を得る可能性としての機序、およびそのことを裏付ける証拠について、より優れたガイダンスを要することが確認された。

今回の研究では、がん原性陽性の予測について、3 つの変異原性カテゴリーの性能を検討した。がん原性陽性の予測を定義すると、2 つの変異原性試験を用いて、変異原をがん原性と関連するカテゴリーに分類する際、いずれも陽性の結果が認められることをいう。がん原性陽性の予測の正しさは、あるカテゴリーを定義付ける場合、両試験の最終的な変異原性の結果が陽性であり、その結果が陽性の発がん物質に該当するかにより認められると考えられる。

そこで、最初に我々は、げっ歯類のがん原性と変異原性のカテゴリー間の関係を検討し、試験の能力の特徴が同一である場合について明らかにした。そのため、カテゴリー 3 の変異原の定義に用いるワークフローは、*in vitro* Ames 試験および *in vivo* コメットアッセイが陽性のデータを組み合わせ、次にこのデータをげっ歯類のがん原性と関連付けることにより得た。その解析結果を表 2 に示す。

15 種類の化学物質が、定義済みのカテゴリー 3 の変異原とがん原性に重複することが認められた。明らかに、カテゴリー 3 の変異原とげっ歯類の発がん物質との関係は、感度に関しきわめて優れた性能を示した。

15 種類の化学物質のうち、2 種類のみがカテゴリー 3 陽性かつがん原性の観察結果によれば陰性であることが認められた。こうしたわずかな逸脱は、変異原性を定義するカテゴリー 3 の領域に限界がある (すなわち、遺伝毒性を示したコメットアッセイ陽性のデータが、最終的にすべて突然変異をもたらすとは限らない) ことを考慮すると、予測され得ることである。重複する化学物質の数は限られているが、本研究の最終結果をみると、がん原性の予測に関する偽陽性の割合は低い (13%)。

次の解析では、*in vitro* Ames 試験および *in vivo* TRG により定義されるカテゴリー 2 の変異原性と、げっ歯類のがん原性との関係について検討した。少数の化学物質 (11 種類) がカテゴリー 2 の変異原とがん原性に重複することが認められた。この場合も、ほぼすべてのカテゴリー 2 の変異原が陽性の発がん物質であると認められ、そのため感度に関しては 91% の性能を示し、発がん物質予測に関する偽陽性は 9% にすぎなかった。

同様の研究により、このカテゴリー化のワークフローに沿って、DNA および / またはタンパク質の損傷を明らかにする試験を基準とし、定義された変異原性のカテゴリーとの関連性について検討した。がん原性陽性の予測では、まず *ivt* CA 試験と *in vivo* CA 試験 (または MNT) の組み合わせに基づいた。この場合、陽性データで同一の能力を持つ試験の組み合わせを基準にすると、これを満たすカテゴリー 2 の変異原に属する化学物質は、すべて陽性の発がん物質であることが認められた。

In vitro CA および *in vivo* MNT 陽性デ

ータに基づくカテゴリ-2 の変異原とがん原性との関係も、きわめて高感度（92%）を示した。*In vitro* CA と *in vivo* MNT 陽性データに基づく、39 種類の化学物質のうち、3 種類（8%）のみが変異原性かつがん原性試験陰性であることが認められた。偽陽性の発がん物質の割合が低いことから、肝臓から離れた骨髄に到達する反応性の化学物質は、がん誘発の可能性が高いことを示す。

カテゴリ-1 は、*in vivo* 優性致死試験（DLT）陽性データに基づき定義される。

表 2 のとおり、カテゴリ-1 の変異原とがん原性との関係は、重複する 45 種類の化学物質に基づいている。興味深いことに、カテゴリ-1 に属す 45 種類の化学物質のうち 37 種類（82%）は、単一の *in vivo* DLT 陽性データに基づく、陽性の発がん物質であることも認められる。45 種類の化学物質のうち、8 種類（18%）のみが変異原であるようにみられ、かつ遺伝性疾患を引き起こす可能性があると考えられるにも関わらず、がん原性に該当しない。偽陽性の予測が低い数値に留まることから、肝臓で解毒されず性腺で持続的な変異原性を十分に生じる化学物質の多くは、遺伝毒性とみなせることが示された。

さらに同様の解析を、能力が異なる試験の組み合わせに基づくカテゴリ-2 を定義することにより実施し、カテゴリ-2 および 3 の変異原とげっ歯類のがん原性との関係を検討した。例えば、カテゴリ-2 の定義には *in vitro* Ames 試験および *in vivo* MNT、カテゴリ-3 の定義には *in vitro* CA および *in vivo* コメットアッセイを用いる。

本研究では、試験の能力の特徴が同一で

ある場合を明らかにした際とほぼ同じ結果が認められ、がん原性の予測に関する偽陽性を比較的低い数値（10~12%）に抑え、85~90%の感度を得ている。変異原性とはがん原性との関連付けに用いられた限られたデータベースに基づく、同一の能力または異なる能力を持つ試験を用いる利点について、最終的な結論は下せないと考えられる。

要約すると、類似の能力を持つ *in vitro* および *in vivo* 試験の結果を組み合わせると、主に偽陽性の減少により予測能が向上する。化学物質について、提唱される試験の組み合わせの立証に要する試験をすべて検討し、検討した物質数は限られている（すなわち、計 214 種類のみ）が、個別の試験に比べ偽陽性の劇的な減少が顕著に認められる。

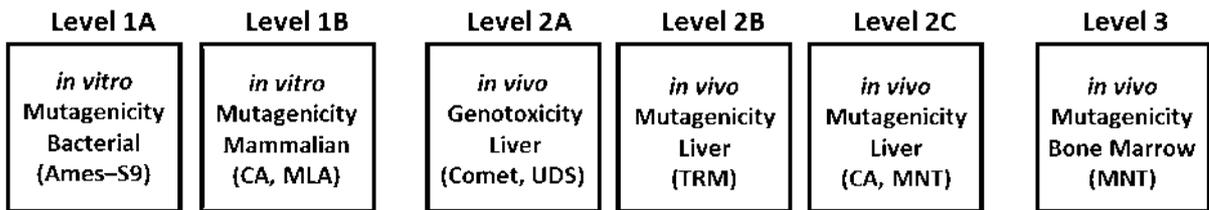
III-4. 結論

これまで作成された遺伝毒性に関する *in vitro*、*in vivo* における外挿のワークフローを、試験の能力に基づいて精緻化した。今回、改訂ワークフローを通じ化学物質 162 種類のデータセットを再評価し、データの結果を解釈する際の欠点に対処した。これにより、最初の TIMES モデルを開発し、その見識を改善に用いた手法からさまざまな示唆が得られる。今回の改訂ワークフローでは、GHS の変異原性カテゴリ-1 から陽性の遺伝毒性を予測する際、その実用性検討の取り組みまで範囲を広げた。試験の能力の類似性または相違性を明らかにした各種組み合わせの試験系について、その性能を評価してもほとんど差異が認められなかった。ただし、研究に利用可能な一連の試

験が限られていたため、今回の結果には偏りが含まれていたことが考えられる。

今後の作業では、このワークフローを拡大し入手可能な TIMES モデルの結果を取

り込み、体系的な利用に向け、このワークフローを実践的な IATA に取り入れていくことになる。



Ames-S9 : 外因性代謝活性化系存在下の細菌遺伝子変異試験、CA : 染色体異常試験、MLA : マウスリンフォーマ試験、Comet : コメットアッセイ、UDS : 不定期 DNA 合成、TRM : トランスジェニックげっ歯類突然変異試験、MNT : 小核試験

図 1. 試験の能力を考慮した *in vitro* から *in vivo* へのワークフロー

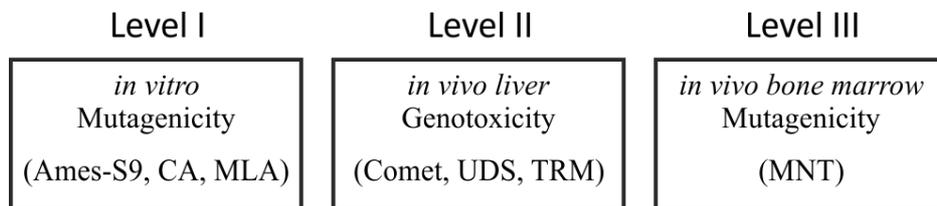


図 2. Mekenyan らによるワークフロー (2012)

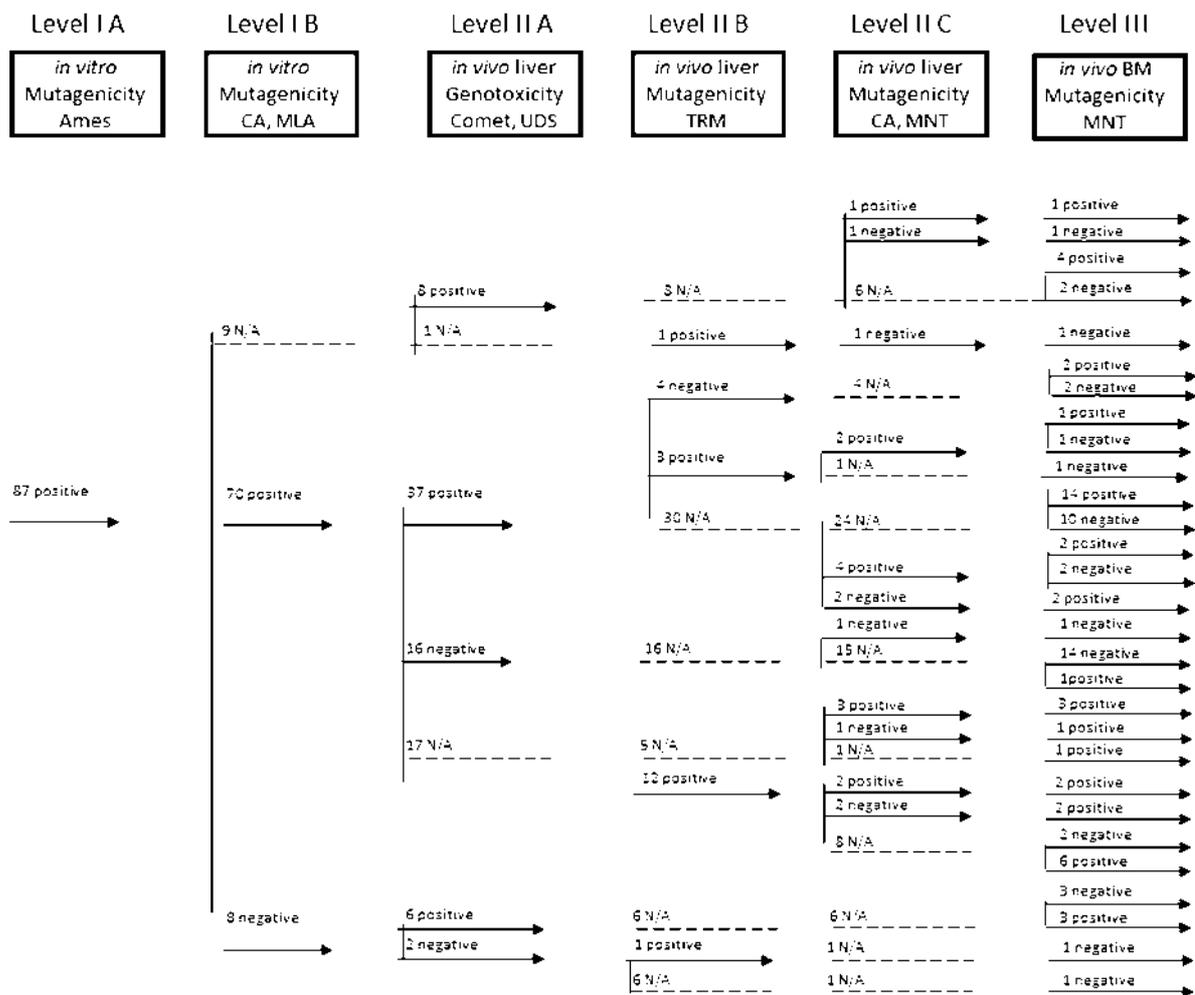


図 3. Ames 試験陽性化学物質のワークフロー全体における結果の内訳

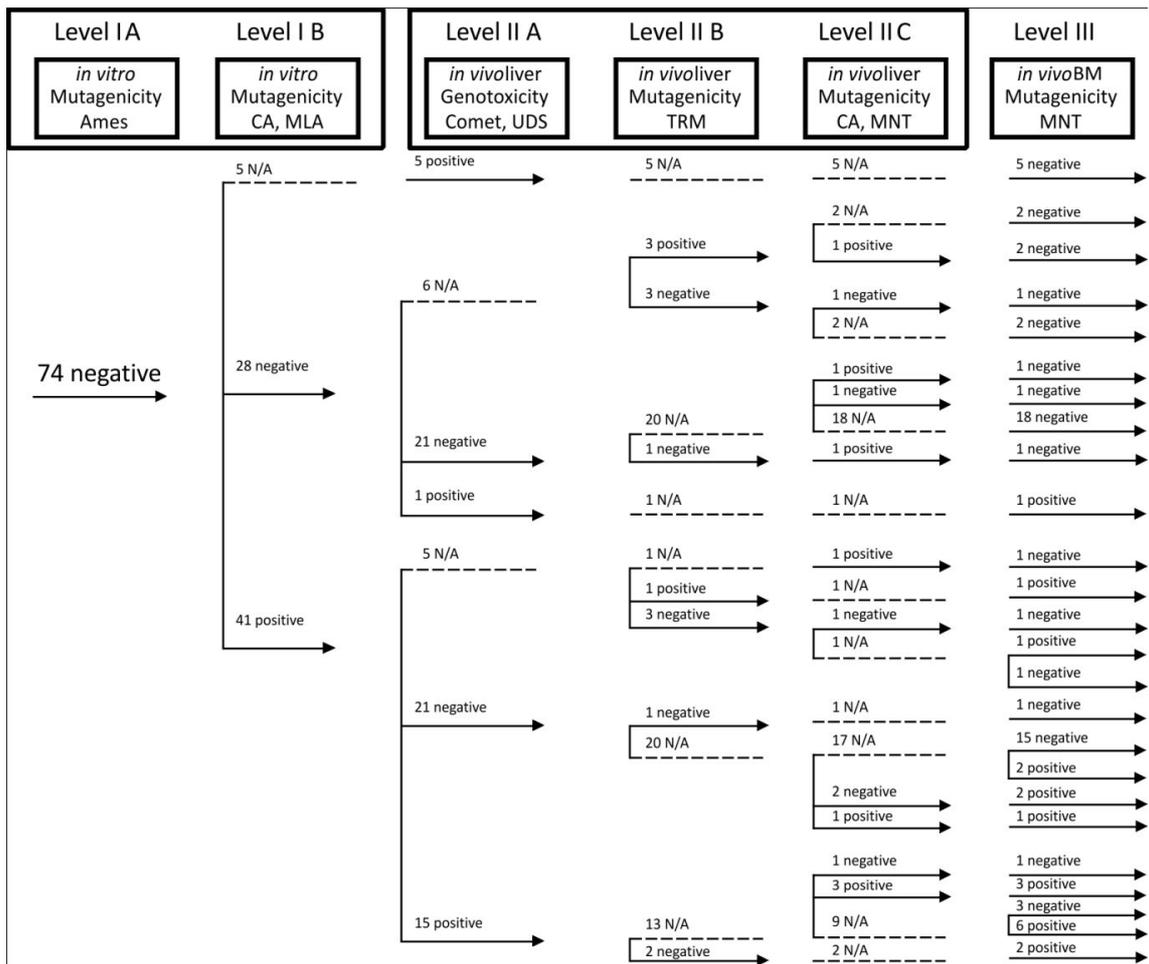


図 4. Ames 試験陰性化学物質のワークフロー全体における結果の内訳

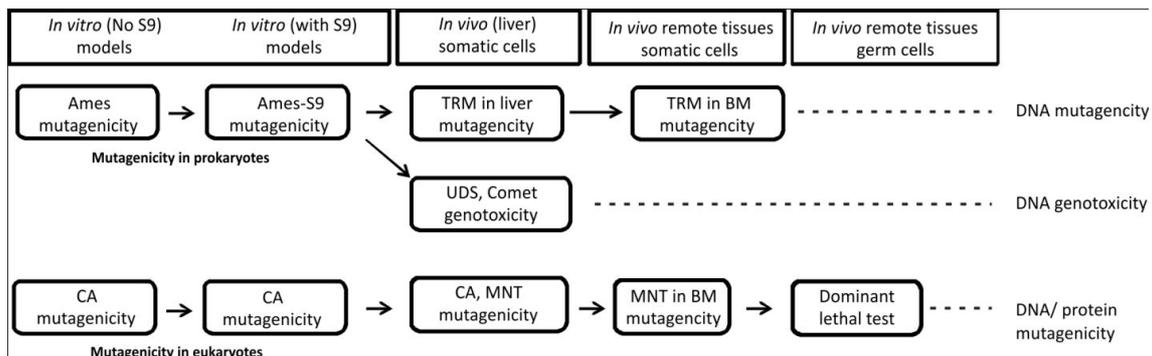


図 5. 遺伝毒性をカテゴリー化して予測するための IATAA ワークフロー

表 1 げっ歯類発がん性を予測するための各遺伝毒性試験の能力

Mutagenicity # Chem	<i>In vitro</i>					<i>In vivo</i> liver			<i>In vivo</i> BM	<i>In vivo</i> Germ cells
	Ames -S9	Ames +S9	CA -S9	CA +S9	MLA	UDS, Comet	TRM	MNT, CA	MNT	RDL
Carcinogenicity	478	344	217	63	89	126	54	65	290	111
Sensitivity, %	81	75	68	59	77	90	94	90	75	82
False Positives, %	55	49	46	59	78	67	74	70	71	74

表 2 発がん性の陽性予測能力が同じと仮定した場合の変異原性カテゴリー化の有効性

Combination of <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> tests	Defined Category mutagens	Sensitivity to positive carcinogenicity, (%)	Rate of false positive carcinogens, (%)	Total # chemicals
Ames and Comet	Category 3	87 (13/15)	13 (2/15)	15
Ames and TRM	Category 2	91 (10/11)	9 (1/11)	11
ivt CA and CA	Category 2	100 (13/13)	-	13
ivt CA and MNT	Category 2	92 (36/39)	8 (3/39)	39
DLT	Category 1	82 (37/45)	18 (8/45)	45

IV. 既存遺伝毒性試験データを用いた *in vivo* 遺伝毒性の知識ベース SAR モデルの改良に関する研究

- Derek Nexus を用いて *in vivo* 変異原性のエンドポイントを予測するためのトランスジェニックげっ歯類データの利用 (研究分担: 本間正充)

研究協力者	S. Canipa	ラーサ研究所
研究協力者	A. Cayley	ラーサ研究所
研究協力者	L. Fisk	ラーサ研究所

IV-1. 研究目的

化学物質の危険有害性およびヒトへのリスクの評価の一環として、*in vivo* での突然変異誘発性の評価は重要。これは、突然変異とがんとの因果関係のみではなく、その他の非がん性疾患を誘発する突然変異の可能性についても同様である。化学物質の変異原性の評価は通常、*in vitro* および *in vivo* の一連の試験を用いて行われる。現在利用可能であり、幅広く用いられている *in vivo* 遺伝毒性試験 (*in vivo* における染色体異常試験および小核試験など) の一つの欠点は、これらの試験法では変異原性を直接測定するのではなく、染色体損傷を検出することによって遺伝毒性を評価しているという点である。一方、トランスジェニックげっ歯類を用いる試験法 (TGR アッセイ) では、有害な影響として化学物質の変異原性 (化学物質により誘発される突然変異) を検出する。多くの場合関心の対象となるのは化学物質が突然変異を誘発する可能性であることから、TGR を用いる試験は他の多くの遺伝毒性試験に比べて非常に有用性が高い。

in vivo での化学物質の変異原性を評価することの重要性を考慮すると、このエンドポイントに対する構造アラートが有用であるのは明白である。TGR アッセイは、このようなアラートの構築に用いることができる信頼性の高いデータを提供する。現在公開されている Derek の知識ベースに収録された *in vivo* 変異原性に関するアラートは TGR アッセイのデータから導き出された 1 種 (キノロンの活性をカバー) のみである (アラート 016)。この点を踏まえると、TGR データのデータセットに対する Derek の感度は低いことが予測される。このことは、OECD が発表したレビュー (Lambert et al) に提示されたデータを用いて NIHS がまとめた TGR アッセイデータのデータセットに対する Derek の性能を測定した際に確認されている。表 1 に示したとおり、このデータセットに対する感度はわずか 10%であった。

In vivo において化学物質に誘発される突然変異を評価することの重要性、およびこのエンドポイントのモデル化に用いる TGR データの利用可能性を考慮し、Derek

の *in vivo* 変異原性カバレッジを拡大すべきであると考えている。これを、今年度のNIHSプロジェクトの目的の一つとした。

この目的を達成するため、Derek の知識ベースにおける *in vitro* 変異原性に関する既存のアラートを拡大適用して *in vivo* の活性をカバーできるか否かを検討した。以下の第 1.2 項に示したこの方法は、過去のNIHSプロジェクト(第4年次~第7年次)でも *in vivo* 染色体損傷のカバレッジを拡張するために採用され、良好な成果が得られている。染色体損傷の評価項目に関しては、この方法により比較的短期間のうちに同様のデータセットに対する感度を大幅に向上させることができた(作業開始前は5%、昨年度のプロジェクト完了後には32%)。

表 1. NIHS の TGR データに対する Derek KB2014 の予測率

	Pred +ve	Pred -ve
Exp +ve	11	102
Exp -ve	0	75

Sensitivity = 11/113 = 10%; Specificity = 75/75 = 100%; Accuracy = (11+75)/188 = 46%

IV-2. 研究方法

NIHS より、188 種の異なる化合物に関する TGR アッセイデータのデータセットが提供された。このデータセットは、OECD が発表したレビュー (Lambert et al) に提示された TGR アッセイデータを用いて NIHS がまとめたものである。Lhasa 社では、このデータセットにおける TGR での判定結果に基づき、以下のルールに従ってこ

れらの化合物を陽性 (113 化合物) または陰性 (75 化合物) の結果に振り分けた。

- ・ + = 標的組織で陽性 (発がん性データが利用できる場合)。総合判定は陽性とする
- ・ - = 標的組織で陰性 (発がん性データが利用できる場合) かつ試験対象とされたことがある他のいかなる組織でも陰性 (コメント欄に記述)。総合判定は陰性とする。
- ・ na(+) = 標的組織で陰性 (発がん性データが利用できる場合) であるが、コメント欄に記載されている他の組織で陽性。総合判定は陽性とする。
- ・ na(-) = 標的組織で陰性 (発がん性データが利用できる場合) かつコメント欄に記載されている試験対象とされた他の組織で陰性。総合判定は陰性とする。

2014 年に公開された Derek の知識ベース (KB) を用い (Derek Nexus 4.0) *in vitro* 変異原性に関するアラートに対してこのデータセットを検討した。この KB には *in vitro* 変異原性に関するアラートが 118 種収録されており、これらのアラートのうち 39 種が TGR アッセイデータに関連するものであった。

1 種だけの活性化合物に対するアラートからは意味のある結果を導き出すために十分なデータが得られないことが予測されたため、3 種以上の活性化合物を対象とした *in vitro* アラートを優先し、このようなアラートについてさらに検討を行った。優先したアラートを表 2 に示す。

表 2 に示したアラートを陽性適中率に従って分類し、さらに優先順位を付した。陽性適中率の高い (したがって、*in vivo* のデ

ータと強く相関する) *in vitro* アラートほど、*in vivo*での活性の予測に拡大適用できる可能性が高いと考えられた。このような観点から、陽性適中率が70%を超えるアラートを優先し、これらのアラートについてさらに検討を行った(表2、Entry 2~8)。なお、キノリン(Entry 1)に対するアラート016については、既に*in vivo*変異原性を予測するアラートであるため今回の優先順位付けから除外されていることに留意されたい。

上記の優先アラートのそれぞれについて、ChemIDPlus、Vitic Nexusのデータベース¹、およびeChemPortal²を通じたECHA毒性データへのアクセスにより、追加できる公開データを検索した。

各活性化化合物における総合的な結果を導き出すため、Lhasa社の専門家が利用可能なTGRアッセイデータを厳格に評価した。続いて、TGRアッセイデータに対する*in vitro*アラートの性能を評価し、*in vitro*アラートが*in vivo*データに対して十分な予測性能を有し(TGRアッセイの結果を用いて評価)なおかつ双方のエンドポイントには同一のメカニズムが関与していると考えられた場合、当該アラートを*in vivo*での活性の予測に拡大適用した。このようにして拡大適用されたアラートは、*in vitro*および*in vivo*での双方の変異原性を予測するものであった。予測性能が不十分である場合、または*in vivo*での毒性に関与するメカニズムが異なっていると考えられた場合には、

当該の*in vitro*アラートを拡大適用しないこととし、観察された結果を追記するためにアラートの記述を更新した。

¹ Vitic Nexus Database バージョン 2.5.0

²

http://www.echemportal.org/echemportal/index?pageID=0&request_locale=en

表 2. NIHS の TGR データを検索した結果、2 つ以上の *in vitro* 変異原性のアラートを
持つ化合物

Entry	Alert no	Alert name	Active	Inactive	Pos Pred (%)	No of compounds
1 ^a	016	Quinoline	11	0	100	11
2 ^b	330	Aromatic azo compound	3	0	100	3
3 ^b	351	Aromatic amine or amide	3	0	100	3
4 ^b	007	N-Nitro or N-nitroso compound	13	1	92.86	14
5 ^b	339	Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	8	1	88.89	9
6 ^b	352	Aromatic amine or amide	7	1	87.5	8
7 ^b	354	Aromatic amine or amide	5	1	83.33	6
8 ^b	019	Epoxide	4	1	80	5
9	329	Aromatic nitro compound	10	5	66.67	15
10	027	Alkylating agent	9	6	60	15
11	023	vic-Dihalide	2	2	50	4
12	331	Halogenated alkene	2	2	50	4
14	328	Halogenated methane	0	3	0	3

IV-3. 研究結果

表 3 に示すとおり、検討対象とした 7 種のアラートのうち 6 種は *in vivo* での活性と関連性があると判断され、*in vivo* に拡大適用した。これらのアラートはいずれも *in vivo* データに対する十分な予測性能を有しており、活性のメカニズムは *in vitro* およ

び *in vivo* のエンドポイントにおいて同一のものであると考えられた。また、哺乳類における推論レベルは、拡大適用としたアラートの大半 (6 種中 5 種) で「妥当」であるとみなした。これは、これらのアラートは陽性適中率が比較的高いこと、および観察された活性は特定の toxicophore に起

因するものであると予想されたことに基づいた判定である。

一方、芳香族アミンおよびアミドに対するアラート 352 については推論レベルを下げて「不確か」とし、このアラートの予測性能が信頼性に劣ることを示している。アラート 352 において推論レベルを「不確か」とした理由は、(i)このクラスには複数の不活性化化合物が含まれているために当該アラ

ートの陽性適中率が低くなること、および(ii)このクラスに属する複数の化合物が他の toxicophore (芳香族アゾ基) を構造中に有していることである。このような理由により、これらの化合物に関しては、観察された活性が特定の toxicophore (芳香族アミンまたはアミド) によるものであるという信頼性に欠けると判断した。

表 3 アラート調査の結果

Entry	Alert number	Alert name	Outcome	Reasoning rule	Likelihood
1	330	Aromatic azo compound	Comments updated	N/A	N/A
2	351	Aromatic amine or amide	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible
3	007	N-Nitro or N-nitroso compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible
4	339	Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible
5	352	Aromatic amine or amide	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Equivocal
6	354	Aromatic amine or amide	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible
7	019	Epoxide	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible

芳香族アゾ化合物に対するアラート 330 は、拡大適用としなかった(表 3、Entry 1)。

TGR アッセイにおいていくつかの芳香族アゾ化合物が変異原性を示すことが報告されているが (Lambert et al) これらの化合物はその活性に關与する可能性のある他の構造的特徴 (すなわち、芳香族アミン基) も有していた。結果として、このアラートに対するコメントを更新したが、新たなルールは追加しなかった。

改良したアラートを含む新しい知識ベース (Derek KB 2014 + 第 8 年次 NIHS) の予測性能は、NIHS の TGR データセットを用いて評価した (表 4)。比較のために、2014 年に公開された標準的な Derek KB 2014 のこのデータセットに対する性能を表 1 に示している。

上記の結果、感度 (10% から 41% に上昇) および正確度 (46% から 62% に上昇) に大幅な向上が認められ、これに伴う特異度の低下 (100% から 93%) はごくわずかであった。

表 1. NIHS の TGR データに対する Derek KB2014 に NIHS Yr8 Knowledgebase を加えたの予測率

	Pred +ve	Pred -ve
Exp +ve	46	67
Exp -ve	5	70

Sensitivity = $46/113 = 41\%$; Specificity = $70/75 = 93\%$; Accuracy = $(46+70)/188 = 62\%$

IV-4. 考 察

化学物質の危険有害性およびリスクの評価の一環として、ヒトにおける突然変異誘発性の評価が重要となることが多い。これは、突然変異とがんとの因果関係のみではなく、その他の非がん性疾患を誘発する突

然変異の可能性についても同様である。化学物質の変異原性の評価は通常、*in vitro* および *in vivo* の一連の試験を用いて行われる。現在利用可能であり幅広く用いられている *in vivo* 遺伝毒性試験 (*in vivo* における染色体異常試験および小核試験など) の一つの欠点は、これらの試験法では変異原性を直接測定するのではなく、染色体損傷を検出することによって遺伝毒性を評価しているという点である。一方、トランスジェニックげっ歯類を用いる試験法 (TGR アッセイ) では、有害な影響として化学物質の変異原性 (化学物質により誘発される突然変異) を検出する。多くの場合関心の対象となるのは化学物質が突然変異を誘発する可能性であることから、TGR を用いる試験は他の多くの遺伝毒性試験に比べて非常に有用性が高い。

この点を考慮し、このようなアッセイに対する DX の予測性能を改善するために、公開されている TGR データをまとめて NIHS が作成したデータセットが Lhasa 社に提供された。NIHS より提供された TGR データは、DX における *in vivo* 変異原性のエンドポイントに關連するものであった。このエンドポイントは、DX において未だ十分に開発されていないものである。現在のところ、このエンドポイントに關するアラートは 1 種のみであり、このデータが知識ベースに使用されている (アラート 016)。実際に、このエンドポイントに対して上記のデータセットを処理した結果、感度はわずか 10%、balanced accuracy は 55% であった。この分析結果より、このエンドポイントに対する予測性能を改善する必要があるのは明白であった。これを行うための一

つの方法として、*in vivo*のエンドポイントに関するアラートの開発を迅速化するため、過去のプロジェクトで *in vivo* 染色体損傷のエンドポイントの開発に用いたものと同様の方法を採用し、アラート、構造活性相関およびこのエンドポイントにおいて同定されているメカニズムを用いて同一のエンドポイントに関して十分に開発されている *in vitro* での予測システムを利用することが考えられた。DX の知識ベースにおける *in vitro* 変異原性エンドポイントは既に十分に開発されていることから、この方法は妥当であると判断された。よって、最初に、上記のデータセットを DX の *in vitro* 変異原性エンドポイントに対して処理した。予測されたとおり、このエンドポイントにおける感度は良好(73%)であったが、特異度が比較的低い値(57%)を示した。このため、必要に応じて *in vivo* の結果とアラートとの関連性について各 *in vitro* アラートを個別に評価することによって、この高い感度を維持したまま *in vivo* のエンドポイントにおける特異度を改善する必要があると考えられた。このような観点から、トランスジェニックげっ歯類を用いた試験における *in vitro* 変異原性アラートの関連性について検討するため、特定の基準(陽性適中率 50%以上、かつ当該アラートをアクティブ化する化合物が 3 種以上)に合致する *in vitro* 変異原性アラートのショートリストを作成した。このリストのアラートを分析することにより、最も短時間でこのエンドポイントにおける感度を改善することができる考えた。11 種のアラートが上記の基準に合致し、以下に示す 7 種を今年度のプロジェクトの一環として検討した。

検討対象とした各アラートに関する文献データをさらに検討した結果、7 種の *in vitro* 変異原性アラートのうち 6 種に、関連する推論ルールを追加して *in vivo* 変異原性の予測に拡大適用することとした(以下の 1~6)。また、すべてのアラート(以下の 1~7)のコメントを更新し、当該の化学クラスに属する化合物の *in vivo* での活性と *in vitro* での活性との関連性を記述するために *in vivo* データを追記した。また、アラートに関連参考文献のリンクを示し、必要に応じて例証化合物を追加した。

1. アラート 007 - N-ニトロまたは N-ニトロソ化合物
2. アラート 019 - エポキシド
3. アラート 339 - 多環芳香族炭化水素またはそのヘテロ類似体
4. アラート 351 - 芳香族アミンまたはアミド
5. アラート 352 - 芳香族アミンまたはアミド
6. アラート 354 - 芳香族アミンまたはアミド
7. アラート 330 - 芳香族アゾ化合物

上記の方法により DX の知識ベースを更新した結果、このエンドポイントにおける上記データセットに対する感度が 41%まで上昇し、特異度は良好に維持された(93%)。

トランスジェニックげっ歯類データセット中の 3 種以上の化合物によってアクティブ化され、なおかつ陽性適中率が 50%超である検討すべき優れた *in vitro* アラートが 4 種残されている。また、陽性適中率は低い 3 種以上の化合物によってアクティブ

化されるアラートが1種、*in vivo* 変異原性を予測できるが更新の必要があるアラートが1種(アラート016)存在する。したがって、この作業を完了させて共同論文を発表するために、今後のプロジェクトにおいてもこの方法を継続することが妥当であると考えられる。

この作業の継続にあたっては、この方法には、カバーすることができる化合物数という点で限界があることに留意する必要がある。しかし、さらに重要なことは、*in vitro*での活性と*in vivo*での活性との関係は、必ずしも当該化学物質が属する化学クラスまたは遺伝毒性誘発メカニズムによって決定される(これによりアラートがアクティブ化)わけではなく、このかわりに化合物の物理化学的性質に関する記述子およびADME特性が関連している可能性があるという事実に基づいた、より本質的な限界があることである。このため、メカニズムに基づいた構造アラートでは、*in vivo*において陽性であるか陰性であるかを的確に区別できないことがある。この点を考慮し、*in vitro*で陽性の結果が得られた化合物の*in vivo*での活性を、構造クラスのみに基づくのではなく物理化学的性質に基づいて予測する予備的な検討も行った。このアプローチには、*in vitro*での結果と*in vivo*での活性との関連性に関するより一般的なルールを明らかにすることができる利点があると考えられる。このような関連性を発見することができれば、既に十分に開発されている*in vitro*での予測を出発点として用い、より速いペースで*in vivo*エンドポイントのカバレッジを拡張することができるであろう。しかし、最初に、*in vitro*で陽性と予

測されている化合物を*in vivo*で陽性である化合物と陰性である化合物とに区別することができる記述子の同定を目的として行った調査では、十分な成果が得られなかった。この分析では、正しい記述子またはその組み合わせは発見することができなかったと考えられる。

*In vitro*および*in vivo*の遺伝毒性の結果/予測とがん原性との関連性に関するより一般的な分析では、*in vitro*変異原性に関するアラートをアクティブ化する構造がげっ歯類に対する発がん性物質であるか否かの判定に、*in vivo*における遺伝毒性のエンドポイントが有用である可能性が強く示された。*in vitro*変異原性アラートをアクティブ化する化合物のうち、*in vivo*遺伝毒性のエンドポイントのアラートも一つ以上アクティブ化する化合物の75%がげっ歯類に対する発がん性物質であったのに対し、*in vivo*エンドポイントのいかなるアラートもアクティブ化しない化合物ではわずか35%であった。

IV-5. 結 論

*In vivo*変異原性の評価は、化学物質の安全性評価における重要な要素の一つである。このため、このエンドポイントに対する構造アラートが有用であるのは明白である。本研究では、NIHSより提供を受けたTGRアッセイデータを用い、いくつかの*in vitro*変異原性アラートを*in vivo*での活性を予測するために拡大適用した。この結果、NIHSのTGRデータセットを用いて評価したときの感度および正確度が大幅に向上した。

本プロジェクトでは、陽性適中率が最も

高い(70%超) *in vitro* アラートを優先して詳細な検討を行ったが、表 2 に示すとおり、陽性適中率が比較的高い(50%以上)アラートが 4 種残されている。これらのアラートを検討することによって *in vivo* 変異原性の予測への拡大適用が可能となり、さらにこの結果として NIHS の TGR データセットに対する感度がより上昇する可能性がある。残されたこれら 4 種のアラートを拡大適用した場合、感度の向上は最大で 60% に達すると考えられる。

この方法を用いてさらに感度を高めるためには、NIHS の TGR データセットに含まれる関連データを用いて、表 2 には示されていないその他の *in vitro* 変異原性アラートを拡大適用する必要がある。しかし、これらのアラートの対象とされている活性化合物は 3 種未満であり、多くのアラート(32 種中 16 種)が 1 種だけの活性化合物を対象とするものである。したがって、NIHS の TGR データセット以外に根拠となるデータが得られない限り、これらのアラートの多くは拡大適用に該当する可能性が低いと考えられる。

研究発表

誌上発表

1. Petkov, PI, Patlewicz, G, Schultz, TW, Honma, M, Todorov, T, Kotov, Dimitrov, SD, Donner, M, Mekenyan, OG, A feasibility study: Can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity? Regul. Tox. Pharm., 72, 17-25 (2015)
2. Morita, T., Miyajima, A., Hatano, A., Honma, M.: Effects of the proposed top concentration limit on an *in vitro* chromosomal aberration test to assay sensitivity or to reduce the number of false positives, Mutation Research, 769, 34-49 (2014)
3. Kirkland, D, Zeiger, E, Madia, F, Gooderham, N, Kasper, P, Lynch, A, Morita, T, Ouedraogo, G, Morte, JM, Pfuhler, S, Rogiers, V, Schulz, M, Thybaud, V, Benthem, J, Vanparys, P, Worth, A, Corvi, R., Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop, Mutation Research 755, 55-68, (2014)

学会発表

1. 本間正充: 医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理, 第350回CBI学会研究講演会 2014年5月 東京
2. 本間正充: 日本環境変異原学会レギュラトリーサイエンスWG活動, 日本環境変異原学会公開シンポジウム 2014年5月 東京
3. Honma, M et al.,: Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing

- genotoxicity by targeted mutagenesis, 43rd EEMS Annual Meeting 2014年7月 ランカスター・英国
4. M. Honma: Use of QSAR Tools for Hazard Identification of Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, 9th World Congress on Alternative and Animal Use Sciences (WC9), 2014年8月 プラハ・チェコ
5. 本間正充: インシリコによる医薬品中不純物の安全性評価と、その向上に向けた国際共同研究, CBI学会2014年大会プレミートングセッション 2014年10月 東京
6. Honma, M.: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014年11月 上海・中国
7. 本間正充: 遺伝毒性インテリジェントテストシステム, 日本環境変異原学会第43回大会 2014年11月 東京
8. 本間正充: QSARを利用した医薬品中の遺伝毒性不純物の評価と管理, 日本動物実験代替法学会第27回大会 2014年12月 横浜
9. M. Honma et al.,: Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014年12月 コルカタ・インド
10. Takeshi Morita and Shuichi Hamada: The Rat Liver Micronucleus Test: Summary of the 2013 IWGT Working Group on the Liver Micronucleus Test, 2014 GTA (Genetic Toxicology Association), Newark, US, 7 May 2014.
11. 森田 健: Ames陽性知見は、発がん性や遺伝毒性リスクを全て同じレベルで示唆するか? JEMS・BMS研究会 第51回定例会 (2014年6月6日、大橋会館、東京)
12. 森田 健、古田光子、春日文子: 有害性物質の毒物劇物への該当性評価、第36回日本中

毒学会総会（2014年7月25-26日、板橋、東京）

13. Morita, T, Kasuga, F.: Comparison of GHS classification of CMR substances in EU and Japan, 2014 EuroTox, The 50th Congress of the European Societies of Toxicology (September 7-10, 2014, Edinburgh)
14. Hamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada S, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Sui H, Shimada Y, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Terashima Y, Takasawa H, Narumi K, Wako Y, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus Assay Using Young Adult Rats (IV): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS., Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS), 45th Annual Meeting 2014: Hilton Orlando Lake Buena Vista, Orlando, Florida September 13-17, 2014.
15. 森田健、小宮佐知子：EU、ドイツおよび日本における生殖細胞変異原の分類比較、日本環境変異原学会第43回大会、2014年12月4-5日、東京

知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 26 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

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（H24-化学-指定-010）

分担研究課題：反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究

研究分担者	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室
研究分担者	長谷川 隆一	国立医薬品食品衛生研究所	客員研究員
研究協力者	高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所	研究員
研究協力者	松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所	研究員
研究協力者	川村 智子	国立医薬品食品衛生研究所	研究員

研究要旨

本研究では肝毒性について、これまでに開発した Rapid Prototypes (RP) アラートのうち更に調査すべきアラートの優先順位付けを行い、必要に応じて正式な肝毒性アラートとするための検討を行ってきた。昨年度までは、病理組織学的データや公知のデータセット、公表論文の調査結果から優先選定を行い、各アラートの活性とその根拠を詳細に検討してきたが、今年度は、残された 21 種の RP のすべてについて専門家による簡易評価を行った。その結果、フルアラートへの変更の可能性の高い 2 アラートをフルアラートとして作成した。一方、8 つの RP は活性の理論的根拠を確立することができないか、同定された toxicophore と活性とに関連性がないと判断されこれらのアラートを無効化した。これにより、トレーニングセット化合物群に対する肝毒性の予測精度は、肝毒性の予測において感度 39.5%、特異性は 77.9%となった。昨年に比べて感度が落ちているが、特異性は向上しており、根拠の低いアラートを無効とした結果であると考えられた。本年度の検討により、既存の構造アラートを効果的に利用して関連する毒性メカニズムに基づいた新たなエンドポイントに関するアラートの構築を迅速化できることが実証された。また、RP を正確に優先順位付けすることがフルアラート構築の効果的な出発点となることが示された。

A. 目的

本研究に先立つ研究において、反復投与毒性試験結果をもとに肝毒性評価のための Rapid prototype (RP) アラートの構築を

進めてきた。本研究班では、これらの RP をさらに検討すること、どちらとも云えないと推論される RP や Derek 知識ベース内の限られた文献とメカニズム的裏付けの数

を減らすこと、また可能性として、裏付けとなる参考資料、例証、メカニズ的な根拠などを有する完全なアラートの数を増加させることである。前年度までの研究においては、病理組織学的データや公知のデータセット、公表論文の調査結果から優先選定を行い、各アラートの活性とその根拠を詳細に検討し、適切であると判断された場合にはフルアラートへと変更した。ただし、この方法はフルアラートに変更できる可能性のある RP アラートを特定するために有用であることが証明されたが、優先順位の低いアラートも含めてすべての RP アラートを検証するには時間のかかることが想定された。そこで、今年度は、残りの肝毒性に関する 21 種の RP アラートのすべてについて簡易評価を行い、検討すべき RP アラートの分類を行うこととした。

B. 方法

データセット

昨年度と同様の反復投与毒性試験結果データのうち、より詳細な病理組織学データを含む 197 化合物のデータセットを使用した。

RP の優先順位付け

RP の優先順位付けには、昨年度と同様に、データセットに含まれているアラートの裏付けとなる化合物数および Vitic に収録されているアラートをアクティブ化する肝毒性データを含む化合物数を考慮した。追加的な手順として、残されている RP のそれぞれについて簡易評価を行った。この分析には、残されている 22 種の RP アラートの各クラスに関する公開毒性データおよびメカニズムデータの解釈を含めた。これ

をもとに RP アラートの最終的なスプレッドシートを作成し、検討結果に基づいて各 RP アラートを以下のように分類した。

クラス 1 – フルアラート構築の可能性のあるアラート

クラス 2 – 保留 (有効な toxicophore、フルアラート構築に利用できる公開データはあるが不十分、またはメカニズムに基づいた根拠が不十分) するアラート

クラス 3 – 無効化すべきアラート (公開文献中にデータなし、および/または活性に当該 toxicophore との関連なし)

肝毒性アラートの開発

上記 RP アラートの分類後、まず、フルアラートへの変更に適していると考えられるクラス 1 のアラートから検討を始め、NIHS より入手した肝毒性の詳細データを分析した。続いて、原型となる RP アラート作成の根拠となった化合物に関する肝毒性データを ChemIDPlus、PubMed および Google を用いて検索した。ChemIDPlus ではサブストラクチャーによる検索で見つかった化合物に関する肝毒性データを収集した。さらに、公開データセットである Liver Toxicity Knowledge base (FDA)、Fourches のデータセット (Fourches et al.) および NITE が作成した HESS DB でも毒性データを検索した。

C. 結果

簡易評価によるクラス分類の結果、クラス 1 には 9 アラート、クラス 2 は 5 アラート、クラス 3 には 8 アラートに分類することができた。

今年度は、クラス 1 のうち 2 つのアラート(「2-アミノピリミジン」, 「スチレンまたはその誘導体」)についてフルアラートへの変更を行うことができた。さらに、フルアラートに変更することができないと思われるクラス 3 の 8 種の RP すべてを無効化することができた。以下にこれらの解析の概要を記す。

新たなフルアラート

RP008 「2-アミノピリミジン」

この RP はデータセット内の 2 種の陽性化合物を捕捉したものであり、陽性予測率は 50%である。また、Vitic 内の陽性化合物 1 種および Fourches のデータセット内の陽性化合物 4 種が、このアラートをアクティブ化した。公開されている毒性データの綿密な分析においては、RP アラートの対象となる化合物に起因する肝毒性には異なるメカニズムが関与している可能性が示された。**図 1** に示すように、トリメトプリムが代謝活性化を受けると、ピリミジンパライミノキノンメチドが生成される可能性がある。分離した肝ミクロソーム中でトリメトプリムをインキュベートした場合に、これがタンパク質付加体を形成することが明らかにされている (Lai et al.)

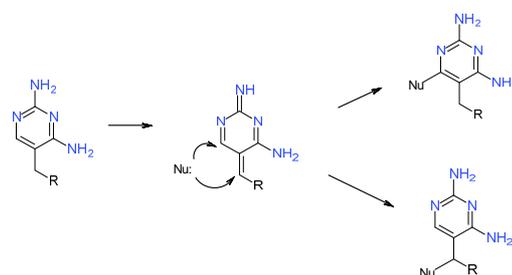


図 1. Mechanism of bioactivation of trimethoprim (adopted from Damsten et al).

イサキシソニンの場合も、ミクロソームタンパク質付加体の形成が認められていることから、代謝過程で共有結合付加体を形成し得る反応種が生成されることが示唆された (Letteron et al, Martinat et al.)。このとき形成される付加体の正確な構造は同定されていないが、イサキシソニンの主要な代謝物は 5-ヒドロキシイサキシソニン (5-hydroxyisaxsonine) であることから、この化合物に起因する肝障害には 4,5-エポキシド (**図 2**) が関与していることが示唆される (Martinat et al.)

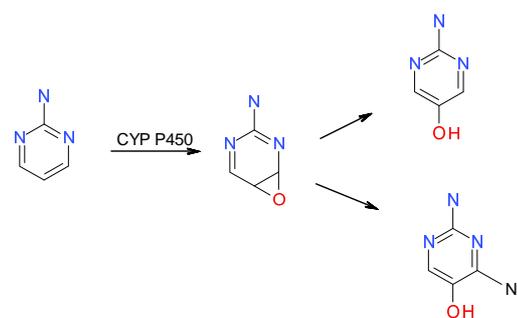


図 2. Activation of isaxsonine

イサキシソニンに起因する肝障害の症例報告は多数発表されており、肝毒性は広範な肝細胞壊死および肝機能酵素の顕著な上昇として現れることが示されている (Baud et al, Alcabes et al, Zarski et al, Espinoza et al, Mallet et al.)。特異体質性の免疫応答がイサキシソニンによる肝毒性のメカニズ

ムであることが示唆されているが、肝障害は1日用量 750 mg ~ 2.25 g にて治療を受けた患者で観察されている点に注意が必要である (Baud et al., Alcabes et al., Zarski et al., Espinoza et al., Mallet et al.)

本検討の結果として、2-アミノピリミジンの肝毒性を記述した新たなフルアラートが追加された (これに伴い、対応する RP アラートを無効化)。イサキシニン (図 2) は肝毒性に関するエビデンスが最も多い化合物クラスであることから、このアラートの適用範囲はイサキシニンによる毒性に關与するメカニズムに基づいて定義した。トリメトプリム (図 1) の生体内活性化によっても肝毒性が生じるが、このメカニズムは NIHS の陽性化合物には該当しないと考えられるため、本共同研究プロジェクトではこのクラスを検討対象にしないこととする。この新たなアラートが対象とする主な部分構造は、1) 無置換のピリミジン環 5 位、および 2) 環外窒素上に少なくとも 1 個以上の水素をもつことである。このアラートの適用範囲を定義するメカニズムに基づいた根拠は単一の化合物 (イサキシニン) の代謝データのみを基にしたものであり、データセット中の陽性化合物を含めるためにはさらに推量が必要であることから、このアラートの推論レベルは「不確か」とした。この変更により、この新たなアラートでは NIHS データセットに対する陽性予測率が RP アラートに比べて向上した。

RP024 「スチレンまたはその誘導体」

この RP アラートの NIHS データセットに対する陽性予測率は、80% と極めて高い。

このクラスに関して公開されている肝毒性データを検索した結果、スチレンは生体内活性化によりスチレン-7,8-オキシドを生成することが確認された (Sumner and Fennell)。この反応種は、細胞高分子と反応して付加体を形成することが明らかにされている (Yuan et al.)。このアラートの適用範囲も、他の共役アルケン、1,3-ブタジエンおよびその類似体を含めるよう拡張した。この拡張は、それぞれエポキシブテン (Kirman et al.) (1-クロロエテニル) オキシラン (Munter et al.) およびイソブレンオキシド / 2-イソプロペニルオキシラン (Hurst) に変換されることが明らかにされている。1,3-ブタジエン、クロロブレンおよびイソブレンが同様の代謝活性を示すことに基づいたものである。スチレンおよび 1,3-ブタジエンの生体内活性化を 図 3 に示す。

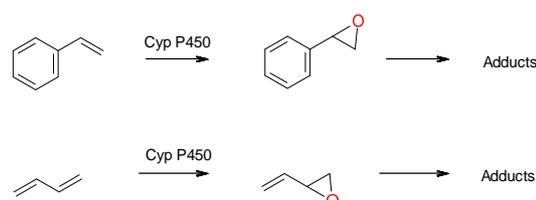


図 3. Metabolic activation of styrene and 1,3-butadiene.

実験動物 (ラットおよびマウス) において、数多くの共役アルケンが出血性小葉中心性肝細胞壊死および肝酵素の上昇を引き起こす (Vainio et al., Morgan et al 1993, NTP 1984, NTP 1998)。また、ヒトにおいては、スチレンへの職業暴露により肝機能酵素に変化が生じることが複数の研究で報告されている (Harkonen et al.)。動物種間で、求電子性エポキシドへの活性化の速度および解毒作用に有意差が認められて

いる (Cruzan et al.)

このアラートに必須の主な部分構造の基本となるのはエポキシ化部位であり、1) 無置換の末端炭素、および 2) 2 番目のアリル炭素のみに限定された置換を含む。ハロゲンで置換された化合物の生体内活性化はスチレンと同様であることが示されていることから (Chung et al.) このアラートでは原型となる RP アラートと異なり、スチレンのベンゼン環上の置換にハロゲン (F, Cl, Br) を含めるよう拡張されている。新規のフルアラート 819 では化学的空間の適用範囲を拡大したため、原型である RP アラート 024 に比べて陽性予測率が低下した。また、このアラートは NIHS データセット中の 1 種の陰性化合物によってもアクティブ化されたが、真の陽性化合物が陰性とみなされることはなかった。

無効化した RP アラート

RP003 : ヒダントインまたはその誘導体

データセットにおける陽性予測率が 50% である。フェニルヒダントインの肝毒性に対するアラートはあるが、このアラートが対象とする部分構造はフェニル環 (アレンオキシドの生成を介して生体内活性化に関与すると考えられる) の存在のみである。フェニル環をもたない化合物の肝毒性のメカニズムは同定できなかった。データセットの陽性化合物数が少ないこと、公開されている肝毒性データの不足、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

RP004 : チオテトラゾールまたはその誘導体

データセットにおける陽性予測率が 25%

である。データセット中に陽性化合物は 1 種のみ。陽性化合物と構造的に類似する陰性化合物が 1 種みられる。公開データセット (Fourches および Vitic) 中でこの RP アラートをアクティブ化した陽性化合物はチオテトラゾール部分を有する β -ラクタム系抗生物質であり、これらの陽性化合物の肝毒性は β -ラクタム環によるものであることが示唆される。陽性予測率が低いこと、データセットの陽性化合物数が少ないこと、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

RP006 : チアゾリジノンまたはその誘導体

データセット中 1 種の化合物のみがこのアラートをアクティブ化。公開文献中に、類似化合物に関する肝毒性データなし。データセットの陽性化合物数が少ないこと、公開されている肝毒性データの不足、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

RP009 : 硫化ジフェニル、スルホキシドまたはスルホン

データセットにおける陽性予測率が 57% である。この toxicophore の肝毒性メカニズムは不明。明確なメカニズムは同定できなかったが、いくつかの陽性化合物は、活性に関与する可能性のある他の官能基を有している。公開されている肝毒性データの不足、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

RP018 : ピロリジンまたはその誘導体

データセットにおける陽性予測率が 57% である。公開データセット (Fourches および Vitic) 中でこの RP アラートをアクティブ化する陽性化合物は、「N-アシルピロリジ

ン、ピペリジンおよび類似体」に対する肝毒性アラート 614 もアクティブ化する。その他の陽性化合物については、肝毒性のメカニズムは不明である。メカニズムデータの不足により、この RP アラートを無効化した。

RP022：フルオロキノロン-3-カルボン酸

データ中 1 種の化合物のみがこのアラートをアクティブ化。この化合物は、肝毒性アラート 471「キノロン-3-カルボン酸およびナフチリジン類似体」もアクティブ化する。このような化合物による肝障害は既存の知識ベースにおいてカバーされているため、この RP アラートを無効化した。

RP028：第三級アルコールまたはエーテル

データセットにおける陽性予測率が 57.9%である。毒性データに一貫性なし。Vitic および データセットの双方で単純な例証化合物(t-ブタノールなど)が不活性である。このクラスではメカニズムが不明。肝障害に關与する可能性がある他の官能基をもつ化合物が含まれる。公開されている肝毒性データの不足、およびメカニズムデータの欠如により、この RP アラートを無効化した。

RP031：O-tert-ブチルエステルまたはカルバメート

データセットにおける陽性予測率は 100%であり、データセット化合物 5 種がこのアラートをアクティブ化するが、このうち 2 種は「カルバメート」に対する既存の肝毒性アラート 692 もアクティブ化する。この化合物によって引き起こされる肝障害に「O-tert-ブチルエステル (O-Tertiary butyl ester) またはカルバメート」部分が

關与していることを示すメカニズムに基づいたエビデンスはない。メカニズムデータの不足により、この RP アラートを無効化した。

以上、10 種の RP アラートを検討した結果、2 種の新規アラートを実行し、10 種の RP アラートを無効化した結果、データセットにおける Derek の肝毒性エンドポイント予測性能の変化を表 1 に示す。

表 1. 予測性能比較

	Hepatotoxicity		
	感度%	特異性%	一致率%
昨年度	45.4	75.5	64.3
今年度	39.5	77.9	63.6

< 参照文献 >

Alcabes G, Vankeerberghen L, Opolon P, Hecketsweiler P and Levy VG. Fatal hepatitis caused by isaxonine. Presse Medicale, 1983, 12, 2696-2697, pmid: 6228823.

Baud F, Bernuau J, Benmami N, Pariente EA, Bouygues M, Guillan J, Roche-Sicot J, Degott C, Rueff B, Pessayre D and Benhamou JP. Acute hepatitis caused by isaxonine phosphate (Nerfactor) . Gastroenterologie Clinique et Biologique, 1983, 7, 352-354, pmid: 6307799.

Cruzan G, Cushman JR, Andrews LS, Granville GC, Miller RR, Hardy CJ, Coombs DW and Mullins PA. Subchronic inhalation studies of styrene in CD rats and CD-1 mice.

- Fundamental and Applied Toxicology, 1997, 35, 152-165, doi: 10.1006/faat.1996.2273.
- Chung JK, Shen S, Jiang Z, Yuan W and Zheng J. Structure-toxicity relationship study of para-halogenated styrene analogues in CYP2E1 transgenic cells. *Toxicology Letters*, 2012, 210, 353-359, doi: 10.1016/j.toxlet.2012.02.008.
- Damsten MC1, de Vlieger JS, Niessen WM, Irth H, Vermeulen NP and Commandeur JN. Trimethoprim: novel reactive intermediates and bioactivation pathways by cytochrome p450s. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21, 2181-2187, doi: 10.1021/tx8002593.
- Espinoza P, Pelletier G, Attali P, Sinico M and Ladouch A. Acute hepatitis caused by isaxonine phosphate. 2 cases. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1983, 7, 936-937, pmid: 6689158.
- Fourches D, Barnes JC, Day NC, Bradley P, Reed JZ and Tropsha A. Cheminformatics analysis of assertions mined from literature that describe drug-induced liver injury in different species. *Chemical Research in Toxicology*, 2010, 23, 171-83, doi: 10.1021/tx900326k.
- Hurst HE. Toxicology of 1,3-butadiene, chloroprene, and isoprene. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, 189, 131-179, doi: 10.1007/978-0-387-35368-5_6.
- Kirman CR, Albertini RJ, Sweeney LM and Gargas ML. 1,3-Butadiene: I. Review of metabolism and the implications to human health risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 2010, 40 (Suppl 1), 1-11, doi: 10.3109/10408444.2010.507181.
- Lai WG, Zahid N and Uetrecht JP. Metabolism of trimethoprim to a reactive iminoquinone methide by activated human neutrophils and hepatic microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999, 291 (1) , 292-299, pmid: 10490916.
- Letteron P, Fouin-Fortunet H, Tinel M, Danan G, Belghiti J and Pessayre D. Mechanism for isaxonine hepatitis. I. Metabolic activation by mouse and human cytochrome P-450. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1984, 229 (3) , 845-850, pmid: 6547179.
- Mallet L, Priollet P, Renaudin JM, Petite JP, Vayssairat M and Camilleri JP. Hepatotoxicity caused by isaxonine phosphate. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1983, 7, 429-430, pmid: 6307801.
- Martinat C, Amar C, Dansette PM,

Leclaire J, Lopez-Garcia P, Cao TD, N'Guyen HN and Mansuy D. *In vitro* metabolism of isaxonine phosphate: formation of two metabolites, 5-hydroxyisaxonine and 2-aminopyrimidine, and covalent binding to microsomal proteins. *European Journal of Pharmacology*, 1992, 228 (1) , 63-71, doi: 10.1016/0926-6917 (92) 90013-3.

Munter T, Cottrell L, Ghai R, Golding BT and Watson WP. The metabolism and molecular toxicology of chloroprene. *Chemico-Biological Interactions*, 2007, 166, 323-331, doi: 10.1016/j.cbi.2006.05.017.

National Toxicology Program (NTP) . Toxicology and carcinogenesis studies of chloroprene (CAS No. 126-99-8) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). National Toxicology Program Report, 1998, available at "http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr467.pdf".

National Toxicology Program (NTP) . Toxicology and carcinogenesis studies of 1,3-butadiene (CAS No. 106-99-0) in B6C3F1 mice (inhalation studies) . National Toxicology Program Report, 1984, available at "http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr288.pdf".

Sumner SJ and Fennell TR. Review of the

metabolic fate of styrene. *Critical Reviews in Toxicology*, 1994, 24 (Suppl 1) , 11-33, doi: 10.3109/10408449409020138.

Yuan W, Jin H, Chung JK and Zheng J. Evidence for cellular protein covalent binding derived from styrene metabolite. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 186, 323-330, doi: 10.1016/j.cbi.2010.05.004.

Zarski JP, Dentant L, Grauer JL, Piton JL, Cabanel G and Rachail M. Acute hepatitis caused by isaxonine: a case report with reintroduction. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 1983, 7, 430, pmid: 6688231.

D. 考察

前年度までの検討ではデータセットに対する Derek の知識ベースの感度は上昇または変化なしであったのに対し、今年度の更新後、予測の感度および一致度が低下した。一見これらの予測精度の低下は望ましくない傾向であると思われたが、今年度は、公開文献から得られる利用可能な肝毒性データおよびメカニズムデータが限られているために多くの RP アラートを無効化したことを考慮すると、それほど不良な結果であるとは考えられない。例示化合物またはメカニズムが明らかにされていない等の裏付け情報のないアラートは、対象としている化合物と毒性の関連性が評価できないことから、あまり有用ではないと考えられる。

このため、フルアラートに変更することができない RP アラートを無効化することとは今年度の成果の一部であると考えられる。このようなアラートは、多くの場合、同定された官能基は偶然一致した可能性があり、活性への関与を示すものではないかもしれない。したがって、このような RP は、トレーニングデータセットがカバーしている化学的ドメインの外では良好に機能しないと考えられる。

今後の研究課題において、既存の Derek 知識ベースのみならず、より幅広い文献から得た知識情報も用いて、肝毒性のエンドポイントに対するこのようなモデルを作成する。最初に作成するモデルは、肝毒性のエンドポイントの詳細な予測ではなく、この毒性を生じる可能性のある官能基を当該化合物が有するか否かの警告を与えるに留まる可能性がある（したがって、特異度が低下するかわりに感度が非常に高くなると考えられる）。しかし、このような高感度の粗雑なモデルを構築することができれば、別のモデルを用い、*in vivo* での活性を減弱させる可能性がある物理化学的特性に基づいたフィルタリングを行うことにより、将来的には特異度を改善することができるであろう。*in vitro* 染色体損傷のエンドポイントについては、比較的良好に機能するモデルおよびこれに用いるために開発された複数の MIE モデルが既に構築されている他、Lhasa でもこのような研究の基盤ともなる別の共同プロジェクトが既に進行中であり、今後の肝毒性モデルの構築時に役立つと考えられる。

E. 結論

本研究では肝毒性について、これまでに開発した RP アラートのうち更に調査すべきアラートの優先順位付けを行い、必要に応じて正式な肝毒性アラートとするための検討を行ってきている。今年度は、未解析 22 種の RP アラートのすべてについて専門家による簡易評価を行った。その結果、フルアラートへの変更の可能性の高い 2 アラートをフルアラートとして作成した一方、8 つの RP は活性の理論的根拠を確立することができないか、同定された toxicophore と活性とに関連性がないと判断してアラートを無効化した。これにより、トレーニングセット化合物群に対する肝毒性の予測精度は、肝毒性の予測において感度 39.5%、特異性は 77.9%となった。昨年に比べて感度が落ちているが、特異性は向上しており、根拠の低いアラートを無効とした結果であると考えられた。本年度の検討により、既存の構造アラートを効果的に利用して関連する毒性メカニズムに基づいた新たなエンドポイントに関するアラートの構築を迅速化できることが実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ema, M., Endoh, K., Fukushima, R., Fujii, S., Hara, H., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Hojo, H., Horimoto, M., Hoshino, N., Hosokawa, Y., Imai, Y., Inada, H., Inawaka, K., Itoh, K., Katsumata, Y., Izumi, H., Kato, H.,

- Maeda, M., Matsumoto, K., Matsuo, S., Matsuoka, T., Matsuura, I., Mineshima, H., Miwa, Y., Nakano, N., Naya, M., Noyori, H., Ohta, T., Oku, H., Ono, A., Shimizu, T., Shimomura, K., Takakura, I., Tanaka, R., Tateishi, T., Tominaga, Y., Uesugi, T., Urakawa, C., Yabe, K., Yamashita, A., Yamauchi, T. and Yokoi, R., Historical control data on developmental toxicity studies in rodents. *Congenit. Anom.* (Kyoto) . 54, 150-161, 2014.
- 2) Kato, H., Fujii, S., Takahashi, M., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. and Hirose, A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluorododecanoic acid in rats. *Environ Toxicol* doi: 10.1002/tox.21996. [Epub ahead of print]
- 3) Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K. and Hirose, A., Evaluation of *in vivo* mutagenicity of hydroquinone in MutaTMmice. *Mutat Res*, 775-776, 94-98, 2014.
- 4) Yamada T, Tanaka Y, Hasegawa R, Sakuratani Y, Yamazoe Y, Ono A, Hirose A, Hayashi M. Development of a category approach to predict the testicular toxicity of chemical substances structurally related to ethylene glycol methyl ether. *Regul Toxicol Pharmacol.* 70, 711-719, 2014.
- 5) 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 平田睦子, 小野 敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦, OECD 化学物質対策の動向 (第 24 報) - 第 3 回 OECD 化学物質共同評価会議 (2012 年ルツェルン), 化学生物総合管理, 10, 25-36, 2014.
- 6) 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 小林克己, 平田睦子, 小野 敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦, OECD 化学物質対策の動向 (第 25 報) - 第 4、5 回 OECD 化学物質共同評価会議 (2013 年パリ、ワシントン DC), 化学生物総合管理, 10, 46-57, 2014.
- 7) 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, OECD 化学物質共同評価プログラム : 第 5 回化学物質共同評価会議概要, 化学生物総合管理, 10, 37-45, 2014.

2.学会発表

- 1) Hirose, A. Fujii, S., Suzuki, T., Kato, H., Kawamura, T., Takahashi, M., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Nishimaki-Mogami, T.,

- Nishimura, T. and Ema, M.
Combined repeated dose toxicity studies with the reproduction/developmental toxicity screening tests for long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国, エジンバラ)
- 2) Hirose, A., Kosugi, Y., Suzuki, T., Fujii, S., Kato, H., Takahashi, M., Kawamura, T., Matsumoto, M., Ono, A. and Hirata-Koizumi, M. Chain length-dependent difference in the toxic potency of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) in rats: Determination of the serum pfca concentrations. DIOXIN2014 (2014.8, スペイン, マドリード)
- 3) Hirose, A., Kosugi, Y., Suzuki, T., Fujii, S., Ema, M., Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. Analysis of the serum perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCAs) levels for repeated-dose toxicity studies conducted for long-chain PFCAs in rats, 第54回米国トキシコロジ学会 (2015.3) (San Diego, California, USA)
- 4) Ono, A., Kobayashi K., Matsumoto, M., Ema, M., Nishimura, T., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A. Initial risk assessment of β -bromostyrene, 第54回米国トキシコロジ学会 (2015.3) (San Diego, California, USA)
- 5) Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamazoe, Y., Ono, A., Hirose, A. and Hayashi, M. Hazard evaluation support system (Hess): Category approach to screen chemicals which are metabolized to methoxy- or ethoxyacetic acid responsible for testicular toxicity. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国, エジンバラ)
- 6) 広瀬 明彦, 藤井 咲子, 鈴木 俊也, 加藤 日奈, 川村 智子, 松本 真理子, 高橋 美加, 平田 睦子, 西村 哲治, 江馬 眞, 小野 敦 : パーフルオロアルキル (C14, C16) カルボン酸の反復投与および生殖・発生毒性. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- 7) 山田 隆志, 長谷川 隆一, 三浦 稔, 櫻谷 祐企, 山添 康, 小野 敦, 広瀬 明彦, 林 真 : 有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) - 精巢毒性に係わるアルコキシ酢酸を生成する化学物質のスクリーニング -. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)

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

平成 26 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

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（H24-化学-指定-010）

分担研究課題：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 総合評価研究室 主任研究官
研究協力者 スイロイ ホセ (株)富士通九州システムエンジニアリング

研究要旨

本研究では、化学構造を指標にした *in vivo* 反復毒性評価手法について検討するため、化学物質の構造や物性の類似性から化学物質をグループ化して、グループの化学物質に類似する毒性を解析し、特定の化学構造にひもづけられる毒性変化の解析、および毒性試験で認められた毒性フェノタイプからの評価モデル構築について検討を進めている。本年度は、毒性フェノタイプからの評価モデル構築の検討として、化審法既存点検により反復投与毒性試験実施済みの化合物について、毒性試験における病理変化とあわせて血液化学及び血液生化学的变化のクラスタリング解析を行い、得られたクラスターのうち毒性学的に意味のあるパラメータセットの変動を示すエンドポイントクラスター化学物質群について共通部分構造の抽出を行い、科学的に妥当と考えられるに共通部分構造の抽出に成功した。しかし、構造記述子をパラメータとして構築した判別モデルでは、外部評価セットにおける一致率は、50% 台に留まった。一方、無毒性量の評価アプローチの検討においては、評価対象を特定の部分構造を有する化学物質群に限定することで精度の高い予測式の構築が可能であることが示唆された。さらに、化学構造全体の類似度と無毒性量との関係を解析した結果、類似度 70%以上の化学物質について無毒性量が得られていれば無毒性量の評価がある程度可能であることが示され、結果をもとに類似度からの無毒性量の予測信頼限界を示す関係式が導出出来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、我が国の化学物質審査規制法では、良分解性物質や

10t 未満の物質（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は不要とされているが、そうした物質であっても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、従来、

動物を用いた安全性試験により行われているが、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、特に構造が類似する化学物質群については、既に安全性評価が実施済みの、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。

本研究は、特に *in vivo* 反復投与毒性の評価における化学構造からの *in silico* 評価の実用化に向けて、有用性が期待される幾つかのアプローチによる評価モデル構築を行い、信頼性や適用範囲等についての検証を行い、化学物質の規制管理における実用的な利用法を検討することを目的としている。

本年度は、毒性フェノタイプからの評価モデル構築の検討として、化審法既存点検により反復投与毒性試験実施済みの化合物について、毒性試験で認められた血液化学及び血液生化学的变化についての部分構造及び記述子からの特徴抽出及び判別モデル構築を試みた。一方、無毒性量の評価アプローチの検討においては、化学構造類似度と無毒性量との関係の解析及び評価対象構造を限定した評価予測性の検討を行った。

B. 研究方法

1. *In vivo* 反復毒性試験における血液化学及び血液生化学的变化をフェノタイプとする構造活性相関モデル構築の検討

1.1 *In vivo* 反復毒性試験における血液化学及び血液生化学的变化のクラスタリング

In vivo 反復毒性試験における重要な毒性評価エンドポイントの一つである血液化学検査及び血液生化学的検査の変動を評価対象とした、化学構造からの予測モデル構築について検討を行うため、まず初めにこれまでの研究で整理した既存化学物質点検による試験結果データベースを用いて血液化学及び血液生化学的变化が有意に認められた用量分布についてパラメータごとに解析を行った。次に血液化学及び血液生化学的变化が有意に認められた最低用量及び病理変化が認められた最低用量をパラメータとしてフェノタイプ及び化学物質のクラスタリング解析を行った。クラスタリングでは $\text{Log}(1,000/\text{最低用量})$ をパラメータとして使用し、変化が認められない項目は、デフォルトで 0 をパラメータとして用い階層化クラスタリング解析を実施した。

1.2 フェノタイプクラスター化学物質の共通部分構造解析及び構造活性相関予測モデル構築

上記のクラスタリング解析において得られたフェノタイプクラスターのうち毒性学的に意味のあると考えられた2つのクラスターについてフェノタイプ変動が認められた化学物質群について共通する化学構造的な特徴について検討を行い、さらに構造記述子や部分構造セットを用いた判別モデルを構築して化学構造からの評価の可能性について検討を行った。本解析には KNIME 2.9.4 を用い、共通部分構造の抽出は、KNIME に搭載されている MoSS

(Molecular Substructure miner) を、判別モデルの構築は LibSVM をそれぞれ用いて実施した。

2 .化学構造類似度と *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の近似性の解析

これまでの研究で整理した既存化学物質点検による試験結果データベースを用いて化学物質間の構造類似度と無毒性量の近似度について解析した。構造類似度の指標として tanimoto 係数を用い、評価対象となるターゲット物質を選択して、その他の物質について構造類似度と毒性試験で報告された無毒性量の比較を行った。

3 . 特定部分構造を有する化学物質群の *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の化学構造からの予測性の検討

これまでの研究から、化学物質の基本的な物性である logP や分子量と動物実験における無毒性量には、ある程度の関連があることが示唆されたものの、直接予測可能な相関式等を構築するにはいたらなかった。そこで、昨年度までに見出された毒性の強い化学物質群に共通する特徴部分構造の幾つかに着目して、特徴構造を有する化学物質群のみに限定して基本的物性と無毒性量の相関性について検討を行った。解析では各部分構造について 10 以上の化学物質について毒性試験結果が得られている部分構造を評価対象とした。

C. 研究結果

1 . *In vivo* 反復毒性試験における血液化学及び血液生化学的变化をフェノタイプとする構造活性相関モデル構築の検討

1 . 1 *In vivo* 反復毒性試験における血液化学及び血液生化学的变化のクラスタリング

血液化学及び血液生化学的变化のクラスタリングを実施するに先立って、それらの変化が起こる投与量について確認する目的で、既存物質点検データベースをもとに血液学的検査及び血液生化学的検査のパラメータごとに変化が認められた被験物質投与量をプロットした結果を図 1、2 に示した。血液学的検査では、RBC, Hct, Hgb の変化が他に比べ低い用量域で認められた。一方、血液生化学的变化については、いずれにおいても同様の用量域で変化が認められた。

次に昨年度解析を行った病理変化も含め血液化学及び血液生化学的变化について、それぞれの化学物質で変化が認められた最低用量をパラメータとして化学物質と毒性変化の関係を階層クラスタリング解析した結果を図 3 に示した。クラスタリングの結果、幾つかのフェノタイプクラスターで特徴的に変化する化合物群があることが示唆された。

1 . 2 フェノタイプクラスター化学物質の共通部分構造解析及び構造活性相関予測モデル構築

上記のフェノタイプクラスタリング結果より、毒性学的に意味のあるフェノタイプの変動により特徴づけられる 2 つのフェノタイプクラスターを得た。そこでまず初めに、これらの 2 つのフェノタイプクラスターの変動が認められる化学物質群について、共通部分構造の抽出を試みた。図 4,5 にフェノタイプクラスターのみ絞り込んだ再クラスタリング結果と抽出された共通部分

構造をそれぞれ示す。図 4 のフェノタイプクラスターは、TP, Cho, Alb の上昇とともに肝肥大が認められ、脂質代謝への影響により肝肥大する化学物質を特徴づけるクラスターと判断された。特徴部分構造として、多種のアルキルベンゼン骨格が抽出された。一方、図 5 は RBC, Hct, Hgb の低下に特徴づけられる貧血を惹起する化学物質を特徴づけるクラスターと判断され、特徴部分構造として、アニリン骨格が抽出された。次にそれぞれのクラスターでパラメータ変動が認められた化学物質を陽性として、その他の化学物質を陰性として予測する判別モデルの構築を試みた。モデルの予測精度の判定のため、ランダムサンプリングにより一部（20%）の物質を検証用として、残りの物質を学習セットとしてモデル構築を行い、検証用物質の評価を実施した。その結果、構築された判別モデルの予測率は学習セットについてはほぼ 100%であったが、評価用セットについては、50%程度の予測率に留まった。

2 .化学構造類似度と *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の近似性の解析

既存物質点検データベースからランダムに 1 物質を選択し、それを評価対象物質とした場合の他のデータベース登録物質の構造類似度と無毒性量の関係について解析を行った結果の代表例を図 6 に示した。図 6A, 6B の結果より類似度が 70%を超える物質の無毒性量は、評価対象物質と近似するのに対して、図 6C, 6D の結果より、構造類似度が 50%以下の物質では、無毒性量の近似は認められず、構造類似度からの無毒性量の予測には利用出来ないことが示された。

3 . 特定部分構造を有する化学物質群の *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の化学構造からの予測性の検討

これまでに研究から、毒性の強い化学物質群に共通する特徴部分構造を有する化学物質群について、化学物質の無毒性量と構造から計算される脂溶性指標である LogP との相関性の解析結果の代表例を図 7 に示す。結果は、解析を行った一部の部分構造についての結果ではあるが、これまでの解析では、多様な構造の化学物質について一括して評価を実施していたため明確な相関関係は得られなかったが、構造の絞り込みを行うことで LogP と無毒性量の相関性が示されたことから、これらの部分構造を有する化学物質については LogP からの無毒性量評価の可能性が示された。

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から推定評価するための構造活性相関手法のリスク評価における実用化に向けて、有用性が期待されるアプローチについて検証を行い、有効な利用法について検討を進めた。

本研究に先立つ研究においては、既存化学物質点検で得られた毒性試験結果をもとに、多くの物質の毒性標的臓器である肝毒性や腎毒性など臓器ごとの毒性発現の有無を評価対象として評価モデルを構築して予測精度の検証を進めてきた。

一方、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。

そこで本研究では、反復投与毒性の化学構造からの評価について、毒性フェノタイプについての予測評価と無毒性量の予測評価の両面からのアプローチについて検討を進めてきた。

毒性フェノタイプの評価においては、これまで病理変化を対象とした解析を行い、肝臓の病理所見を分類した判別モデルの構築により精度の向上が示されたことから毒性メカニズムの分類による構造からの予測の可能性が示唆された。しかし、他の臓器では病理所見ごとの化合物数が少なく、予測モデル構築は難しい。そこで、本年度は血液化学検査や血液生化学検査における毒性変化の構造的特徴の抽出及びモデル構築について検討を行った。通常、血液化学検査や血液生化学的検査の検査項目の変動は、独立に統計検定が行われるものの、毒性評価においては多くの場合、関連する複数のパラメータの組み合わせにより毒性プロファイルの評価が行われる。そこでまず、構造活性相関モデル構築のターゲットとなる陽性及び陰性化学物質群を選択するため臓器を選択する目的で、これまでの研究で整理した既存化学物質点検による試験結果データベースを用いて血液化学及び血液生化学的变化を病理変化とあわせてクラスタリング解析を行った結果、毒性評価においてもそれぞれ関連する項目として評価される脂質代謝に関わる項目や貧血症状を示す項目がクラスターとして抽出された。これらをフェノタイプクラスターとして変動の認められた化学物質について共通部分構造の

抽出を行った結果、脂質代謝異常については、アルキルベンゼン骨格が、貧血についてはアニリン骨格が抽出された。これらの結果は、おおよそ既知ではあるが、本解析アプローチの妥当性及び有用性を示していると考察された。一方、これらのフェノタイプクラスターについて判別モデルを構築して評価を行った結果では、外部評価セットの一致率は、50%台に留まった。外部評価セット評価精度が高くない原因として、判別モデル構築に用いた構造記述子の不適合もしくは、データセットの不足なども考えられるが、血液化学的検査や血液生化学検査の結果を判別モデルで評価することは困難であり、むしろ関連する特徴部分構造による評価のほうが有用であると考察された。今後は、今回対象とした以外のフェノタイプクラスターについても検討を実施する。

一方、無毒性量の評価については、これまでに毒性の強い化学物質群に共通する部分構造が見出され、部分構造をもとに決定木型の判別モデルを構築することによりある程度の分類が可能であることが示されている。これまでの解析では、既存化学物質点検データベースとして整理を行った多様な化学物質全てを解析対象として検討を進めてきた。本年度の解析結果から、対象物質の無毒性量については、構造類似度が高い化学物質の情報からの予測評価の可能性及び特定の部分構造を有する化学物質に限定した予測評価式構築の可能性が示された。構造活性相関の原理は、類似物質について既知の情報から評価対象の物質について評価を行うことであり、今回の結果は構造類似物質の情報の無い化学物質についての化

学構造からの評価は難しいことを示すものであると考察される。これまでに得られた結果から、構造類似度からの評価や特定の部分構造からの評価モデルについて適用範囲を明確化し、それぞれの評価モデルの適用範囲であると評価された化学物質について評価を行うことで、適用範囲の化学物質についてのみではあるが、実用的な評価が可能になるとともに、さらに、適用範囲の異なる複数のモデルを構築し組み合わせることにより多くの化学物質についての評価を可能にする評価スキームの構築が可能であると考えられる。

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(定量的)構造活性相関((Q)SAR)手法やカテゴリーアプローチの化学物質リスク評価における実用化を目的として、それぞれについてレギュレーションへ適用可能な手法を構築および改良を行うとともに、最終的に得られた成果をもとにした評価ストラテジーの提案を行うことを特色としている。反復毒性については、これまでのところカテゴリーアプローチによる評価例はあるものの、国際的に認められる信頼性の高い構造活性相関による評価手法は提案されていない。*in vivo*における毒性変化は様々なメカニズムにより引き起こされるためそれら全てを単一の評価モデルで評価を行うことが困難であるためと考えられる。

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、信頼出来る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た。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今後の課題である。少なくとも現時点では、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。また、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については、化学構造のみで評価を行うのではなく、毒性発現メカニズムに立脚した *in vitro* 試験や少数例の動物試験との組み合わせによる評価手法の検討も重要である。

F. 研究発表

- 論文発表
 - 1) Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamazoe, Y., Ono, A., Hirose, A., Hayashi, M.: Development of a category approach to predict the testicular toxicity of chemical substances structurally related to ethylene glycol methyl ether., *Regul Toxicol Pharmacol*, 70:711–719, 2014.
 - 2) Kobayashi, K., Pillai, K., Michael, M., Cherian, K., Ono, A.: Transition of Japan's statistical tools by decision tree for quantitative data obtained

- from the general repeated dose administration toxicity studies in rodents, *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3:507–520, 2014.
- 3) Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K., Hirose, A.: Evaluation of *in vivo* mutagenicity of hydroquinone in Muta™ mice., *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 775-776:94–98, 2014.
 - 4) Ema, M., Endoh, K., Fukushima, R., Fujii, S., Hara, H., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Hojo, H., Horimoto, M., Hoshino, N., Hosokawa, Y., Imai, Y., Inada, H., Inawaka, K., Itoh, K., Katsumata, Y., Izumi, H., Kato, H., Maeda, M., Matsumoto, K., Matsuo, S., Matsuoka, T., Matsuura, I., Mineshima, H., Miwa, Y., Nakano, N., Naya, M., Noyori, H., Ohta, T., Oku, H., Ono, A., Shimizu, T., Shimomura, K., Takakura, I., Tanaka, R., Tateishi, T., Tominaga, Y., Uesugi, T., Urakawa, C., Yabe, K., Yamashita, A., Yamauchi, T., Yokoi, R.: Historical control data on developmental toxicity studies in rodents., *Congenit Anom (Kyoto)*, 54:150–161, 2014.
 - 5) Takahashi, M., Ishida, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Hirose, A.: Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats., *J Toxicol Sci*, 39:97–108, 2014.
- 2 . 学会発表
- 1) A. Hirose, M. Hirata-Koizumi, A. Ono, Y. Kosugi, T. Suzuki, S. Fujii, M. Ema and T. Nishimura :Analysis of the Serum Perfluoroalkyl Carboxylic Acids (PFCAs) Levels for RepeatedDose Toxicity Studies Conducted for Long Chain PFCAs in Rats. Society of Toxicology 54th Annual meeting (2015.3, San Diego, USA)
 - 2) A. Ono, K. Kobayashi, M. Matsumoto, M. HirataKoizumi, A. Hirose, M. Ema and T. Nishimura :Initial Risk Assessment of β -Bromostyrene. Society of Toxicology 54th Annual meeting (2015.3, San Diego, USA)
 - 3) T. Yamada, Y. Tanka, R. Hasegawa, Y. Sakuratani, Y. Yamazoe, A. Ono, A. Hirose and M. Hayashi :Hazard Evaluation Support System (HESS): Development of a Category Approach to Predict the Testicular Toxicity of Chemical Substances Structurally Related to Ethylene Glycol Methyl Ether. Society of Toxicology 54th Annual meeting (2015.3, San Diego, USA)
 - 4) A. Ono :Toxicogenomics as alternative of traditional toxicological endpoints. Korean Society for Alternatives to Animal Experiments 11th Annual Meeting (2014.11, Korea)

- 5) A. Hirose, S. Fujii, T. Suzuki, H. Kato, T. Kawamura, M. Takahashi, M. Matsumoto, M. koizumi null, A. Ono, T. Nishimaki-Mogami, T. Nishimura and M. Ema :Combined repeated dose toxicity studies with the reproduction/developmental toxicity screening tests for long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in rats. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国,エジンバラ)
- 6) T. Yamada, Y. Tanaka, R. Hasegawa, Y. Sakuratani, Y. Yamazoe, A. Ono, A. Hirose and M. Hayashi :Hazard evaluation support system (Hess): Category approach to screen chemicals which are metabolized to methoxy-or ethoxyacetic acid responsible for testicular toxicity. The 50th EUROTOX2014 (2014.9, 英国,エジンバラ)
- 7) A. Hirose, Y. Kosugi, T. Suzuki, S. Fujii, H. Kato, M. Takahashi, T. Kawamura, M. Matsumoto, A. Ono and M. Hirata-Koizumi :Chain length-dependent difference in the toxic potency of long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) in rats: Determination of the serum pfca concentrations. DIOXIN2014 (2014.8, スペイン,マドリッド)
- 8) A. Ono, M. Takeyoshi, Y. Maeda, N. Suzuki, H. Kojima, S. Takeuchi, J. Hong, H. Lee, A. Vinggaard, J. Odum, S. Laws and H. Kojima : Inter-laboratory validation study of Androgen receptor stably transfected transcriptional activation (STTA) assay for new OECD test guideline. The 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2014.8, プラハ、チェコ)
- 9) 広瀬 明彦, 藤井 咲子, 鈴木 俊也, 加藤 日奈, 川村 智子, 松本 真理子, 高橋 美加, 平田 睦子, 西村 哲治, 江馬 眞, 小野 敦 :パーフルオロアルキル (C14, C16) カルボン酸の反復投与および生殖・発生毒性. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- 10) 山田 隆志, 長谷川 隆一, 三浦 稔, 櫻谷 祐企, 山添 康, 小野 敦, 広瀬 明彦, 林 真 :有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) - 精巣毒性に係わるアルコキシ酢酸を生成する化学物質のスクリーニング -. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- 11) 小野 敦 :トキシコゲノミクスによる肝毒性バイオマーカー. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7, 神戸)
- 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

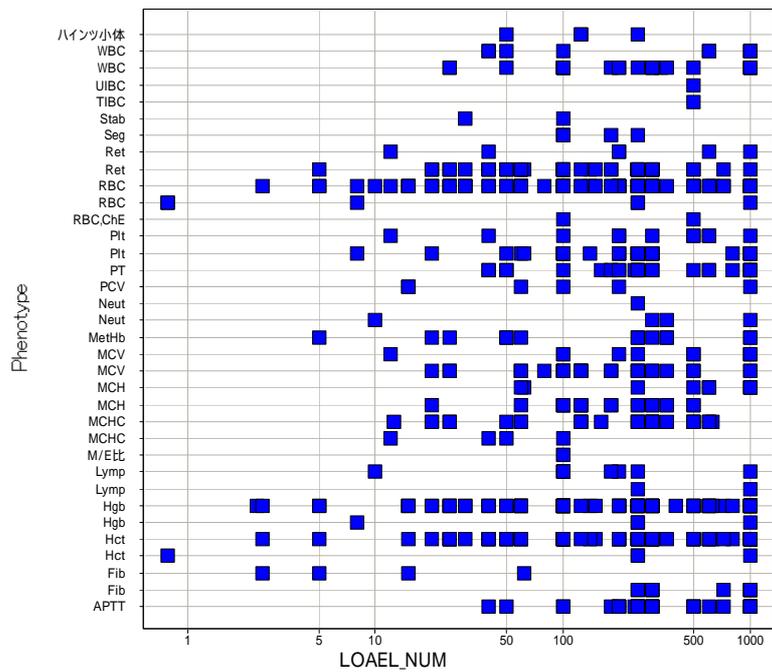


図 1 血液学的検査のパラメータに変化が認められた被験物質投与量

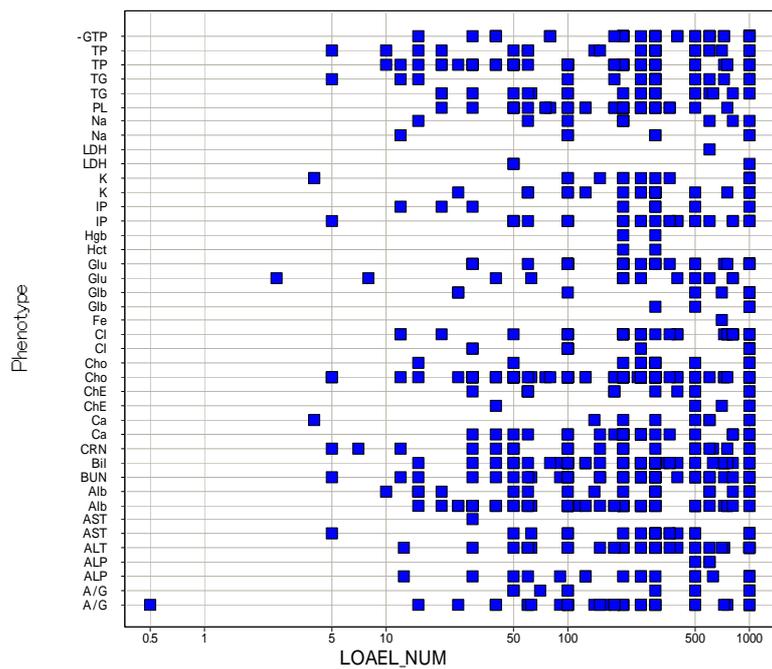


図 2 血液生化学的検査のパラメータに変化が認められた被験物質投与量

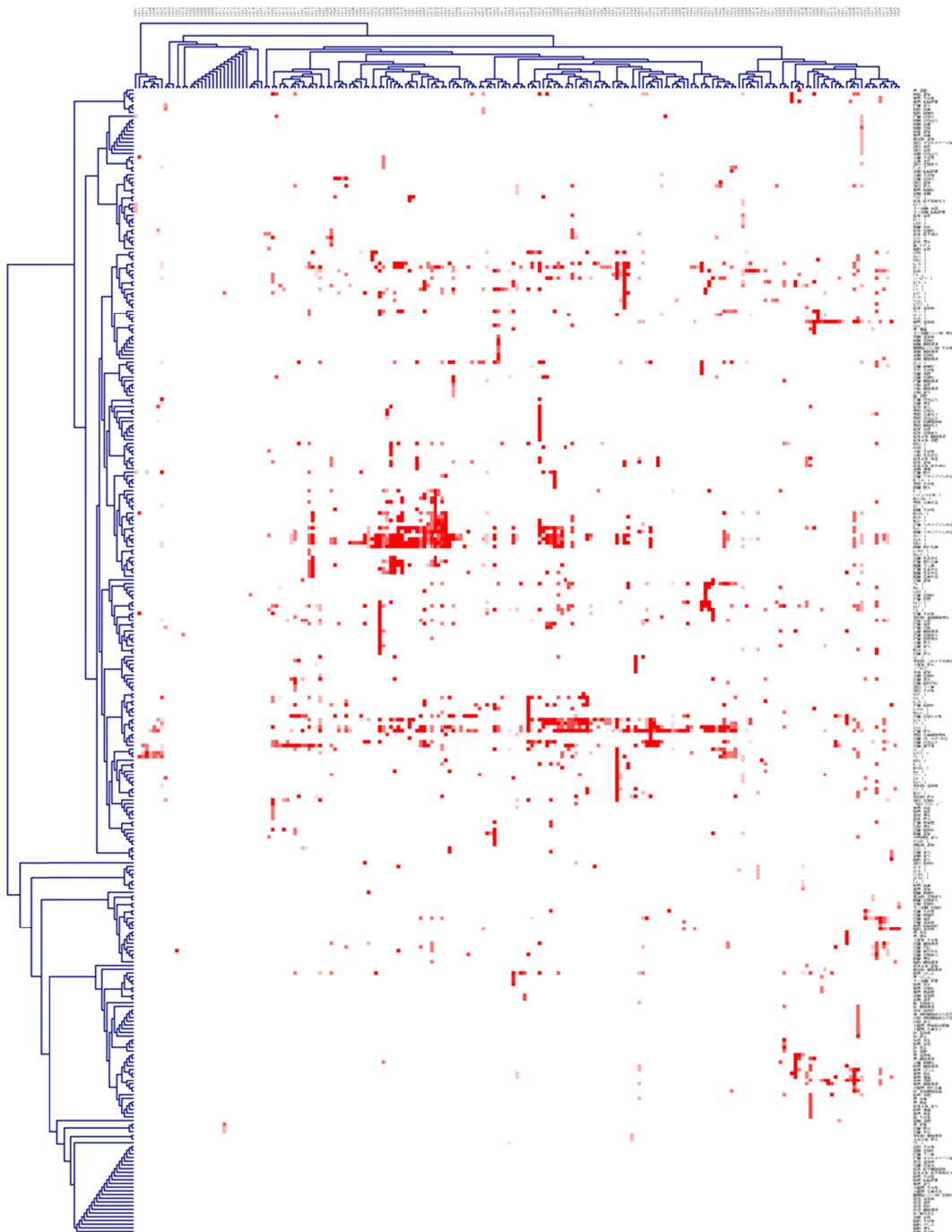


図 3 病理変化、血液化学及び血液生化学的变化の階層クラスタリング解析結果

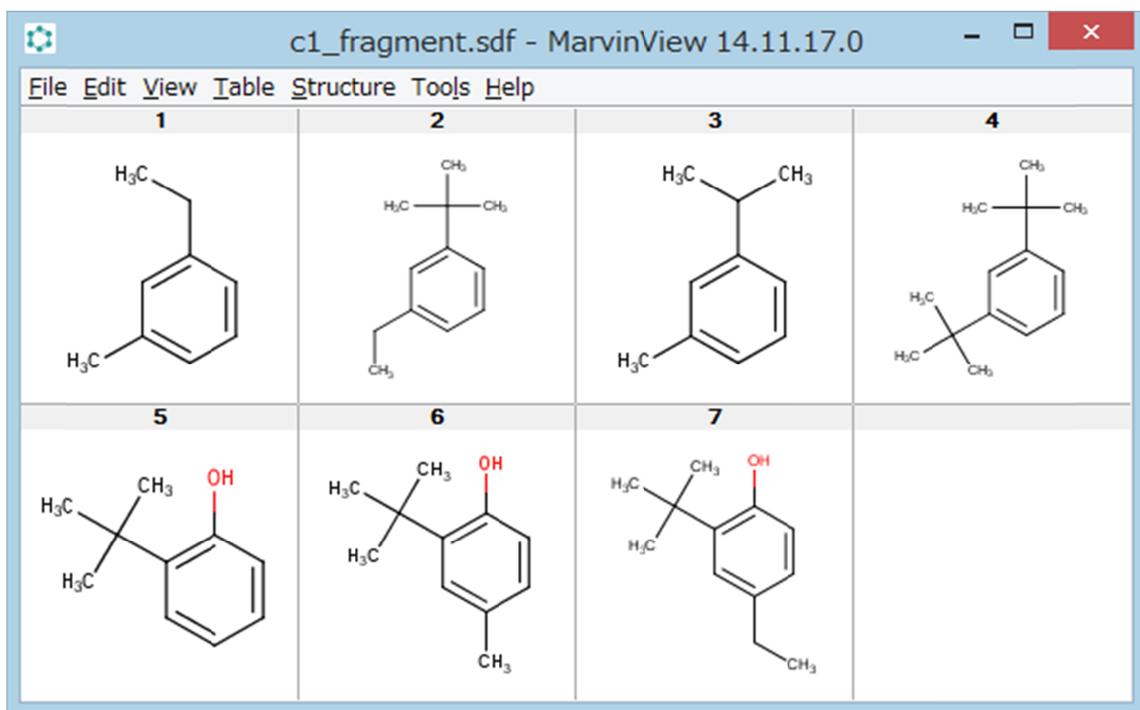
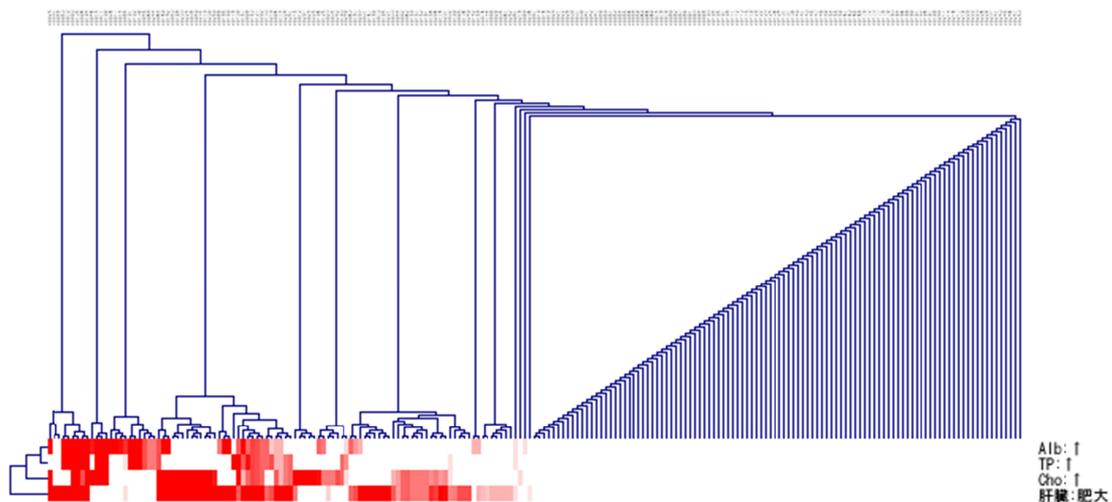


図4 脂質代謝異常を主徴とするフェノタイプクラスター（上図）と共通部分構造（下図）

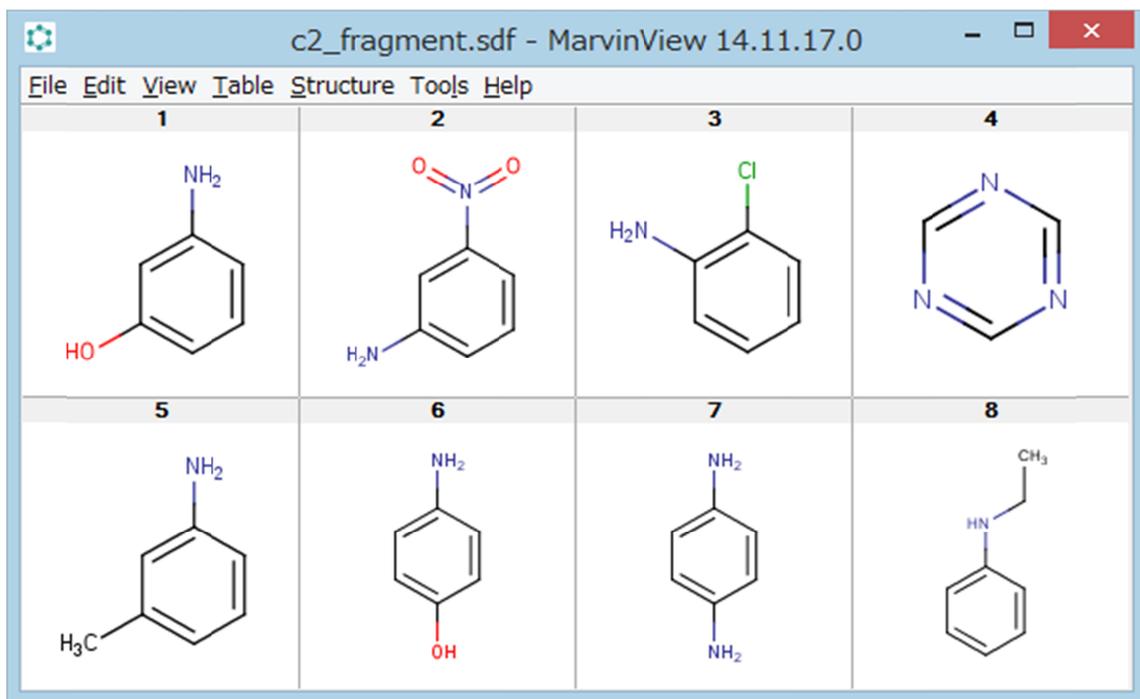
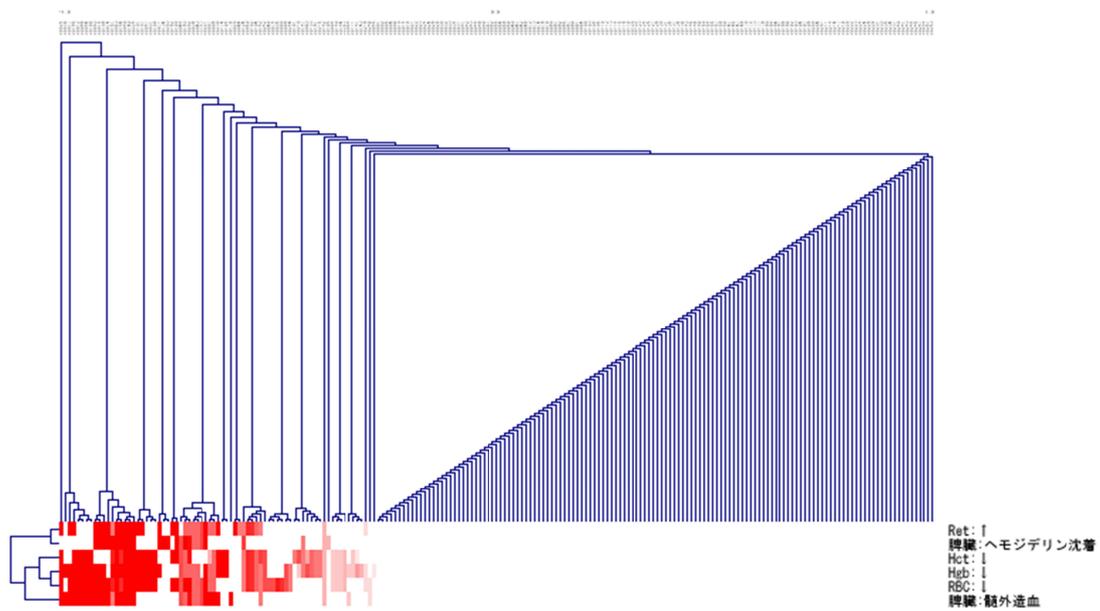


図5 貧血を主徴とするフェノタイプクラスター（上図）と共通部分構造（下図）

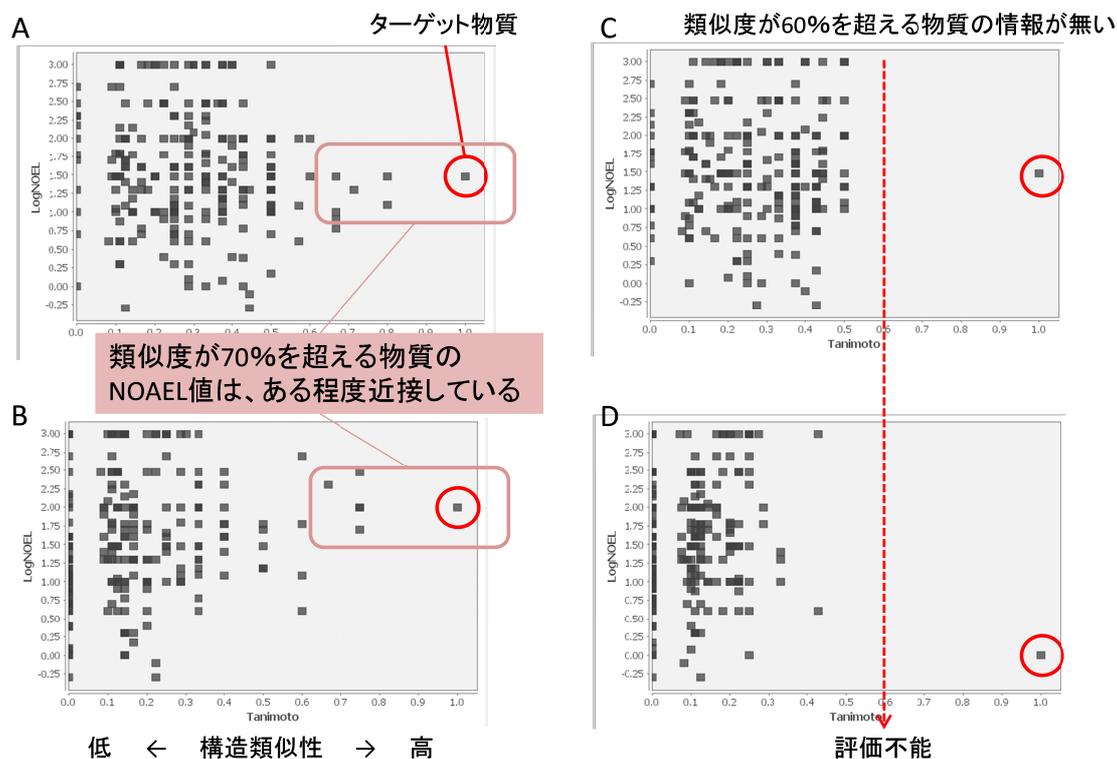


図6 化学構造類似度と *in vivo* 反復毒性試験における無毒性量の近似度の関係

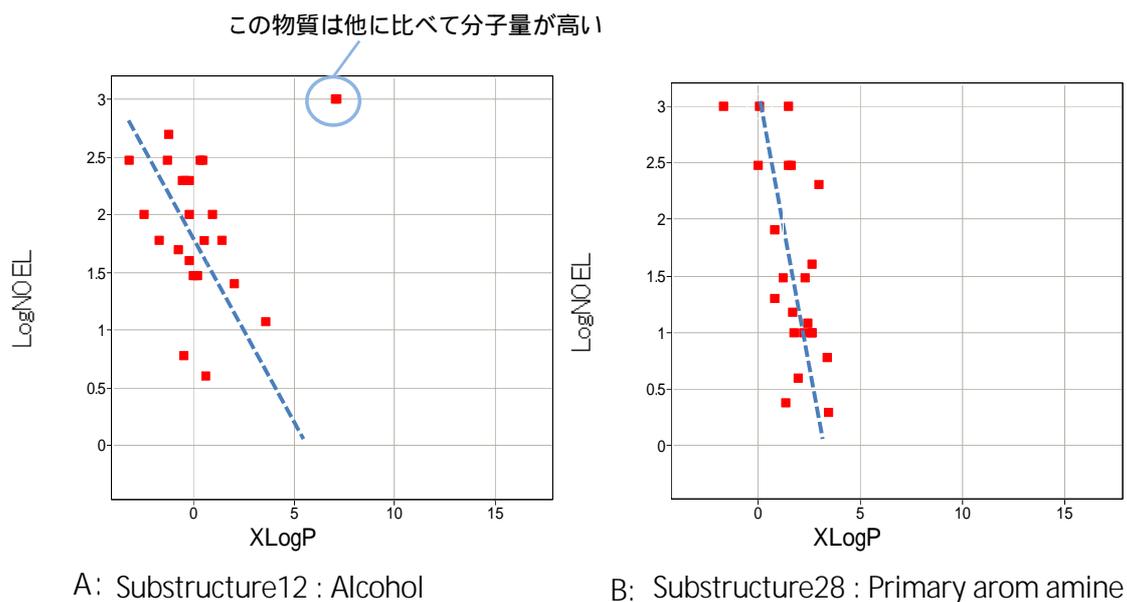


図7 毒性に関連する共通部分構造を有する化学物質群における LogP と無毒性量の相関性

平成 26 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

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（H24-化学-指定-010）

分担研究課題：類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究

研究分担者 吉田 緑国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室 室長

研究要旨

平成 24 年度の本研究において日本で評価された農薬の毒性について公表データを基に構造別に分類し、201 農薬のうち 145 農薬を構造別に 26 の系に分類し、平成 25 年度はその結果を応用して化学構造から懸念される神経毒性について解析した。平成 26 年度も平成 24 年度の解析結果を応用し、生殖器毒性・発がん性の予測に取り組んだ。特にヒトへの外挿性が高いと考えられる子宮癌について、子宮内膜腺癌が増加した農薬を抽出し、各剤の既知情報から考えられる発がん機序予測の可否と化学構造および作用機序を解析した。子宮癌はラットの慢性毒性発がん性併合試験のみ計 7 剤で投与により発生頻度が増加した。7 剤のうち 5 剤では機序試験が実施されており、このうち化学構造の異なる 4 剤では機序試験から発がん機序が予測できた。機序試験が実施されていない 2 剤は構造、作用機序および毒性プロファイルが類似していたが、発がん機序は予測できなかった。これらの結果から、子宮発がん性機序予測には機序試験が重要であることが確認された。 今回の結果と既知情報を基に子宮発がん機序予測のためのフローチャートを作成した。しかし今回の検索結果から化学構造の類似性により子宮発がん機序を予測することはできなかった。

A . 研究目的

反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究および反復投与毒性予測モデル構築のための毒性情報の評価と数値化に関する研究の一環として、既存及び新規化学物質の短期毒性試験から得られた病理学的所見の分類およびシソーラスの構築を行ってきた。

本研究では、初年度である平成 24 年度に

201 農薬について、公表毒性試験データを基に構造別に 26 系に分類した結果を応用し、神経毒性に焦点を当てて、構造と毒性について解析を行った。

次年度の 25 年度は前年度の解析結果を応用して神経毒性と化学構造および作用機序について解析した。ヒトへの外挿上重要な毒性所見であるだけでなく、農薬において神経毒性が良く知られている有機リン系、

カーバメイト系殺虫剤が使用されており毒性試験データが得られやすいことから選択した。

最終年度である平成 26 年度は、エストロゲン類を始めとする化学物質で誘発されることが既知の子宮癌を取り上げた。子宮体部癌（子宮内膜腺癌）はヒトにおいても閉経期の女性の悪性腫瘍であり、その主因として閉経期の卵巣ホルモンアンバランスによるエストロゲンが挙げられている[1]。げっ歯類においても同様にエストロゲン類の長期投与や持続発情の連続として示される相対的高エストロゲン状態の持続が子宮癌の重要な因子であることが既知であることから、ラットでの子宮癌誘発は、ヒトへ外挿性のある可能性が高いと考えられている[2]。上記以外の子宮発がん機序として、肝臓などのエストロゲン代謝において DNAadduct 形成に関わる 4-hydroxyestradiol（4HE）を増加させる変調が生じた場合、エストロゲン依存性臓器の腫瘍化を促進する可能性がヒト[3]およびラットで報告されている[4,5]。またヒトでの報告はないものの近年、化学物質投与によるエストロゲンの排泄抑制により血中エストロゲン高値でラットで子宮癌を増加させる可能性が報告された[6]。このように子宮癌は、その機序がヒトと同様の場合が多く、ヒトへの外挿性が高い腫瘍であること、ヒトにおいても重要な腫瘍であると考えられることから、今回同腫瘍を選択した。

B. 研究方法

公表されている約 200 の農薬の報告書を基に、ラットおよびマウスの長期毒性試験

（慢性毒性発がん性併合試験/発がん性試験）で投与により子宮内膜腺癌が増加した農薬を検索した。子宮腫瘍が増加した各剤について、農薬名（common name）、農薬の分類、化学構造の特徴、農薬としての作用機序、毒性プロファイル（急性毒性、毒性の特徴、1 日許容摂取量（ADI）とその設定根拠試験における最小毒性量（LOAEL）と無毒性量（NOAEL）、子宮癌の NOAEL と LOAEL）と評価年を記載した。

また公表データより機序試験の有無についても検索した。まず既知の子宮がん発生機序をタイプ A から E の 5 つに分けた：

タイプ A (図 1)

エストロゲン (E2)/プロゲステロン (P4) 比の増加 (Increased ratio of E2 to P4)

同義語:相対的高エストロゲン状態の持続。

加齢あるいは化学物質投与等の原因により、卵巣からのステロイドホルモンのアンバランスが生じ、P4 産生が E2 に比較して低値である場合、相対的な高エストロゲン状態となる。このような状態は腔スミア像では持続発情、形態学的に卵巣ののう胞状の閉鎖卵胞と黄体が欠如/少数を伴う萎縮、子宮被覆/腺上皮や腔粘膜の扁平上皮化としてとらえられる。

タイプ B (図 2)

エストロゲン作用物質 (Estrogens/chemicals with estrogenic activity)

エストロゲン作用物質の持続投与は子宮癌を増加させる。子宮肥大試験等で子宮肥大が認められればその物質は in vivo エストロゲン作用を示すことが明らかとなる。短期投与の場合、卵巣が存在した状況では

高用量投与でないと性周期の異常など明らかな影響は出にくい。しかし比較的低用量のエストロゲン作用物質の長期投与による組織像は、タイプ A に類似する。

タイプ C (図 3)

P450 薬物代謝酵素誘導によるエストロゲン代謝変調 (Modulation of estrogen metabolism via CYP induction)

血中エストロゲンは肝臓等の代謝器官において、水酸化を受けて代謝される。通常は 2-水酸化酵素によりエストロゲン作用の少ない 2-hydroxyestradiol となるが、CYP1B 等の薬物代謝酵素が誘導された場合は、子宮等に DNA adduct を形成すると報告されている catechol estrogen である 4-hydroxyestradiol へと代謝する 4 水酸化酵素誘導が促進し、その結果子宮癌が増加すると考えられている。このような場合は、肝肥大が認められるが、薬物代謝酵素誘導による肝肥大は、CYP2B 等によっても誘導される最も一般的な指標であるため、エストロゲン代謝が変調していることを直接確認するためには、エストロゲン代謝変調に関わる CYP1B 等の薬物代謝酵素誘導の確認、肝臓中の 2 あるいは 4 水酸化酵素の測定あるいは血中や組織中の 2-あるいは 4-hydroxyestradiol を測定することが最も有効と考えられる。組織学的には雌性生殖器に特に異常は認められない。

タイプ D (図 4)

エストロゲン排泄阻害による血中エストロゲン高値持続

この機序による子宮癌増加の報告は比較的新しい。性周期回帰中であれば baseline

時（発情休止から発情前期以外）の血中ホルモン測定（性周期停止後であれば考慮せず）における E2 の増加が直接的な根拠となりうると考えられる。第 2 相酵素の測定も支持データとなるがこれらの誘導は化学物質全般で一般的に認められるため、E2 増加の直接的根拠とはなりにくいとする。このタイプで相対的高エストロゲン状態であれば、タイプ A と同様の形態学的特徴を示す可能性が推測されるが報告はない。

タイプ E (図 4)

局所におけるアロマターゼ増加

ヒト子宮内膜腺癌内でのアロマターゼ遺伝子増加が報告されていることから、局所におけるアロマターゼ増加が子宮癌を増悪化させる可能性が示唆される。げっ歯類での報告はない。

次にこれらのタイプ分類において重要と考えられる以下の項目について、公表されている機序試験の実施の有無と各項目の検査結果を記載し、どの発がん機序タイプに予測されるかを示した。

1. 肝肥大の有無と肥大のタイプ
2. 肝薬物代謝酵素誘導と誘導される酵素のタイプ
3. エストロゲン代謝酵素測定
4. エストロゲン作用（子宮肥大試験）
5. アロマターゼ測定
6. ホルモン測定および E2/P4 比
7. その他関連項目

これらの結果を総合的に考察し、最終的にげっ歯類子宮がんの機序を評価するためのフローチャートを提案した。

C. 研究結果

検索した農薬において、投与によって子宮内膜腺癌の頻度が 7 化合物において増加し、これらは全てラット慢性毒性発がん性試験併合試験で認められた。農薬名 (common name)、農薬の分類、化学構造の特徴、農薬としての作用機序、毒性プロファイル (急性毒性、毒性の特徴、1 日許容摂取量 (ADI) とその設定根拠試験における最小毒性量 (LOAEL) と無毒性量 (NOAEL)、子宮癌の NOAEL と LOAEL) と評価年を記載した (表 1)。農薬の分類では、殺虫剤が 2 剤、殺菌剤が 3 剤、除草剤が 2 剤であった。農薬としての作用機序の点からは、除草剤のピリミノバックメチル、メタゾスルフロンはアセト乳酸合成酵素 (ALS) 阻害作用、殺菌剤であるイソピラザム、セダキサソおよび殺虫剤シエノピラフェンはミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素阻害剤、殺菌剤のベンチアバリカルブイソプロピルと殺虫剤のスピロジクロフェンは脂質系生合成阻害を有する化合物であった。7 剤の化学構造は、5 剤は異なっていた。2 剤 (イソピラザム、セダキサソ) のみピラゾールカルボキサミド系と類似した化学構造を有していた。

発がん用量の比較において、子宮内膜腺癌の増加は 6 剤で高用量のみに認められた。ADI の設定根拠試験との比較では、差が最も小さい剤がベンチアバリカルブイソプロピルであったが子宮癌が増加した投与量は 318mg/kg 体重以上と大量投与条件下であった。ピリミノバックメチルでは ADI 設定根拠試験との差が 200 倍近かった。

公表された機序試験から得られたデータ

を基に子宮発がん機序がタイプ A から E のいずれに分類可能か予測した結果を表 2 に示す。その結果、多くのメカニズム試験が公表されているピリミノバックメチルとスピロジクロフェンがタイプ A の相対的高エストロゲン状態の持続、シエノピラフェンとベンチアバリカルブイソプロピルがタイプ C の肝臓エストロゲン代謝変調を介したカテコールエストロゲン産生が子宮内膜腺癌増加に関連していると予想された。一方メタゾスルフロンは繁殖毒性試験で通常観察されない膈開口早期化が認められたことから何等かのホルモン様作用を有することが示唆されたが、機序試験でエストロゲン活性やエストロゲン受容体結合能を有しないことから、いずれのタイプの機序も予想することはできなかった。イソピラザムについては機序試験結果よりエストロゲン活性やエストロゲン受容体結合能はないと考えられ、類似構造を有するセダキサソでは子宮発がん機序試験が実施されていないことから、両剤についても発がん機序予測することはできなかった。しかし両剤の毒性プロファイルは肝肥大や甲状腺への影響等多くの類似点が認められた。

既知のげっ歯類子宮発がん機序に有用と考えられる薬物代謝酵素、エストロゲン代謝、エストロゲン活性、アロマターゼ測定、E2 や P4 測定、毒性試験からの情報等と今回予測を行った 7 剤を基に、げっ歯類子宮がんの機序を評価するためのフローチャートを作成した (図 5)。

D. 考察

ラットの子宮発がん作用機序として、エストロゲン作用、持続的な相対的高エ

ストロゲン状態の持続、あるいは肝臓におけるエストロゲン代謝変調によるカテコールエストロゲンの産生の3つの経路が知られている。今回検索した7剤中5剤については機序試験が実施され、そのうち各2剤が相対的高エストロゲン状態の持続およびエストロゲン代謝変調によるカテコールエストロゲンの産生であったことから、これら4剤の試験では適切な機序試験が実施されていると判断され、長期毒性試験で発がん性が認められた場合の適切な機序試験の実施が発がん機序予測さらにはヒトへの外挿性予測のためには重要であると結論した。

一方、今回の検索結果より化学構造から子宮発がん機序を予測することはできなかった。しかし興味ある点として、化学構造が類似していた2剤では適切な機序試験が実施されていないために発がん機序を予測することはできなかったが、毒性のプロファイルも類似していることから同様の機序により子宮内膜腺癌が増加した可能性が示唆された。

げっ歯類子宮がんの機序を評価するためのフローチャートについては、さらに多くの剤の機序試験を用いて検証するだけでなく、毒性学的な知見を加えることにより、予測性の高いものになると考えられる。

E. 結 論

子宮内膜腺癌が誘発された剤は7剤であった。発がん機序試験が提出された5剤中4剤で既知の発がん機序の予測が可能であり、適切な機序試験の重要性が確認された。化学構造の類似性による子宮発がん機序予測はできなかった。子宮発がん機序を予測

するフローチャートを作成することができた。

参考文献

1. Sherman NE. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Modern Pathol.* 13: 295-308. 2000.
2. Maekawa A, Takahashi M, Ando J, Yoshida M. Uterine carcinogenesis by chemicals/hormones in rodents. *J Toxicol Pathol.* 12: 1-11. 1999
3. Liehr JG, Ricci MJ, Jefcoate CR, Hannigan EV, Hoakanson JA, Zhu BT. 4-Hydroxylation of estradiol by human uterine myometrium and myoma microsomes: implications for the mechanism of uterine carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 9220-9224. 1995.
4. Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17 beta-estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis.* 21: 1593-1599. 2000.
5. Yoshida M, Katashima S, Ando J, Tanaka T, Uematsu F, Nakae D, Maekawa A. Dietary indole 3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N'-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of

estrogen metabolism. Carcinogenesis.
11: 2257-2264. 2004.

6. Knunsen GA, Sanders JM, Sadik AM, Birnbaum LS. Disposition and kinetics of tetrabromobisphenol A in female Wistar Han rats. Toxicol Rep. 1:214-223. 2014.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Midori Yoshida, Kaoru Inoue, Miwa Takahashi. Predictive MOAs of uterine adenocarcinoma development induced by pesticides. SOT2015 (San Diego, March 2015)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

特許取得・ 実用新案登録 なし

図 1 既知の子宮癌の発がん機序タイプ A 相対的エストロゲン高値の持続を起す化合物

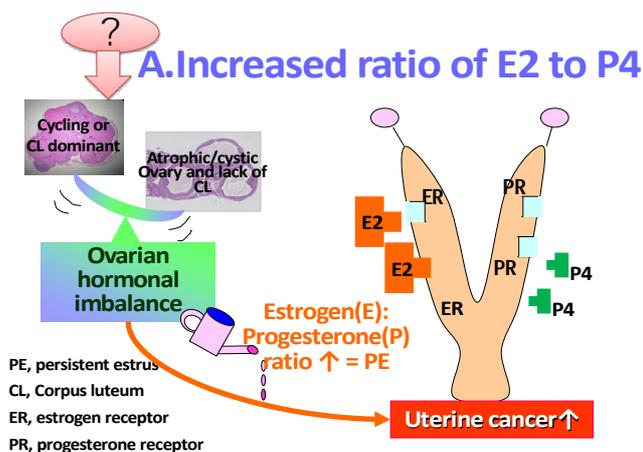


図 2 既知の子宮癌の発がん機序タイプ B エストロゲン作用がある化合物

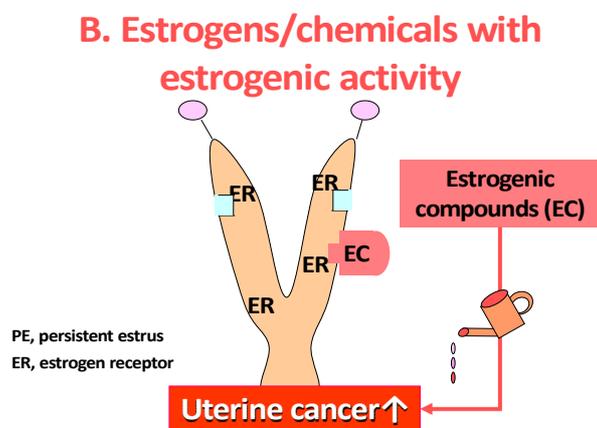


図 3 既知の子宮癌の発がん機序タイプ C 薬物代謝酵素によるエストロゲン代謝変調を起しカテコールエストロゲン産生を促進する化合物

C. Modulation of estrogen metabolism via CYP induction

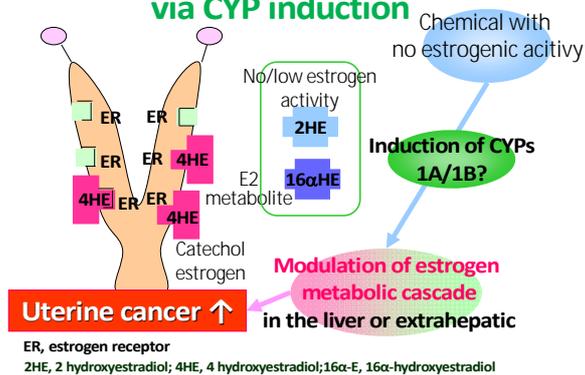


図 4 その他の子宮がん機序として考えられているもの

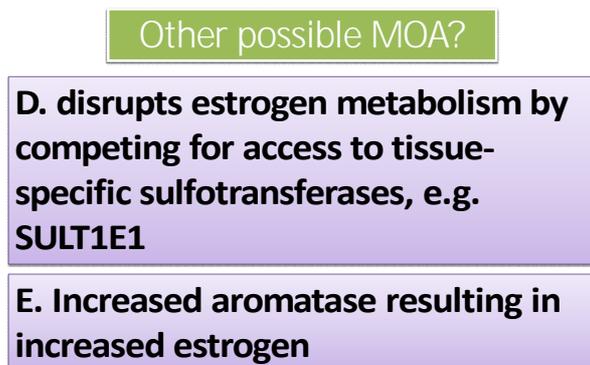


図 5 子宮がん機序予測フローチャート

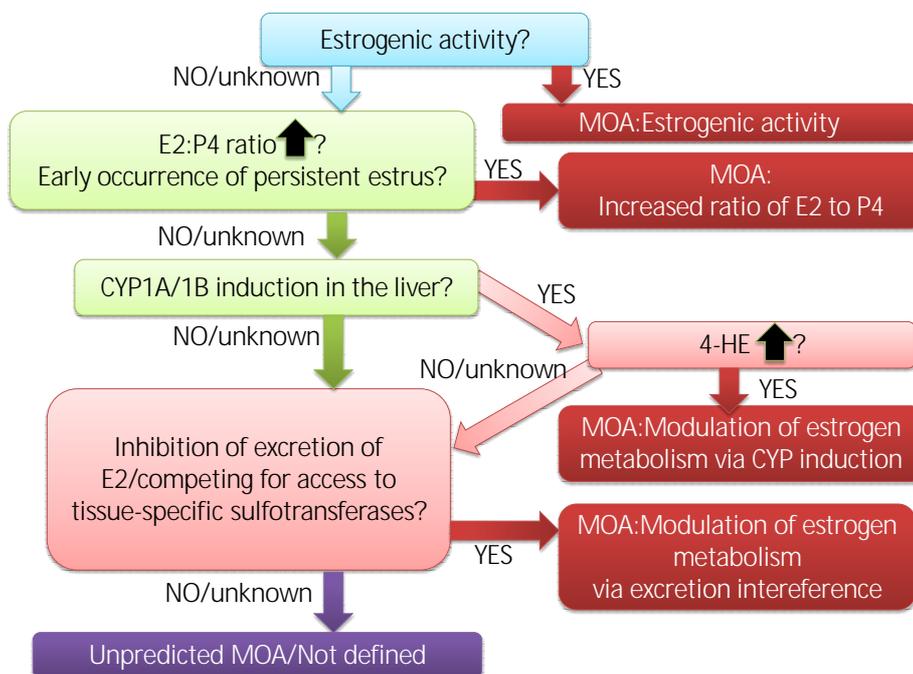


表1 子宮癌の増加が認められた7剤の化学構造、作用機序および毒性プロファイル

農薬名(和名)	農薬名(英名)	CAS	分類(殺虫剤、殺菌剤、除草剤、植物成長調整剤、殺鼠剤)	剤の特徴	植物・昆虫・細菌への作用機序	たい		LD50 ラット経口投与、複数ある時は一番低いもの mg/kg bw	Setting ADI				動物種(ラット、R.マウス、M.イヌ、D.ウサギ、Rb)	ADI設定根拠の値が他の試験よりも高い	子宮癌		
						標的臓器・組織	毒性の特徴		ADI (mg/kg bw)	Lowest NOAEL (mg/kg bw per day)	Lowest LOAEL (mg/kg bw per day)	設定根拠となる毒性所見			試験名	NOAEL	LOAEL
ピリミノバクメチル	英名: pyriminobac-methyl	136191-64-5	草	ヘテロ系、(ピリミジンカルボキシ系)(安息香酸系)除草剤	ALS阻害。アセト乳酸合成酵素(ALS)の阻害	肝臓、腎臓、血液(ラット)、発がん性	貧血(ラット)、ラットでLGL白血病、雄ラットで肝細胞癌腫、雌ラットで子宮腺癌、雌マウスで肝細胞癌腫	1,850	0.02	2	36	親動物: 体重増加抑制等 児動物: 低体重	繁殖2世代	R		372	777
シエンピラフェン	英名: cyenopyrafen	560121-52-0	虫	ピラゾール系殺虫剤	ミトコンドリアの電子伝達複合体の阻害。既存の殺ダニ剤と違い、体内の代謝により生成するシエンピラフェンの加水分解物が電子伝達複合体に作用し、コハク酸からコエンザイムQへの電子の流れを非拮抗的に阻害することで、ハダニ類の細胞内呼吸を強く攪乱すると考えられている。	肝臓、腎臓、子宮、網膜、発がん性	小葉中心性肝細胞肥大等、腎皮質尿細管褐色色素沈着等、子宮内膜過形成等、眼球網膜萎縮、ラットで子宮腺癌	>5,000	0.05	5.15	10450	雄: 腎及び肝比重量増加等 雌: 甲状腺の上皮細胞過形成等、子宮内膜癌 母動物: 体重増加抑制 胎児: 毒性所見なし	慢性毒性/発がん性併合: 2年間 発生毒性: 23日	R Rb		1.2	124
ベンチアバリカルブイソプロピル	英名: benthiavali carb-isopropyl	177406-68-7	菌	カーバメイト系(アミノ酸アミドカーバメイト系)殺菌剤	リン脂質の生合成系阻害	肝臓、甲状腺、血液、発がん性	肝細胞肥大等、甲状腺(る)上皮細胞過形成)、貧血、ラット雄で肝細胞癌腫、雌で子宮腺癌が、マウス雄で肝細胞癌腫、雄で甲状腺る細胞癌腫、肝芽細胞腫及び肝細胞癌	>2,000	0.069	6.9	68.5	親動物: 肝細胞肥大等 児動物: 肝絶対重量増加	繁殖2世代	R			
メタゾスルフロン	英名: metazosulfuron	868680-84-6	草	スルホニルウレア系の水稲用除草剤	ALS阻害。分枝アミノ酸合成の鍵酵素であるアセト乳酸合成酵素(ALS)阻害により雑草を枯死させると考えられている	体重、肝臓、血液	体重増加抑制、肝細胞肥大、貧血	>2,000	0.12	12	30	雄: MCHC減少、低色素性赤血球増加、T.Bil増加等 雌: 嘔吐、運動失調、体重増加抑制、体重及び摂餌量減少等	慢性毒性1年間	D		564	1170
スピロジクロフェン	英名: spirodiclofen	148477-71-8	虫	環状ケトエノール系、テトロン酸誘導体でハダニに広範囲な活性を有する新規構造を有する	脂質生合成を阻害することが明らかにされているが、詳細な作用機構は不明	副腎、生殖器、発がん性	副腎(皮質空胞化)、ライディック細胞肥大、ラット雄でライディック細胞腫、雌で子宮腺癌、マウス雄で肝細胞癌腫、ラットF1世代の雄に生殖器官の萎縮及び精子数減少	>2500	0.013	雄: 1.38 雌: 1.52	雄: 4.33 雌: 4.74	副腎皮質束状帯空胞化	1年間慢性毒性	D		19.9	153
イソピラザム	英名: isopyrazam	881685-58-1	菌	ピラゾールカルボキサミド系殺菌剤	ミトコンドリアの電子伝達複合体の阻害、すなわちコハク酸脱水素酵素を阻害することにより呼吸機能に影響を及ぼし殺菌効果を表す。	体重増加抑制、肝臓、発がん性	体重増加抑制、肝細胞肥大、肝重量増加、好酸性変異肝細胞腫、ラット肝細胞癌腫、ラット子宮癌、ラット繁殖着床数低下、ラット発生毒性骨化遅延に基づく骨格変異、ウサギ発生毒性小眼症	2000	0.055	雄 5.5	雄 27.6	好酸性変異肝細胞腫、小葉中心性肝細胞肥大(雌雄)、GGT、肝細胞空胞化(雄)、TG低下、肝細胞褐色色素沈着(雌)	慢性毒性/発がん性併合: 2年間	R		34.6	233
セダキサキサン	英名: sedaxane	87497-67-6	菌	ピラゾールカルボキサミド系殺菌剤	コハク酸脱水素酵素阻害剤であり、TCAサイクルを阻害して殺菌効果をしめす	体重増加抑制、肝臓、甲状腺、発がん性	体重増加抑制、肝細胞肥大、肝重量増加、ラット子宮癌、ラット甲状腺肥大	>5000	0.11	11	67	肝重量増加、小葉中心性肝細胞肥大、甲状腺る上皮細胞肥大	慢性毒性/発がん性併合: 2年間	R		86	261

表 2 子宮癌が増加した 7 剤の子宮発がん機序に関連する検査項目の結果と結果から予測される子宮癌の発現機序

Common name	Predictable? What MOR is appropriate?	Liver hypertrophy	Parameters in mechanism studies					
			Drug metabolism enzymes in the liver	Estrogen metabolism	Estrogenic activity	Aromatase	Hormonal assay	Others
Pyriminobac-methyl	Predictable, A	Centrilobular hypertrophy	Increases in N-DEM activity, CYP3A2 by IHC	NE	NE	NE	E2 No change; P4 decrease; E/P increase	
Cyenyprafen	Predictable, C	Centrilobular hypertrophy	Increased EROD, PROD, MROD, mRNA(CYP3A, CYP1A1, CYP1B1)	No change of 2-, 4-OH Estradiol, CYP1B1 mRNA No change in the liver and uterus	No	NE	No change	
Benthiavalcab- isopropyl	Predictable, C	Centrilobular hypertrophy	Increased EROD, PROD, MROD, mRNA of CYP3A, CYP1A1, CYP1B1	Increased 2-, 4-OH Estradiol, CYP1B1 mRNA in the LIVER, but not in the uterus	No Uterotrophic assay, Eralpha binding assay	Increase in the liver but not in the uterus	No change	
Metazosulfuron	Not defined	Centrilobular hypertrophy	NE	NE	ER binding assay, Uterotrophic assay; negative; Anti-androgen activity, negative		No change	Early vaginal opening in rat reproductive study
Spirodiclofen	Predictable, A	None	NE	NE	NE	NE	E2,P4, decrease; E/P increase	
Isopyrazam	Not defined	Centrilobular hypertrophy	Increased EROD, PROD (Rat), BrdU increase (rat), BROD(human liver in vitro). No cell proliferation in human hepatocyte in vitro	NE	No Uterotrophic assay, Eralpha binding assay	NE	NE	
Sedaxane	Not defined	Centrilobular hypertrophy	EROD, PROD (Rat)	NE	NE	NE	NE	

NE, Not examined; EROD,7-ethoxyresorufin; O-deethylationPROD, pentoxyresorufin-O-dealkylase; BROD, benzyloxyresorufin-O-dealkylase; MROD, 7-methoxyresorufin O-demethylation

水色のカラム 発がん機序が予測できた剤と、予測に有用であった指標

緑色のカラム 予測できなかった指標

A, 相対的高エストロゲン状態の持続による子宮癌の増加(前述 Fig.1 参照); C,エストロゲン代謝変調による子宮癌の増加(前述 Fig.3 参照)

平成 26 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

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（H24-化学-指定-010）

**分担研究課題：カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究
- ネオニコチノイド系殺虫剤のアセチルコリンエステラーゼ活性阻害作用と構造 -**

研究分担者	帝京平成大学	薬学部	西村 哲治
研究協力者	帝京平成大学	薬学部	深山 俊
研究協力者	帝京平成大学	薬学部	山下 亜紀子

研究要旨

アセチルコリンによる神経伝達機構に影響を及ぼす化学物質に関する検討の一環として、昆虫に対して選択性の高いネオニコチノイド系殺虫剤の神経毒性に関する検討を実施した。

アセタミプリドとイミダクリプリド及びニテンピラムが類似の骨格構造を有し、チアクロプリド、チアメトキサム及びクロチアニジンが類似の骨格構造を有し、ジノテフランが他の2群と異なった構造をもつ。ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性に対するネオニコチノイド系殺虫剤7物質の作用を検討した結果、アセタミプリドが、AChE に対して最も作用が強く、ダイアジノンオキソンと比較して、相対濃度として約 1,150 倍に相当する濃度（1,150 分の1の作用）で AChE の阻害を示した。アセタミプリド（1）に対して、ジノテフランが相対濃度として 0.08 であった他は、0.1~0.3 に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N- の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

当該物質は AChE の酵素に作用して、アセチルコリンの分解を抑制する作用も最大で 1/1,000 ~ 1/10,000 程度ではあるが、0.1~0.3 µg/mL の濃度から示した。個々の物質の評価では、問題とする作用濃度ではないが、類似の基本骨格をもち、側鎖の構造は変化に富み多岐にわたることから、それらの環境に共存する状況における複合暴露については注意を払う必要がある。今後、さらにカテゴリー化を進め、詳細な検討を行うことが重要な課題である。

A. 研究目的

末梢神経系と中枢神経系に大別される神経系は、部位によって特異的で複雑な機能を発現して生体の生理機能を維持しているが、細胞としては主としてニューロンとグリア細胞によって機能を分担しているといえる。ニューロンは、情報を集める、情報を処理する、処理された情報を他の細胞や部位に伝達する、対象とする細胞・組織

等の部位に情報を伝える（作用発現）などの働きを担っている。あるニューロンから素早く他の部位に情報を伝達するために電気的信号伝達機構と、ニューロン間の情報伝達のために化学的信号伝達機構により機能を発揮している。

化学的信号伝達機構は、多種多様な神経伝達物質を用いて情報の伝達を行っている。そのため、多様な情報信号の伝達処理が可能となり、機能の

多様化にも現れている。典型的な化学シナプスは、シナプス前部とシナプス後部との狭いシナプス間隙と呼ばれる領域から成る構造をしており、シナプス前部が情報を得て脱分極すると、シナプス小胞に蓄えられた神経伝達物質の遊離が促される。シナプス間隙に放出された神経伝達物質はシナプス後部に存在する神経伝達物質受容体に結合し、シナプス後部の膜のイオン透過性を変化させることにより、情報の伝達が達成される。これらの過程において、神経伝達物質の合成と蓄積、神経伝達物質の遊離の促進と阻害、神経伝達物質受容体との結合能に対するアンタゴニスト活性とアゴニスト活性、そして神経伝達物質の分解や再吸収などの段階に化学物質が作用することにより、情報伝達機能に影響が及ぶことが考えられる。

ボツリヌス毒素は、運動ニューロンの前終末に取り込まれることにより、アセチルコリンを蓄積している小胞がシナプス前膜との融合に必須なタンパク質を切断する。そのために、シナプス間隙へのアセチルコリンの遊離が阻害されて、神経筋接合部の伝達機能が阻害される。

イオンチャンネル型アセチルコリン受容体（ニコチン受容体）は、自律神経節細胞と骨格筋で構成されているサブユニットがそれぞれ異なり、ヘキサメトニウムは自律神経節細胞のニコチン受容体に、 α -ツボクラリン（クラレー）は神経筋接合部ニコチン受容体にそれぞれ作用することにより、伝達機能を阻害する。

神経伝達物質の再取り込みを阻害することにより、伝達物質がシナプス間隙にとどまる時間を延ばして効果を増強する物質がある。フルオキセチンはセレトニンの、コカインはドパミン等の再吸収を阻害する。

有機リン酸化合物は、アセチルコリンエステラーゼに結合し、シナプス間隙に放出されたアセチルコリンの分解を阻害することにより、骨格筋のシナプス後部の膜にアセチルコリンが長時間留まり、骨格筋は脱分極した状態が継続することになる。その結果、筋繊維は非興奮性の収縮ができなくなることで有害作用を発現する。アセチルコリンは、

ニコチン受容体に作用する、末梢神経系で速い興奮性伝達を担う伝達物質である。ニコチン受容体は、神経筋伝達がおきている骨格筋繊維に多く見られ、自立神経筋細胞にも存在している。

以上のように、化学物質が神経系における情報伝達の作用を及ぼす例が知られている。

本研究では、アセチルコリンによる神経伝達機構に影響を及ぼす化学物質に関する検討の一環として、昆虫に対して選択性の高いネオニコチノイド系殺虫剤の神経毒性に関する検討を実施した。

B. 研究方法

1. ネオニコチノイド系殺虫剤

ネオニコチノイド系殺虫剤であるアセタミプリド（純度98.0%）、イミダクロプリド（純度98.0%）、チアクロプリド（純度98.4%）、ニテンピラム（純度99.0%）、チアメトキサム（純度99.9%）、ジノテフラン（純度99.0%）は和光純薬工業株式会社、クロチアニジン（純度99.5%）はDr. Ehrenstorfer GmbH社から購入した。フィプロニル（純度97.0%）は関東化学（株）、フロニカミド（純度98.0%）は和光純薬工業（株）から購入した。

2. ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性阻害を指標とした評価

アッセイ緩衝液（100 mmol/Lリン酸溶液（pH7.4））50 μ Lを96穴ウエルプレートに加え、ヒトアセチルコリンエステラーゼ（AChE）を含むアッセイ緩衝液溶液 50 μ L、アッセイ緩衝液に溶解した2 mmol/L 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNBと省略) 溶液 50 μ Lと2 mmol/L 1,1-Dimethyl-4-acetylthiomethylpiperidinium iodide (MATP⁺と省略) 溶液を順次加え均一にした。その混合溶液に、アッセイ緩衝液により公比2で希釈した被験物質溶液を50 μ L加え、37 °Cで、60分間保温した。反応後、マイクロプレートリーダー（コロナ電気株式会社製、型式：MTP-810Lab/880Lab）を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

C. 結果および考察

1. ヒトアセチルコリンエステラーゼに対する活性阻害を指標とした評価

ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性に対するネオニコチノイド系殺虫剤7物質の作用を検討した(図2)。

アセタミプリドは、60分間の反応後において1 mg/mL(最終作用濃度;以下同様)で93.8%、0.5 mg/mLで84.2%、0.25 mg/mLで71.6%、0.125 mg/mLで50.5%、0.0625 mg/mLで32.0%、0.03125 mg/mLで19.5%の割合で、AChEの活性を阻害した。一方、有機リン系殺虫剤の一つであるダイアジノンの活性体であるダイアジノンオキシソンの場合には、0.0007 mg/mLの濃度で90%以上の阻害が認められた。アセタミプリドの設定濃度である0.125 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約50%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では約0.11 µg/mLに相当した。

イミダクロプリドは、60分間の反応後において1 mg/mLで45.7%、0.5 mg/mLで56.0%、0.25 mg/mLで30.1%、0.125 mg/mLで17.6%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.5 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約56%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では約0.13 µg/mLに相当した。

ニテンピラムは、60分間の反応後において1 mg/mLで37.1%、0.5 mg/mLで35.2%、0.25 mg/mLで31.2%、0.125 mg/mLで17.8%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約30%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.049 µg/mL/mLに相当した。

チアクロプリドは、60分間の反応後において1 mg/mLで67.4%、0.5 mg/mLで55.2%、0.25 mg/mLで22.6%、0.125 mg/mLで13.2%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.5 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約55%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.13 µg/mLに相当した。

チアメトキサムは、60分間の反応後において1 mg/mLで43.7%、0.5 mg/mLで36.3%、0.25

mg/mLで29.1%、0.125 mg/mLで21.1%、0.0625 mg/mLで21.8%、0.03125 mg/mLで15.4%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定最高濃度である1 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約44%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.088 µg/mLに相当した。

クロチアニジンは、60分間の反応後において1 mg/mLで37.1%、0.5 mg/mLで35.2%、0.25 mg/mLで30.2%、0.125 mg/mLで17.8%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約30%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.057 µg/mLに相当した。

ジノテフランは、60分間の反応後において1 mg/mLで39.5%、0.5 mg/mLで26.3%、0.25 mg/mLで20.7%、0.125 mg/mLで17.6%の割合で、AChEの活性を阻害した。設定濃度である0.25 mg/mLの作用で示した阻害の割合(約40%)は、ダイアジノンオキシソンが示す阻害の作用濃度では0.073 µg/mLに相当した。

ネオニコチノイド系殺虫剤は、イミダクリプリドが開発されて、-C-N-C-N-の構造を共通に有する類似の作用性を持つ殺虫剤として、開発されて登録されている(図1)。アセタミプリドとイミダクリプリド及びニテンピラムが類似の骨格構造を有し、チアクロプリド、チアメトキサム及びクロチアニジンが類似の骨格構造を有し、ジノテフランが他の2群と異なった構造をもつ。アセタミプリドが最も作用が強く、ダイアジノンオキシソンに比較して、相対濃度として約1,150倍に相当する濃度(1,150分の1の作用)でAChEの阻害を示した。アセタミプリド(1)に対して、ジノテフランが相対濃度として0.08であった他は0.1~0.3に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N-の構造を共通骨格構造として(図3)側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

D. 結論

ネオニコチノイド系殺虫剤は、天然物であるニ

コチンと同様、神経のシナプス後膜に局在するアセチルコリン受容体に結合し、神経興奮を遮断することにより毒性作用を発現されるとされている。

ネオニコチノイド系殺虫剤7物質の間で、アセタミプリドが、AChE に対して最も作用が強く、ダイアジノンオキソンに比較して、相対濃度として約 1,150 倍に相当する濃度 (1,150 分の一の作用) で AChE の阻害を示した。アセタミプリド (1) に対して、ジノテフランが相対濃度として 0.08 であった他は、0.1~0.3 に相当し、毒性が低いこともあり、構造と明確な定量関係を明らかにすることができなかったが、-C-N-C-N- の構造を共通骨格構造として、側鎖として結合している構造が作用に関与していることが推測された。

一方、本研究で明らかとなったように、当該物質は AChE の酵素に作用して、アセチルコリンの分解を抑制する作用も最大で 1/1,000 ~ 1/10,000 程度ではあるが、0.1~0.3 µg/mL の濃度から示した。個々の物質の評価では、問題とする作用濃度ではないが、類似の基本骨格をもち、側鎖の構造は変化に富み多岐にわたることから、それらの環境に共存する状況における複合暴露については注意を払う必要がある。今後、さらにカテゴリー化を進め、詳細な検討を行うことが重要な課題であ

る。

E . 参考文献

- 1) 神経科学, Nolet, J (白尾智明監訳) 東京化学同人 (2011).

F . 健康危機情報

なし。

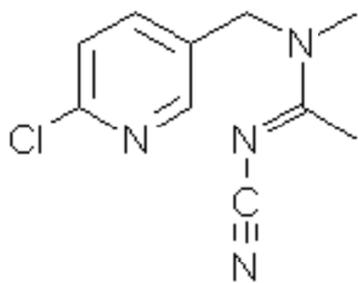
G . 成果発表

- 1 . 論文発表
なし。
- 2 . 学会発表
なし。

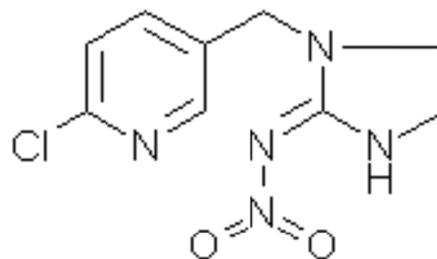
H . 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

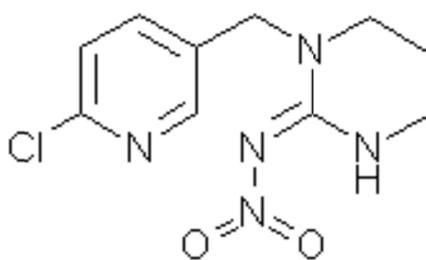
- 1 . 特許取得
該当なし。
- 2 . 実用新案登録
該当なし。
- 3 . その他
該当なし。



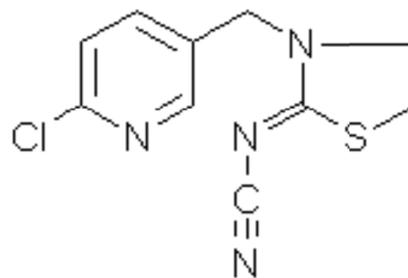
アセタミプリド



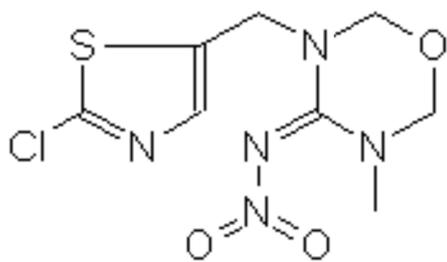
イミダクロプリド



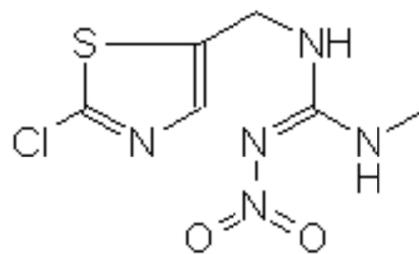
ニテンピラム



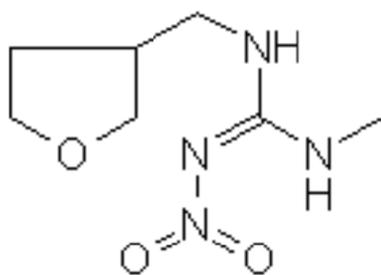
チアクロプリド



チアメトキサム



クロチアニジン

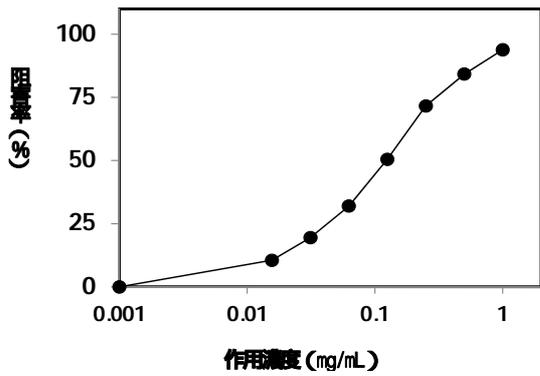


ジノテフラン

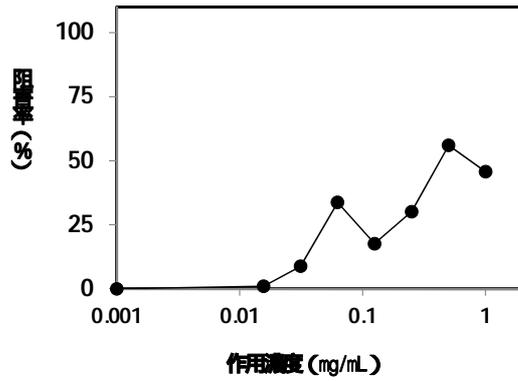
図1 ネオニコチノイド系殺虫剤の構造

「ネオニコチノイド系農薬・殺虫剤」便覧 (<http://no-neonico.jp/pdf/binran.pdf>) より転載

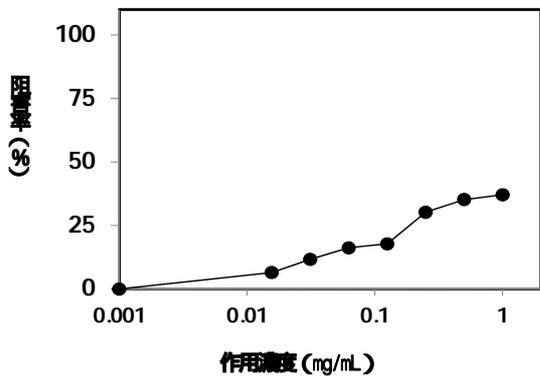
アセタミプリド



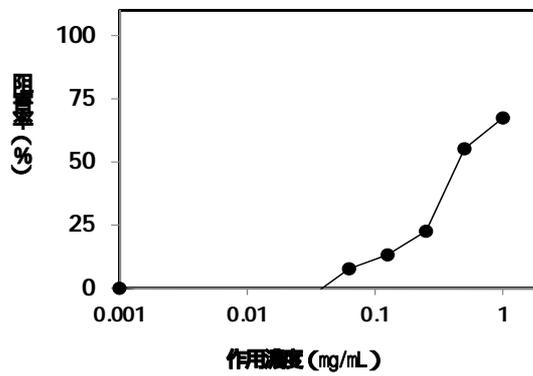
イミダクロプリド



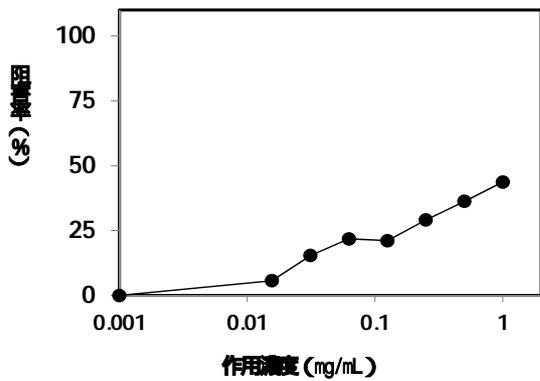
ニテンピラム



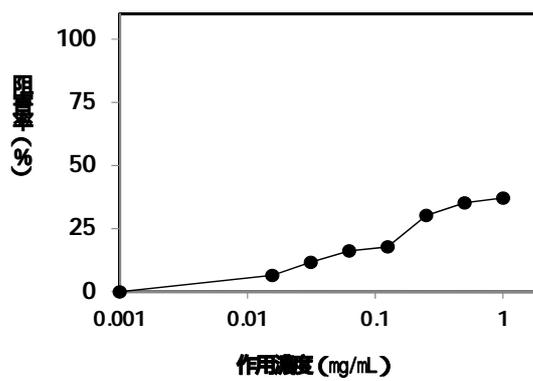
チアクロプリド



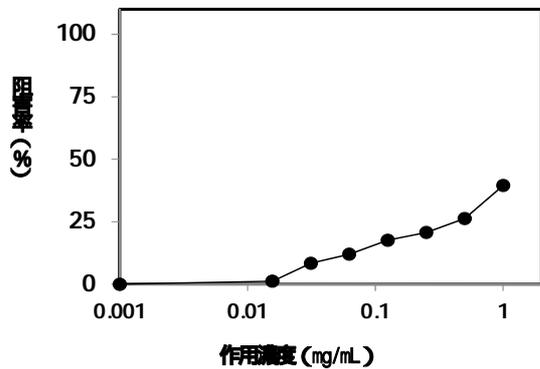
チアメトキサム



クロチアニジン



ジノテフラン



ダイアジノンオキソン

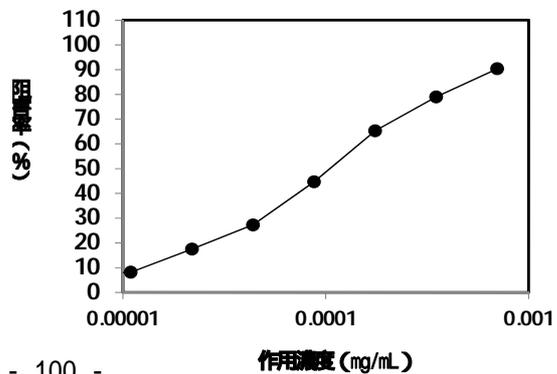


図2 ネオニコチノイド系殺虫剤とダイアジノンオキシソンのAChE 活性に対する阻害作用

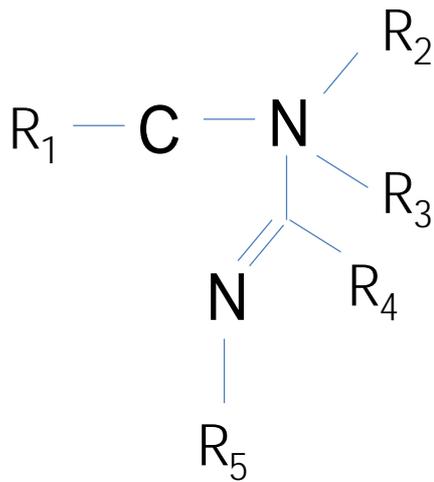


図3 ネオニコチノイド系殺虫剤の基本骨格

表1 ネオニコチノイド系殺虫剤のヒトAChE活性の阻害				
物質名	最小毒性発現濃度(μg/mL)	評価濃度(mg/mL)	阻害割合相当のダイアジノンオキシソン濃度(μg/mL)	相対毒性
アセタミプリド	15.6	0.125	0.11	8.8
イミダクロプリド	31.3	0.5	0.13	2.6
ニテンピラム	15.6	0.25	0.049	2
チアクロプリド	62.5	0.5	0.13	2.6
チアメトキサム	15.6	1	0.088	0.88
クロチアニジン	15.6	0.25	0.057	2.3
ジノテフラン	31.3	1	0.073	0.73

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Morita, A. Miyajima, A. Hatano, M. Honma	Effects of lowering the proposed top-concentration limit in an in vitro chromosomal aberration test on assay sensitivity and on the reduction of the number of false positives	<i>Mutation Research</i>	769	34-49	2014
D. Kirkland, E. Zeiger, F. Madia, N. Gooderham, P. Kasper, A. Lynch, T. Morita, G. Ouedraogo, J.M.P. Morte, S. Pfuhler, V. Rogiers, M. Schulz, V. Thybaud, J. Benthem, P. Vanparys, A. Worth, R. Corvi	Can in vitro mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or in vivo genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop	<i>Mutation Research</i>	775-776	55-68	2014
Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamazoe, Y., Ono, A., Hirose, A., Hayashi, M.	Development of a category approach to predict the testicular toxicity of chemical substances structurally related to ethylene glycol methyl ether	<i>Regul Toxicol Pharmacol</i>	70	711-719	2014
Kobayashi, K., Pillai, K., Michael, M., Cherian, K., Ono, A.	Transition of Japan's statistical tools by decision tree for quantitative data obtained from the general repeated dose administration toxicity studies in rodents	<i>International Journal of Basic and Applied Sciences</i>	3	507-520	2014

Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-K. M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K., Hirose, A.	Evaluation of in vivo mutagenicity of hydroquinone in Muta™ mice.	<i>Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen</i>	775-776	94-98	2014
Ema, M., Endo, K., Fukushima, R., Fujii, S., Hara, H., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Hojo, H., Horimoto, M., Hoshino, N., Hosokawa, Y., Imai, Y., Inada, H., Inawaka, K., Itoh, K., Katsumata, Y., Izumi, H., Kato, H., Maeda, M., Matsumoto, K., Matsuo, S., Matsuoka, T., Matsuura, I., Mineshima, H., Miwa, Y., Nakano, N., Naya, M., Noyori, H., Ohta, T., Oku, H., Ono, A., Shimizu, T., Shimomura, K., Takakura, I., Tanaka, R., Tateishi, T., Tominaga, Y., Uesugi, T., Urakawa, C., Yabe, K., Yamashita, A., Yamauchi, T., Yokoi, R.	Historical control data on developmental toxicity studies in rodents.	<i>Congenit Anom (Kyoto)</i>	54	150-161	2014
Takahashi, M., Ishida, S., Hirata-K. M., Ono, A., Hirose, A.	Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats.	<i>J Toxicol Sci</i>	39	97-108	2014

Petkov, PI, Patlewicz, G, Schultz, TW, Honma, M, Todorov, T, Kotov, S, Dimitrov, SD, Donner, M, Mekenyan, OG,	A feasibility study: Can an information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity?	Regul. Tox. Pharm.,	72	17-25	2015
---	--	---------------------	----	-------	------

