

**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 2 4 ~ 2 6 年度 総合研究報告書**

**研究代表者 本間正充**

**平成 2 7 ( 2 0 1 5 ) 年 3 月**

## 目 次

### I. 総合研究報告書

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\_\_\_\_\_ 1

本間 正充、山田 雅巳、森田 健、広瀬 明彦、長谷川 隆一、小野 敦  
吉田 緑、西村 哲治

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 2 3

III. 研究成果の刊行物・別冊\_\_\_\_\_ (年度報告書に添付のため省略)

**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-10）**

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**

本研究では、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。平成 24 年度～平成 26 年度の本研究期間において以下の研究結果を得た。

1) 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。約 8,000 の既存の化学物質のエームス試験データに加えて、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。また、既存の化学物質のエームス試験データの内、約 1,200 個については、OECD QSAR toolbox 及び、OASIS Database Manager へ移行し、内、903 個の化合物のエームス試験結果を、TIMES-QSAR システムで予測した結果と比較した。予測率は比較的高かったが、適用率が十分ではなく、開発したデータベースの利用が適用率の向上に繋がることを期待する。

染色体異常試験において、試験最高濃度の低減下に伴う、発がん性物質予測率の影響を比較した。この低減下は、発がん性予測率には影響を与えないものの、偽陽性の減少はさほど期待できないことが示された。*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のために、*in vivo* 試験データの精査と、データベースの構築を行った。

このデータベースを基に、TIMES（メカニズムベース）と、DEREK（ルールベース）による *in vivo* 遺伝毒性予測モデルを開発した。遺伝毒性試験結果から発がん性を予測するためのストラテジーの構築のために、OECD が提唱する Integrated Approach to Testing and Assessment（IATA）に基づくメカニズムを基本とした新しいワークフローを作成した。IATA ワークフローを利用することにより遺伝毒性発がん物質を 80-85% の高い感度で予測することができた。

2) 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

肝毒性に関与する既存の肝毒性アラートの修正を行った。本研究により開発されたアラートを含めた肝毒性 full アラートと Rapid Prototypes（RP）アラートによるトレーニングセット化合物群に対する DEREK での予測率は、感度 39.5%、特異性は 77.9% となった。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 アラート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。統計モデル QSAR である Sarah による肝毒性予測モデルでも DEREK とほぼ類似した予測精度を示したが、両システムにおける個々

の化合物予測結果の一致率は63%しかなく、これら両システムを併合することによって感度の向上が得られることが示唆された。

### 3) 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

化学構造を指標にした *in vivo* 反復毒性評価手法について毒性の強さ(無毒性量)の評価、及び毒性フェノタイプの評価の両面からの検討を進めた。毒性の強さに関しては、化審法既存点検化合物のデータの構造プロファイリングにより、毒性の強い化合物及び毒性の弱い化合物に特徴的な部分構造の抽出に成功し、評価対象を抽出された部分構造を有する化学物質群に限定することで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80%以上の化学物質について情報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。毒性フェノタイプの評価については、肝毒性についてメカニズムが異なると考えられる所見ごとに評価モデルを構築することで予測精度の高い評価モデルを構築できることが示された。さらに、病理変化をもとに神経毒性と刺激性による一般状態の変化を区別するための刺激性物質の判別モデル及び脾臓病理変化の判別モデルの構築を行った。一方、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、得られた毒性学的に意味のある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共通部分構造の抽出に成功した。

### 4) 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、201農薬のうち145農薬を構造別に26の系に分類し、化学構造から神経毒性が懸念されるカーバメイト系、有機リン系、16員環マクロライド系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系の5系統について毒性プロファイル、想定されるmode of action、種差、神経毒性発現用量と許容1日摂取量(ADI)設定根拠無毒性量等、多角的な比較を行った結果、有機リン系・カーバメイト系、16員環マクロライド系については構造による神経毒性が予測できる可能性が考えられた。生殖器毒性・発がん性予測、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、予測される機序を化学構造および作用機序の両面から解析を行った。機序試験が実施された5剤の化学構造は異なっていたが、4剤で発がん機序が予測できたことから、子宮発がん性機序の予測には適切な機序試験が重要であり、化学構造から予測は難しいと考えられた。子宮発がん機序を予測するフローチャートを作成した。

### 5) カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

限られた既知の結果を有効に利用し、試験を実施せずに、環境中運命や毒性を予測できる方法を確認するため、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)活性阻害を指標として神経系に対する毒性について、カテゴリーアプローチを行い、構造に基づくカテゴリー化により、作用の強弱の推測が可能であることを示唆する例を提示することができた。*In vitro* 試験系迅速試験により得られたIC<sub>20</sub>値とADI値の関係に必ずしも高い相関関係は見られなかった。しかし、特異的に高いIC<sub>20</sub>値とADI値を除くと、相関が認められ、カテゴリー化による毒性評価の結果を補填することや、毒性の強弱などの予測を検証評価することに有効な手段であることが示唆された。

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 総合評価研究室 室長

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

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 安全評価部 室長

西村 哲台:

帝京平成大学薬学部 教授

長谷川 隆一:

国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 客員研究員

## A. 研究目的

安全性未評価の既存化学物質は現在数万種類存在しており、これら化学物質のリスク評価と管理は、我が国だけでなく、世界的な課題である。安全性未評価の既存化学物質や、低生産量物質については早急な安全性試験と評価の実施が望まれるが、効率性や動物愛護の観点から、これまでに蓄積された毒性情報を活用したカテゴリーアプローチや、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)の活用が期待されている。これらインシリコ技術の利用については、OECDを初めとしてEU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。カテゴリーアプローチや、(Q)SAR手法の構築および改良を行うとともに、それら技術を利用した化学物質安全性評価ストラテジーの提案を行うことが本研究の目的である。

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、エームス変異原性、染色体異常については4種の(Q)SARプログラムを用いた予測システムの開発・改良を行ってきた。また、反復毒性については肝毒性と腎毒

性をターゲットとしたアラート開発し、毒性予測を試みてきた。

本研究においては、これまでの研究を進展させ、実用化に向けた取組を行う。遺伝毒性に関しては、予測精度の向上を目指し、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動物突然変異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目指す。また、OECD試験ガイドラインの変更に伴う、染色体異常アラートの影響の検討、*in vivo*に於いては代謝、解毒を考慮した肝臓での遺伝毒性QSAR予測手法の改良を行う。

反復毒性については、毒性指標を毒性学的な観点から分類整理して、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。また、これまで構築してきた全身諸臓器の病理組織学的所見シソーラスによる分類を、農薬等の化学物質の毒性プロファイルに応用し、検索した化学物質について、構造・作用機序ごとに特徴的な重篤な毒性が存在するかを解析した。特に有機リン系、カーバメイト系殺虫剤による神経毒性、エストロゲン類を始めとする化学物質で誘発される子宮癌に焦点を当てた。さらに、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として、有機リン系殺虫剤とネオニコチノイド系殺虫剤を対象物質として、アセチルコリンエステラーゼ活性阻害と細胞への作用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。

## B. 研究方法

### 1) 遺伝毒性の予測に関する研究

#### 1.1 エームス試験データベースの再構築と、TIMESでの評価に関する研究

一般化学物質、医薬品、食品添加物を中心に7,982のエームス試験データを入手した。また、約2万化合物の安衛法エームス試験結果を入手し、そのうちデータベースに入力可能であっ

た約 1 万 3 千物質をデータベース作成ソフト JChem に入力した。上述の 7,982 の試験データのうち 1,186 個については、OASIS Database Manager へ移行した。1,186 個のうち 903 個の化合物のエームス試験結果を、ブルガス大学で開発した QSAR システムである TIMES を用いて予測した。

### 1.2 In vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験の発がん物質検出性に関する研究

染色体異常 (CA) 試験における最高濃度低減化に伴う発がん性予測率の推移に関しては、Kirkland らの CGX データベースからの 435 物質データセット (CA 陽性 267 物質、CA 陰性 168 物質; 発がん性 317 物質、非発がん性 118 物質) を用い、各種ガイドラインによる種々の試験上限濃度を適用した場合の結果を再評価するとともに、当該結果に基づく、発がん性予測率(感受性および特異性)を算出した。また、最高濃度の低減化による陽性物質数減少の実態を解析するために、化審法既存化学物質データベースからの CA 陽性 124 物質を用い、種々の試験上限濃度を適用した場合の結果を再評価した。さらに、発がん性予測率算出ならびに陽性物質数減少の実態解析に用いた物質の分子量分布を調べた。加えて、ICH ガイドライン濃度の適用に伴い陰性と判断された物質について、その妥当性を証拠の重みづけアプローチにより評価した。

In vivo 遺伝毒性試験に関しては、Kirkland らの CGX データベース収載の 939 物質 (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) 試験および in vivo トランスジェニック突然変異 (TG) 試験のデータを広範囲かつ詳細な文献調査により収集した。得られた MN データは、結果を以下の 3 つに分類した: + (陽性) - (陰性) E (equivocal)。また、TG の結果は、以下の 4 つに分類した: + (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)。評価分類結果に基づき、齧歯類発がん性に対する両 in vivo 遺伝毒性試験の感受性・特異性分析および in vitro - in vivo 間の比較を行った。

### 1.3 In vivo 遺伝毒性 QSAR モデルの開発に関する研究

ブルガス大学によって開発された予測モデル (TIMES) により in vivo 小核試験を予測した。また、in vivo 小核試験データがある 162 化合物について、結果のレビューを行い、この結果を基に in vivo 遺伝毒性予測のためのフローを改良した。さらに、この 162 化合物のエームス試験 (TG471)、染色体異常試験 (TG473)、マウスリンフォーマ試験 (TG476)、肝 UDS 試験 (TG486)、コメット試験 (TG489)、トランスジェニック突然変異試験 (TG488)、肝小核試験の結果についてもデータを精査し、これに ISSCAN ver. 4a データベースから 214 の化学物質を抽出した。これら化学物質の遺伝毒性の総合評価のために GHS 分類に基づき IATA の適用を試みた。

NIHS、Leadscope、Vitic Nexus データセットからなる複合データセット (1544 化合物) を構築した。このデータセットを、DEREK (DEREK for Windows (DfW) version 14) 中の in vitro 染色体異常アラートととして装着し、in vivo に適用可能かを検討した。

### 2) 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

肝毒性については、これまでに開発した Rapid Prototypes 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。検討に際しては、各アラートにヒットする化合物群やその活性の詳細な調査を、国立衛研と NITE により構築された HESS デー

データベースや文献情報による入手可能な詳細な組織病理データを利用して実施した。さらに、追加的な手順として、残されている RP アラートのそれぞれについて簡易評価を行い、各 RP アラートを以下のように3分類し、フルアラートの構築に加えて、無効化できるアラートの検索を行った。

- ・ 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)

同じトレーニングセットを用いて、統計的モデリング・ソフトウェア Sarah を用いた肝毒性予測モデルの構築を試み、DEREK との予測精度の比較をおこなった。

### 3)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

化審法既存点検により28日間試験もしくは生殖発生併合試験実施済みの233化合物について、化学構造と毒性試験における無毒性量や毒性所見をデータベース化し、化学構造プロファイリング等により化学物質の部分構造や物理化学的性質の共通性や化学物質構造全体の類似度と *in vivo* 毒性の強さとの関係について解析した。また、毒性試験で認められた病理変化や血液検査項目の変化について病理フェノタイプ分類やクラスタリングにより、代表的なフェノタイプを発現する化学物質に共通する部分構造の抽出や判別評価モデル構築を行い、それぞれの毒性フェノタイプ評価における有用性について検討した。

### 4)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

公表された農薬データを用いた毒性プロファイルと化学構造に関する解析に関しては、2003年から2011年まで食品安全委員会で評価され評価書として公表された201農薬の毒性データを用いた。同一の農薬で複数の評価書がある場合は最新版から評価した。これらの農薬名(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)を抽出して、特に農薬の分類、化学構造の特徴、農薬としての作用機序について分類した。

神経毒性と作用機序および構造の関連性の解に関しては、H24年度に抽出したデータから神経毒性物質を選択した。

子宮癌と作用機序および構造の関連性の解析に関しては、H24年度に抽出したデータを用いて、投与により子宮発内膜腺癌を増加させた剤(子宮発がん性を示す農薬)を選択した。

また公表データより既知のげっ歯類子宮発がん機序をヒト子宮発がん性への予測も可能な3タイプに分類した。

### 5)カテゴリー化による神経系毒性評価に関する研究

アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を示す化学物質として、有機リン系農薬に関する既報の結果を収集し、カテゴリー化による手法(カテゴリーアプローチ)を検討した。有機リン系農薬として、ホスフェート型6種と、チオノ型やジチオ型17種、チオノ型やジチオ型17種については代謝活性体と考えられるオキソン体について、*in vitro* 試験系を確立し、環境中存在状態での測定が可能な迅速試験法を用いて、アセチルコリンエステラーゼ阻害活性を測定した。

前述の評価方法に加え、ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性阻害をできる試験系を設定した。

## C. 研究結果

### 1) 遺伝毒性の予測に関する研究

#### 1.1 エームス試験データベースの再構築と、TIMES での評価に関する研究

一般化学物質、医薬品、食品添加物を中心に 7,982 のエームス試験データを入手し、データベース作成ソフト JChem に入力した。そのうち 1,186 個については、OASIS Database Manager へ移行し、そのうち 903 個の化合物のエームス試験結果を TIMES で予測した。その結果、ドメイン構造をもつ場合 (in domain) に関しては陽性予測率 (感度): 87%、陰性予測率 (特異性): 90% だった。ただし、TIMES はメカニズムベースの QSAR であるため in domain は少なく、適用率は 36% しかなかった。データベース構築に関しては、安衛法で行った 2 万余化合物のエームス試験結果を入手した。このうち、混合物、ポリマー等、QSAR モデルにそぐわない物質を除く 1 万 3 千化合物をデータベースに追加した。QSAR モデルの改良のために世界中の QSAR ビルダーにこれらデータベースを提供した。

#### 1.2 *In vitro* 及び *vivo* 遺伝毒性試験の発がん物質検出性に関する研究

CA 試験における最高濃度低減化に伴う発がん性予測率の推移に関しては、感受性は、現行 OECD ガイドライン濃度 (10 mM または 5 mg/mL のいずれか低い方)、改訂 OECD 濃度 (10 mM または 2 mg/mL のいずれか低い方) あるいは ICH ガイドライン (1 mM または 0.5 mg/mL のいずれか低い方) の適用で 66.2% からそれぞれ 63.1%、63.1%、45.4% に減少し、特異性は 51.7% からそれぞれ 59.3%、59.3%、72.9% に増加した。改訂 OECD 濃度の適用による感受性・特異性は、現行 OECD によるも

のと変わらなかった。一方、陽性物質数の減少の程度については、現行 OECD 濃度での陽性 118 物質が改訂 OECD 濃度では若干減少し 113 物質となった。分子量分布の解析から、これらの変化は、CGX あるいは化審法既存化学物質データベースでの CA 陽性物質の 52.8% あるいは 68.5% が分子量 200 未満であったことに関連していた。また、改訂 OECD 濃度で陽性であったが ICH 濃度適用では陰性と判断された 53 物質の妥当性評価の結果、約半数の 28 物質に何らかの懸念があり、陰性評価となることの問題点が示された。

*In vivo* 遺伝毒性試験データベースの構築と発がん性物質検出性に関しては、*in vivo* MN では 379 物質 (発がん物質 293、非発がん物質 86) のデータを得て、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、E が 10 および 12 物質であった。*In vivo* TG では 78 物質 (発がん物質 74、非発がん物質 4) のデータを得て、非発がん物質のデータはすべて陰性であった。また、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。*In vivo* MN の発がん性に対する分析では、E を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)、一致性は 45.4% (172/379) であった。一方、*in vivo* TG の感受性は、72.9% (54/74) であったが、非発がん物質に対するデータが 4 件と極めて少ないため、特異性ならびに一致性の検証はできなかった。また、*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 55.1% (118/214)、非発がん物質では 40.3% (27/67) であった。両物質を合計した場合の一致性は 51.6% (145/281) であった。*In vivo* TG と Ames 試験の発がん物質および非発がん物質を合計した場合の一致性は 82.2% (60/73) であった。

### 1.3 In vivo 遺伝毒性 QSAR モデルの開発に関する研究

ブルガス大学との共同研究により生体内での代謝、解毒および生物学的利用率を考慮した *in vivo* 遺伝毒性の予測モデルの開発を行った。これまで構築した *in vivo* MN 試験を基に、既存の TIMES 反応性モジュールに *in vivo* 代謝シミュレータを組み合わせて、*in vivo* MN モデルを開発した。このモデルの性能はそれほど高くなく、感度 76%、特異度 37%であった。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースの *in vivo* 遺伝毒性の予測モデル (DEREK) の開発を行った。*In vivo* MN データセット 1544 化合物から構成され、NIHS データセット、Leadscope データセット、Vitic Nexus データセットからなる。その内訳は陽性 (484 化合物)、陰性 (977 化合物)、弱陽性 (1 化合物)、equivocal (31 化合物)、不確定 (43 化合物)、データなし (8 化合物) である。これらデータから抽出したアラートを実装した DEREK KB 2012 & NIHS Yr 6\_1.0 NIHS Yr 6\_1.0 Knowledge Base の、*in vitro* MN 予測結果は、感度 =  $141/484 = 29.1\%$ 、特異性 =  $898/977 = 91.9\%$ 、一致率 =  $(141+898)/1461 = 71.1\%$  であった。

また、ラーサ社とは、知識ベースの TG 試験予測モデルの開発を行った。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。

新しい QSAR モデルの開発と、発がん性を予測するためのストラテジーの構築のために、異なる遺伝毒性試験を関連づけるための *in vitro-vivo* 外挿ワークフローの導入を試みている。今回、OECD が提唱する Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA)

に基づくメカニズムを基本とした新しいワークフローを開発した。IATA を導入することにより、データ間の矛盾を、遺伝毒性エンドポイントの違いや、メカニズムから合理的に解釈することができる。IATA ワークフローでは遺伝毒性発がん物質を 80-85%の高い感度と、15-20%の低い偽陽性率で予測することができた。

### 2) 反復投与毒性を指標にした構造活性相関肝毒性モデルの開発に関する研究

Toxicophore が Rapid Prototype であっても、毒性の論理的根拠が確立された場合、あるいは選択的に開発された場合には、full アラートへの昇格、あるいは既存の肝毒性アラートの組み込みを行った。一方、毒性の論理的根拠を見出すことが出来ない、あるいは活性が Rapid Prototype で確認された toxicophore との関連性が判断できなかった Rapid Prototype は削除した。26年度までに、肝毒性の 18 個の Rapid Prototype を削除し、4 個の新たな肝毒性アラート (アニリン及び前駆体、2-ハロピリジン、2-アミノピリミジン、スチレンまたはその誘導体) の作成、および Knowledge Base 内の 5 個の既存の肝毒性アラート (ハロベンゼン、パラアルキルフェノール類、フェニールアルキルトリアゾール類、*o*-アリル化合物及びアクロレイン、芳香族スルホンアミド類) の修正を行った。

Sarah で構築したモデルは DEREK とほぼ類似した予測精度を示したが、両システムにおける個々の化合物予測結果の一致率が 63%しかなく、不一致である割合が 37%と比較的高かった。

### 3) 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

毒性の強さ (無毒性量) の評価手法の検討においては、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、基本的な物性値と実際の試験で報告された無毒性量との関係について解析を行った結果、無毒性量が小さい化合物は、LogP 値 = 2~4 に集中しており、一方、分子量の低い物質ほど平均無毒性量が低く、分子量 640 以上の物質では、1 物質を除いて無毒性量は 1000mg/kg 以上であることが示された。また、生物活性との関連が予想される部分構造セットによる構造プロファイリングにより、毒性の強い化合物及び毒性の弱い化合物に特徴的な部分構造の抽出に成功した。さらに、抽出された部分構造と基本的な物性値を指標とした評価モデルの構築について検討を行った結果、90%前後の Accuracy の判別モデル構築に成功し、同モデルを用いて外部データセットとして Munro らによる Cramer rules の検証に用いられた化学物質データセットを用いて外部検証を行った結果、最大で 72.5%の一致率を得た。また、無毒性量の評価アプローチの検討のため、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 80%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。

毒性フェノタイプについての評価手法の検討においては、既存点検結果で報告された様々な病理変化が発現した投与量について解析を行った結果、肝・腎毒性に加えて、脾臓及び消化管における病理変化が比較的低用量で発現することが明らかとなった。そのうち肝毒性については、既存点検結果で報告された代表的な病理所見についてメカニズムが異なると考えられる所見ごとに判別分析による評価モデルを構築して予測精度について検討を行った結

果、いずれのモデルとも 80%以上の評価精度を得る一方で構築した 5 つ病理所見モデルを組み合わせた肝毒性(病理変化を伴う)評価精度は、内部検証で 85.43%を達成した。さらに、病理変化をもとに神経毒性と刺激性による一般状態の変化を区別するための刺激性物質の判別モデル及び脾臓病理変化の判別モデルの構築を行った。一方、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部分構造抽出に成功した。

#### 4)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

公表された農薬データを用いた毒性プロファイルと化学構造に関する解析に関しては、201 農薬の化学構造による農薬の分類と毒性プロファイル、ADI 設定根拠、複数同じ化学構造が認められた 145 農薬の化学構造による農薬の毒性をまとめた。複数同じ化学構造が認められた 145 の農薬は 26 の系の構造に分類された。このうち、農薬数が多かったのは、有機リン系農薬 16 剤で、アミド系農薬 15 剤、トリアゾール系農薬 13、スルホニルウレア系農薬 9 剤、カーバメイト系農薬 8 剤と続いた。

構造により特徴的な毒性を示す農薬は多く、顕著な例が有機リン剤やカーバメイト系におけるコリンエステラーゼ阻害作用(ChE 阻害)であり、有機リン剤では全てにおいて ChE 阻害が認められた。その他、ジフェニルエーテル系で血液毒性、ストロビルリン系のうちオリサストロビン、ピラクロストロビンで十二指腸肥厚、ネオニコチノイド系で体重増加抑制、マクロライド系でリン脂質症、酸アミド系とくにアラクロールとブタクロールで鼻腔炎症や腫瘍

が認められた。神経毒性は 16 員環マクロライド骨格で認められた。26 の系に分類した農薬のうち、4 つの系（アリール、キノリン、トリアジン、ピレスロイド系）において共通の毒性はみとめられなかった。

神経毒性と作用機序および構造の関連性の解析に関しては、構造から神経毒性が疑われる 5 系について、検索した剤数を、名称と神経毒性の特徴を列記した。有機リン系が最も多く、16 剤、続いてカーバメイト系 6 剤、ネオニコチノイド系 5 剤であり、ピレスロイド系および 16 員環マクロライド系は各 3 剤について解析を行った。

次に、構造から神経毒性が予想された 5 分類について毒性の特徴や種差、ADI との比較を行った。有機リン系およびカーバメイト系の剤については、いずれも ChE 活性阻害を神経毒性の特徴としてきた。またこれらの 2 系では有機リン系のクロルフトキシホス 1 剤を除き種差は認められなかった。種差なしとしたいずれの剤の種差についてはヒトデータを含め、神経毒性の NOAEL の差は近似の剤が多いことも特徴であった。

ネオニコチノイド系については、イミダクプリドおよびジノテフランについては神経毒性に関連する臨床症状が認められたが、その他の剤の臨床症状は明白なものではなく、系による特徴的な毒性は認められなかった。また種差については全て 1 種のみ動物での発現であった。これらの神経毒性、あるいは臨床症状の発現は、ADI のエンドポイントより高いよりで発現していた。

ピレスロイド系ではピフェントリンのみ神経毒性に関連する臨床症状がラットおよびイヌに認められ、イヌでより強く発現したが、ADI 設定の根拠となるエンドポイントより高い量であった。

16 員環マクロライド系殺虫剤では、よろめき歩行など共通な神経毒性が認められた。それ

らの変化はげっ歯類およびイヌと種にまたがって発現したが、イヌでより感受性が高かった。ミルベメクチンでのみ、これらの神経毒性が ADI 設定の根拠となるエンドポイントであった。

子宮癌と作用機序および構造の関連性の解析に関しては、雌の生殖器官については、農薬の評価でヒトへの外挿性から重要と考えられる子宮腫瘍について、化学構造と機序の両面から解析を実施した結果、投与により子宮癌発生が 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。複数の農薬について農薬としての作用機序の共通性が認められた。ピリミノバックメチル、メタフルミゾンはアセト乳酸合成酵素阻害による殺菌剤、上述のイソピラザム、セダキサンはハク酸脱水素酵素阻害剤、ベンチアバリカルブイソプロピル、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。しかし、類似の化学構造が 2 剤（イソピラザム、セダキサム）のみであり、その他の構造には類似性は認められなかった。ADI の設定根拠試験との子宮発がん用量の比較では差が大きく大部分の剤で子宮内膜腺癌は大量投与条件下で増加していた。

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 のいずれに分類した。ピリミノバックメチルスピロジクロフェンがタイプ A である相対的高エストロゲン状態の持続が、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 である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、子宮内膜腺癌の発生に関連している可能性が示唆された。

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。

### 5)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のうち、ホスフェート型の6種では、対象農薬数が少ないこともあり、ADI値と*In vitro*試験法から得られたIC<sub>20</sub>値の間には相関性は認められなかった。また、-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>と-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Oの側鎖の相違については差がみられず、ADI値とIC<sub>20</sub>値の両方が低い傾向が認められた。一方、-[(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHO]<sub>2</sub>と側鎖が長くかつ立体構造が大きくなると、毒性がさらに低くなる傾向がみられ、側鎖の構造の長さや立体構造の大きさと毒性発現との関連が示唆され、AChEの結合部位に結合する能力として側鎖の構造が寄与していると考えられた。チオノ型やジチオ型17種の中で、フェントロチオンとフェンチオンでは、側鎖の立体的大きさや電子吸引力に基づく相違が阻害作用に影響していると推測された。ピリミホスメチルとダイアジノン、クロルピリホスメチルとクロルピリホスの比較では、-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Oの側鎖の方が-(CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>の方に比べ毒性に及ぼす作用が強く出る可能性が推測された。別の側鎖が、毒性発現にさらに影響を及ぼしている可能性が示唆された。これらの結果から、構造に基づくカテゴリー化により、作用の強弱の推測が可能であることを示唆する例を提示することができた。

*In vitro*試験系迅速試験により得られたIC<sub>20</sub>値とADI値の間に必ずしも高い相関関係は見られなかった。しかし、特異的に高いIC<sub>20</sub>値とADI値を除くと、相関が認められ、カテゴリー化による毒性評価の結果を補填することや、毒性の強弱などの予測を検証評価することに有効な手段であることが示唆され、*In vitro*試験法の確立が必要であることも明らかとなった。ネオニコチノイド系殺虫剤の中では、ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性に対し

て、アセタミプリドが、最も作用が強く、ダイアジノンオキサソニンに比較して、相対濃度として約1150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に相当した。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関与していることが推測された。一方、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。

### D. 考察

データベースの中のAmes\_DB903を対象にTIMESモデルによる計算を実施した。903化合物の内訳はエームス試験陽性189化合物、陰性709化合物、擬陽性5化合物である。陽性189化合物についての計算結果より、判定が不可能な物質が11、計算ができない物質が2あった。それらを差し引いた176化合物について再計算を実施したところ、感度は71%であったが、in domainのみでは87%と高くなった。一方、陰性709化合物については、判定不可能な物質が55、計算ができない物質が19あった。それらを差し引いた635化合物についての特異性は77%と計算され、in domainだけで計算すれば、90%になった。このようにTIMESはドメイン構造に限って予測すれば感度、特異性とも90%程度の精度で予測できるが、全体の適用率は36%程度と低いことが問題である。out of domainを減らして適用率を

上げるためにはデータベースの拡大が必須であるため、安衛法データ約 13,000 を追加し、研究期間中に約 2 万化学物質からなる信頼性の高いエームス試験データベースの作成が終了した。

化学物質の *in vitro* ほ乳類細胞遺伝毒性試験の最高用量は医薬品 (ICH ガイドライン) では 1mM または 0.5 mg/mL のいずれか低い方となったが、一般工業化学物質を対象とする改訂 OECD ガイドラインでは、混合物や重合物を除き、10 mM 基準 (10 mM または 2 mg/mL のいずれか低い方) が維持された。この変更は、発がん性予測率 (Sensitivity および Specificity) には影響を与えないものの、わずかな陽性物質数の減少しか認められないことから、偽陽性の減少 (すなわち、Specificity の向上) はさほど期待できないことが示された。これに伴う *in vitro* 染色体異常試験の構造アラートの変更は不要と考えられる。なお、偽陽性の削減には、用いる細胞や細胞毒性測定方法についての考慮など、他のアプローチが必要であろう。

*In vivo* MN では 379 物質 (発がん物質 293、非発がん物質 86) からなるデータベースの開発を行った。げっ歯類発がん性に対する *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 55.1%、非発がん物質に対しては 40.3% で、発がん物質と非発がん物質を統合すると 51.6% 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 82.2% 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。

*In vivo* 小核試験結果の予測のために生物学的組織化の 3 レベルの遺伝毒性作用に関する新しい分類ワークフローを開発した。このワークフローにもとづき、データベースの厳密な解析を実施し、*in vivo* 遺伝毒性の 2 種のモデルを開発し、両モデルを同じプラットフォームで組み合わせさせた。これは、*in vivo* 解毒作用を明確に表す新しい *in vivo* 代謝シミュレータと、DNA および蛋白質への化学物質の求電子性にもとづく反応性モジュールである。実験データの正確度 (約 75~80%) をみると、*in vivo* MN モデルの性能は妥当であり、感度 74%、特異度 75% であった。こうした *in vitro*-*in vivo* 関係によると、「捕捉的」解毒経路に関与しない *in vitro* 突然変異原性化学物質は、DNA および蛋白質損傷を誘発する可能性があり、したがって *in vivo* 肝遺伝毒性作用を有すると考えられる。このために本モデルの全体性能は比較的低い (感度 70%、特異度 57%) とみられる。この不十分な性能は、化学物質のトレーニングセットではなく、*in vitro*-*in vivo* のギャップの評価から間接的にモデルを構築したことに依拠する。このため、本モデルは不完全である。そのため、複雑な遺伝毒性エンドポイントをモデリングするためのワークフローの実現可能性の実証を行った。この目的のため OECD が提唱する Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) に基づくメカニズムを基本とした新しいワークフローを開発した。IATA を導入することにより、データ間の矛盾を、遺伝毒性エンドポイントの違いや、メカニズムから合理的に解釈することができる。IATA ワークフローでは遺伝毒性発がん物質を 80-85% の高い感度と、15-20% の低い偽陽性率

で予測することができた。

*In vivo* 遺伝毒性の知識ベース SAR モデルの改良に関しては、*in vivo*CA アラートの *in vivo* への適用範囲の拡張に成功した。ラーサ社との共同研究では最終的に *in vivo*MN 予測の SAR モデル (DEREK) にこれらアラート構造が装着され、今年度のプロジェクト終了時には 32%まで感度の改善が認められた。しかし、その感度は満足できるものではない。おそらく、これ以上既存の *in vitro* アラートの拡張を検討しても感度の著しい改善が得られるとは考え難い。未検討のすべての *in vitro* アラートが拡張されたとしても(、併合データセットに対して得ることができる最も高い感度は(既存の即時プロトタイプアラートの拡張を含めて)43%程度と予測される。また、ラーサ社は TG 試験の予測モデル開発も行った。H26 年度に NIHS から TG 試験データセットを提供し、感度および正確度が大幅に向上した。

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 *in silico* 評価手法は提案されていない。これまでに開発した肝毒性 Rapid Prototypes (Rps) の正式アラートに向けた検討において対象のアラートの優先順位付けをするためにとったアプローチは、検討の結果、新規の full アラートの作成と大部分の full アラートを改良することができたことから非常に効果的であったと考えられる。本研究により開発されたアラートを含めた肝毒性 full アラートのみによるトレーニングセット化合物群に対する予測精度は、感度 39.5%、特異性は 77.9%となった。しかし全ての RPs からの“従来”のアラートの開発は、かなり大変な作業であり。また、すべての RPs のアラートについて評価や必要に応じて記述するためにはかなりの時間がかかる可能性がある。H27 年度では、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い、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た 8 つ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、H26 年度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。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。一方、統計的モデリング・ソフトウェア Sarah を用いた肝毒性予測モデルの構築においては、DEREK とほぼ類似した予測精度を示したものの、両システムにおける個々の化合物予測結果の不一致である割合が比較的高かった。このことは、これらのシステムを併合することによって感度の向上が得られることを示唆した。

反復投与毒性についての構造活性相関モデルの検討においては、毒性フェノタイプの評価と無毒性量の評価の両面からの検討を進めた。毒性フェノタイプの評価においては、肝臓の病理所見を想定されるメカニズムごとに分類した判別モデルの構築により評価精度の向上が示された。この結果はフェノタイプそのものよりむしろ毒性メカニズムに立脚した評価の必要性が示している。*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は困難であると考えられる。しかし、多くの毒性変化について通常の毒性試験結果からはメカニズムを解析することは不可能であり、さらに、肝臓以外の臓器では病理変化を示す物質数そのものが少なく、予測モデル構築自体が困難であり、モデル構築のためのデータベースの充実が課題である。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、毒性学的に関連性のある項目がクラスターとして抽出され、さらに、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、既知情報に照らして妥当な結果を得た。一方、無毒性量の評価については、特定の部分構造を有する化合物群に限定することで、物性との相関性から無毒性を評価出来る可能性が示された。さらに化学構造の類似性と無毒性量との関係から類似度 80%以上の化学物質の情報から無毒性量の評価がある程度可能であることが示される一方で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た。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た。

農薬を構造別に分類し公表データから毒性プロファイルを解析した。食品安全委員会より評価書として公表された 201 農薬のうち 145 農薬を構造別に 26 の系に分類した。その結果、4 系については共通した毒性プロファイルを見出すことはできなかったが、残る 22 系では大部分の農薬について構造により共通した毒性が認められた。このうち最も重要な毒性が肝臓に観察された系は 13 と最も多く、特に肝肥大やマウス肝腫瘍が認められた系のうち 4 系では甲状腺の濾胞上皮過形成や腫瘍も伴っていた。

構造により特徴的な毒性を示す系も多く、カーバメイト系・有機リン系でのコリンエステラーゼ阻害作用、ジフェニルエーテル系で血液毒性、ストロビルリン系で十二指腸肥厚、ネオニコチノイド系で体重増加抑制、マクロライド系

でリン脂質症、酸アミド系で鼻腔炎症や腫瘍が認められた。構造別に農薬の毒性プロファイルを解析すると、構造別に特徴的な毒性が多く見出されたことから、この構造による分類は化学物質の毒性の予測に資すると期待される。神経毒性が懸念されるカーバメイト系、有機リン系、16 員環マクロライド系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系の 5 系統および個別に神経毒性を示した 11 剤について、毒性の特徴、種差、ADI との比較など解析の結果、有機リン系・カーバメイト系では全ての剤でコリンエステラーゼ (ChE) 阻害作用を示し、その作用は多種に跨っており、ChE 活性阻害に対する NOAEL も近似するものが多く、ADI も ChE 阻害作用に基づいて設定されていた。したがって、これらの構造を有する剤については、構造的にヒトを含む多くの種で ChE 活性阻害作用という神経毒性を予測することが可能であると考えられる。

ネオニコチノイド系については、単独の種で発現する神経毒性が 2 剤のみでその他には明白な神経毒性は観察されず、その他の毒性作用のほうが神経毒性より感受性が高い剤が多く、ピレスロイド系についてはピフェントリンを除き、そのほかの毒性がより低い量で発現することから、構造から神経毒性を予測することは難しいと考えられた。単発的に神経毒性が認められた剤については種差が大きく、構造による神経毒性に関する共通項目は見出すことは困難であった。しかし神経毒性の種差がない剤も多かったことから、共通の作用機序であると考えられた。

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が、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 4 剤で機序が予測できたことから、発がん機序試

験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。

有機リン系殺虫剤を対象物質として、アセチルコリンエステラーゼ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。 $-(\text{CH}_3\text{O})_2$  と  $-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$  の側鎖の相違については差がみられず ADI 値と  $\text{IC}_{20}$  値の両方が低い傾向が認められた。一方、 $-[(\text{CH}_3)_2\text{CHO}]_2$  と側鎖が長く、かつ立体構造が大きくなると毒性が低くなる傾向がみられた。他方の側鎖の  $-\text{CH}(\text{OH})-\text{C}-\text{Cl}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}=\text{CH}_2$  と  $-(\text{S}-\text{C}_6\text{H}_5)_2$  の 3 種については、構造と阻害活性の間に関連を見出すには至らなかったが、側鎖の構造の長さや立体構造の大きさが作用と関連していることが示唆され、アセチルコリンエステラーゼの結合部位に結合する能力として側鎖の構造が寄与していると考えられた。これらの結果から、構造の類似に基づくカテゴリー化による化学物質の類別化が毒性の発現予測に有効であり、構造の相違から作用の強弱の推測が可能であることを示唆する一例を提示することができた。今後、カテゴリー化をするために多種多様な化学物質の中から抽出する方法の確立と、カテゴリー化の対象とする毒性の選択、毒性作用の発現に寄与する構造と毒性の寄与に対する数値化の手法の確立などの課題の重要性と必要性が抽出できた。

*in vitro* 試験系迅速試験によるセチルコリンエステラーゼ活性阻害濃度と ADI 値との間に何らかの関係があると想定される。*In vitro* 試験系迅速試験により得られた  $\text{IC}_{20}$  値と ADI 値の関係を調べると、必ずしも高い相関関係は見

られなかった。しかし、特異的に高い  $\text{IC}_{20}$  値と ADI 値を除くと、相関が認められ、カテゴリー化による毒性評価の結果を補填することや、毒性の強弱などの予測を検証評価することに有効な手段であることが示唆され、*In vitro* 試験法の確立が必要であることも明らかとなった。

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  $1/1,000 \sim 1/10,000$  程度ではあるが、 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$  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 . 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。これまで計画通りの研究結果を得た。エームス試験に関しては、世界最大規模のエームス試験データベース（データ数約 13,000）の構築が終了した。このデータベースを公開し、QSAR ツールの予測精度の向上を目指した国際共同研究を開始した。今後この分野で国際的イニシャティブを取る。染色体異常試験において、試験最高濃度の低減に伴う、発がん性物質予測率の影響を比較した。この低減下は、発がん性予測率には影響を与えないものの、偽陽性の減少はさほど期待できないことが示された。これを基に OECD ガイドラインの変更を鑑み、予測モデルを改良し、実用化に貢献する。*In vitro* 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のために、*in vivo* 試験デ

ータの精査と、データベースの構築を行った。このデータベースを基に、TIMES（メカニズムベース）と、DEREK（ルールベース）による *in vivo* 遺伝毒性予測モデルを開発した。遺伝毒性試験結果から発がん性を予測するための戦略の構築のために、OECD が提唱する Integrated Approach to Testing and Assessment（IATA）に基づくメカニズムを基本とした新しいワークフローを TIMES モデルに組み入れた。IATA ワークフローを利用することにより遺伝毒性発がん物質を 80-85% の高い感度で予測することができた。また、DEREK による *in vivo* 遺伝毒性予測モデルに関しては *in vivo* MN よりも、*in vivo* TG 予測に期待が持てた。

反復毒性について予測を行うためには、データベースに構造や毒性メカニズムが類似する化学物質が含まれていることの重要性を示しており、幅広い化学構造について評価を行うためには、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を構築するとともに、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について検討することでより多くの化学物質について効率的かつ信頼性の高い評価戦略を構築することが可能である。

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神経毒性が懸念されるカーバメイト系、有機リン系、16 員環マクロライド系、ピレスロイド系、ネオニコチノイド系の 5 系統について毒性プロ

ファイル、想定される mode of action、種差、神経毒性発現用量と許容 1 日摂取量 (ADI) 設定根拠無毒性量等、多角的な比較を行った結果、有機リン系・カーバメイト系、16 員環マクロライド系については構造による神経毒性が予測できる可能性が考えられた。平成 26 年度についても平成 24 年度の解析結果を応用し、ヒトへの外挿性が高いと考えられる子宮癌について、予測される機序と化学構造および作用機序の両面から解析を行った。子宮癌が誘発された剤は 7 剤であった。化学構造の異なる 5 剤で機序試験が実施されており、このうち 4 剤で発がん機序が予測できた。検討結果から機序の予測には適切な機序試験が重要であり、化学構造から子宮発がん性機序を予測することはできないと考えられた。

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性阻害を指標として神経系に対する毒性について、カテゴリーアプローチを行い、構造に基づくカテゴリー化により、作用の強弱の推測が可能であることを示唆する例を提示することができた。*In vitro* 試験系迅速試験により得られた IC<sub>20</sub> 値と ADI 値の関係に必ずしも高い相関関係は見られなかった。しかし、特異的に高い IC<sub>20</sub> 値と ADI 値を除くと、相関が認められ、カテゴリー化による毒性評価の結果を補填することに有効な手段であることが示唆され、*In vitro* 試験法の確立が必要であることも明らかとなった。

## F . 研究発表（論文発表）

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. Hayashi M, Honma M, Takahashi M, Horibe A, Tanaka J, Tsuchiya M, Morita T, Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related Chemicals. *Food Safety* 1, 32-42, 2013.
  5. Horibata K, Ukai A, Kimoto T, Suzuki T, Kamoshita N, Masumura K, Nohmi T, Honma M. Evaluation of *in vivo* genotoxicity induced by ENU, benzo[a]pyrene, and 4-NQO in the Pig-a and gpt assays. *Environ Mol Mutagen.* 54, 747-754, 2013.
  6. Kimura A, Miyata A, Honma M. A combination of *in vitro* comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis.* 28, 583-90, 2013.
  7. Stefan Pfuhler, Rosalie Elespuru, Marilyn Aardema, Shareen H. Doak, E. Maria Donner, Masamitsu Honma, Micheline Kirsch-Volders, Robert Landsiedel, Mugimane Manjanatha, Tim Singer, James H. Kim, *Genotoxicity of Nanomaterials: Refining Strategies and Tests for Hazard Identification.* *Environment Mol. Mutagen.* 54, 229-239, 2013.
  8. Kimoto T, Horibata K, Chikura S, Hashimoto K, Itoh S, Sanada H, Muto S, Uno Y, Yamada M, Honma M. Interlaboratory trial of the rat Pig-a mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody. *Mutation Research*, 755, 126-34, 2013.
  9. Sassa A, Kamoshita N, Matsuda T, Ishii Y, Kuraoka I, Nohmi T, Ohta T, Honma M, Yasui M, Miscoding properties of 8-chloro-2'-deoxyguanosine, a hypochlorous acid-induced DNA adduct, catalysed by human DNA polymerases, *Mutagenesis* 28, 81-88, 2013.
  10. Horibata K, Ukai A, Honma M., Evaluation of rats' *in vivo* genotoxicity induced by N-ethyl-N-nitrosourea in the RBC Pig-a, PIGRET, and gpt assays. *Genes and Environment*, 36:199-202, 2014.
  11. Sugiyama, K., Takamune, M., Furusawa, H., and Honma, M., Human DNA methyltransferase gene-transformed yeasts display an inducible flocculation inhibited by

- 5-aza-20-deoxycytidine. Biochemical and Biophysical Research Communications 456, 689–694, 2015.
12. 本間正充：第 II 編 薬物評価における *in silico* 手法の活用、第 4 章 変異原性の予測—医薬品中に存在する不純物の評価—「*In vitro* 毒性・動態評価の最前線」シーエムシー出版（小島肇夫監修）2013.
  13. Matsuda T, Takamune M, Matsuda Y, Yamada M, A pilot study for the mutation assay using a high-throughput DNA sequencer, *Genes and Environment*, 35, 53-56, 2013.
  14. Hironao Takasawa, Rie Takashima, Akiko Hattori, Kazunori Narumi, Kazufumi Kawasaki, Takeshi Morita, Makoto Hayashi, Shuichi Hamada: Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats ( II ) : Further investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene, *Mutation Res.*, 751, 12-18, 2013.
  15. Yamada T, Hasegawa R, Nishikawa S, Sakuratani Y, Yamada J, Yamashita T, Yoshinari K, Yamazoe Y, Kamata E, Ono A, Hirose A, Hayashi M. New parameter that supports speculation on the possible mechanism of hypothyroidism induced by chemical substances in repeated-dose toxicity studies. *J Toxicol Sci.*, 38: 291-299, 2013.
  16. Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamazoe, Y., Ono, A., Hirose, A. and 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.*, ( in press ) , 2014.
  17. Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T., Detection of initiating potential of non-genotoxic carcinogens in a two-stage hepatocarcinogenesis study in rats. *J Toxicol Sci* 39, 785-794, 2014
  18. Omura, K., Uehara, T., Morikawa, Y., Hayashi, H., Mitsumori, K., Minami, K., Kanki, M., Yamada, H., Ono, A. and Urushidani, T., Comprehensive analysis of DNA methylation and gene expression of rat liver in a 2-stage hepatocarcinogenesis model. *J Toxicol Sci*, 39, 837-848, 2014.
  19. 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.
  20. Hanafusa, H., Morikawa, Y., Uehara, T., Kaneto, M., Ono, A., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T., Comparative gene and protein expression analyses of a panel of cytokines in acute and chronic drug-induced liver injury in rats. *Toxicology*, 324, 43-54, 2014.
  21. 小野 敦, 効能の高い化粧品原料の安全性リスク評価に対する考え方 *Cosmetic stage*, 9, 21-26, 2014.

22. 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]
23. 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.
24. Takahashi, M., Ishida, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. and Hirose, A., Repeated dose and reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats. *J Toxicol Sci.*, 39, 97-108, 2014.
25. 平田睦子, 高橋美加, 松本真理子, 川村智子, 小野敦, 広瀬明彦, 小児用玩具に使用されるフタル酸エステル代替可塑剤の毒性影響. 国立医薬品食品衛生研究所報告第130号, 31-42. 2012
26. 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 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19報) - 第30回OECD高生産量化学物質初期評価会議 (2010年パリ). *化学生物総合管理* 8, 47-53. 2012
27. 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 平田睦子, 中嶋徳弥, 小野敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦. OECD化学物質対策の動向 (第20報) - 第31回OECD高生産量化学物質初期評価会議 (2010年オックスフォード). *化学生物総合管理* 8, 54-60. 2012
28. 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 平田睦子, 中嶋徳弥, 小野敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦, OECD化学物質対策の動向 (第21報) - 第32回OECD高生産量化学物質初期評価会議 (2011年パリ). *化学生物総合管理* 8, 166-172. 2012
29. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, OECD高生産量化学物質点検プログラム: 第31回初期評価会議概要. *化学生物総合管理* 8, 28-36. 2012
30. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 広瀬明彦. OECD高生産量化学物質点検プログラム: 第32回初期評価会議概要. *化学生物総合管理* 8, 37-46. 2012
31. 松本真理子, 高橋美加, 平田睦子, 小野敦, 広瀬明彦. OECD高生産量化学物質点検プログラムからOECD化学物質共同評価プログラムへ, *化学物質総合管理* 8, 173-233. 2012
32. 高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 平田睦子, 中嶋徳弥, 敦, 小., 鎌田栄一, 広瀬明彦, OECD化学物質対策の動向 (第22報) - 第1回OECD化学

- 物質共同評価会議（2011年パリ）化学生物総合管理. 9, 112-118. 2013.
33. 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, 敦, 小., 鎌田栄一, 広瀬明彦, OECD化学物質対策の動向（第23報）- 第2回OECD化学物質共同評価会議（2012年パリ）化学生物総合管理. 9, 241-247. 2013.
  34. 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1回化学物質共同評価会議概要 化学物質総合管理. 9, 92-99. 2013.
  35. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 広瀬明彦, OECD化学物質共同評価プログラム：第2回化学物質共同評価会議概要 化学物質総合管理. 9, 100-111. 2013.
  36. 松本真理子, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 長谷川隆一, 小野敦, 広瀬明彦, OECD化学物質共同評価プログラム：第3回化学物質共同評価会議概要 化学物質総合管理. 9, 222-231. 2013.
  37. 松本真理子, 大久保貴之, 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4回化学物質共同評価会議概要 化学物質総合管理. 9, 232-240. 2013.
  38. 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.
  39. 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.
  40. 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.
  41. 吉田緑, 鈴木大節, 松本清司, 代田真理子, 井上薫, 高橋美和, 森田健, 小野敦：日本における農薬等の急性参照用量設定の基本的考え方, 食品衛生学雑誌, 54（4）, 331-334, 2013.
  42. Yoshida M, Suzuki D, Matsumoto K, Shirota M, Inoue K, Takahashi T, Morita T, Ono A: Simulation of acute reference dose (ARfD) settings for pesticides in Japan. *J Toxicol Sci.* 38, 205-214, 2013.
  43. Matsushita K, Kodama Y, Saito N, Umemura T, Yoshida M. In vivo genotoxicity of Ginkgo biloba extract in gpt delta mice and constitutive androstane receptor knockout mice. *Toxicol Sci.*, 140（2）, 298-306, 2014.
  44. Kawano M, Qin XY, Yoshida M, Fukuda T, Nansai H, Hayashi Y, Nakajima T, Sone H. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  mediates di-(2-ethylhexyl) phthalate transgenerational repression of ovarian Esr1 expression in female mice. *Toxicol Lett.*, 228（3）, 235-40, 2014.
  45. 小島肇夫（監修）：森田健：動物実験代替安全性試験プロトコル集、第2章 GHS

- における代替法の基準および規制の動向、シーエムシー出版、東京、pp.11-15, 2013.
46. 小野 敦, 第 18 章 BG1Luc 細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験法. 小島 肇夫 eds. 動物実験代替安全性試験プロトコル集, シーエムシー出版(東京), pp.228-24, 2013.
47. 小野 敦, 第 3 章 化学物質の内分泌かく乱性の予測評価. バイオテクノロジーシリーズ 小島 肇夫 eds. *In vitro* 毒性・動態評価の最前線, シーエムシー出版(東京), pp.29-35, 2013.
48. 小野 敦: 化学物質の安全性評価における *in silico* 評価手法の利用について, *ILSI Japan*, 115, 8-14, 2013.
49. Hasegawa, R., Hirata-Koizumi, M., Dourson, M.L., Parker, A., Ono, A. and Hirose, A., Safety assessment of boron by application of new uncertainty factors and their subdivision. *Regul Toxicol Pharmacol.*, 65, 108-114, 2013.
50. Matsumoto, M., Yamaguchi, M., Yoshida, Y., Senuma, M., Takashima, H., Kawamura, T., Kato, H., Takahashi, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Yokoyama, K. and Hirose, A., An antioxidant, DPPD, affects labor and delivery in rats: a 28-day repeated dose test and reproduction/developmental toxicity test. *Food Chem Toxicol.*, 56, 290-296, 2013.
51. Okubo, S., Miyamoto, M., Takami, K., Kanki, M., Ono, A., Nakatsu, N., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T., Identification of novel liver-specific mRNAs in plasma for biomarkers of drug-induced liver injury and quantitative evaluation in rats treated with various hepatotoxic compounds. *Toxicol Sci.*, 132, 21-31, 2013.
52. Takahashi, M., Yabe, K., Kato, H., Kawamura, T., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ono, A. and Hirose, A., Reproductive and developmental toxicity screening test of 3-cyanopyridine in rats. *Reprod Toxicol.*, 35, 7-16, 2013.
53. Uehara, T., Horinouchi, A., Morikawa, Y., Tonomura, Y., Minami, K., Ono, A., Yamate, J., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T., Identification of metabolomic biomarkers for drug-induced acute kidney injury in rats. *J Appl Toxicol.*, 2013.
54. Uehara, T., Kondo, C., Morikawa, Y., Hanafusa, H., Ueda, S., Minowa, Y., Nakatsu, N., Ono, A., Maruyama, T., Kato, I., Yamate, J., Yamada, H., Ohno, Y. and Urushidani, T., Toxicogenomic biomarkers for renal papillary injury in rats. *Toxicology*, 303, 1-8, 2013.
55. Kobayashi T, Aso S, Koga T, Hoshuyama S, Oshima Y, Miyata K, Kusune Y, Muroi T, Yoshida T, Hasegawa R, Ajimi S, Furukawa K, Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of tert-butylhydrazine monohydrochloride in rats. *J Toxicol Sci*, 38, 177-192, 2013.
56. Kikuchi, Aso S, Koga T, Hoshuyama S, Oshima Y, Miyata K, Kusune Y, Muroi T, Yoshida T, Hasegawa R, Ajimi S, Furukawa K, Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity

- screening test of 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole in rats. *J Toxicol Sci*, 38, 759-773, 2013.
57. Kaniwa N, Sugiyama E, Saito Y, Kurose K, Maekawa K, Hasegawa R, Furuya H, Ikeda H, Takahashi Y, Muramatsu M, Tohkin M, Ozeki T, Mushiroda T, Kubo M, Kamatani N, Abe M, Yagami A, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z, Matsunaga K, Aihara M, the Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium, Specific HLA types are associated with antiepileptic drug-induced Stevens–Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese subjects. Preliminary Communication in *Pharmacogenomics*, 14( 15 ), 1821-1831, 2013.
58. 久保田領志, 田原麻衣子, 小林憲弘, 清水久美子, 阿部晃文, 中町眞美, 灘重樹, 服部晋也, 丸岡強, 嶋元直樹, 西村哲治: 固相抽出ー誘導体化 GC/MS 法を用いた EDIA の分析法の開発および水道原水・浄水・給水栓水中の存在実態, 水道協会雑誌, 82 ( 2 ), 2-9, 2013.
59. Shimizu, K., Uchiyama, A., Yamashita, M., Hirose, A., Nishimura, T., Oku, N.: Biomembrane damage caused by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *J. Toxicol. Sci.*, 38 ( 1 ), 7-12, 2013.
60. K. Shimizu, R. Kubota, N. Kobayashi, M. Tahara, N. Sugimoto, T. Nishimura, Y. Ikarashi: Cytotoxic Effects of Hydroxylated Fullerenes in Three Types of Liver Cells. *Materials*, 6, 2713-2722, 2013.
61. Takeshi Morita, Atsuko Miyajima, Akiko Hatano, Masamitsu 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, 34–49, 2014.
62. David Kirkland, Errol Zeiger, Federica Madia, Nigel Gooderham, Peter Kasper, Anthony Lynch, Takeshi Morita, Gladys Ouedraogo, Juan Manuel Parra Morte, Stefan Pfuhler, Vera Rogiers, Markus Schulz, Veronique Thybaud, Jan van Benthem, Philippe Vanparys, Andrew Worth, Raffaella 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, *Mutation Research* 769, 34–49, 2014.
63. James T. MacGregor, Roland Frötschl, Paul A. White, Kenny S. Crump, David A. Eastmond, Shoji Fukushima, Melanie Guérard, Makoto Hayashi, Lya Soeteman-Hernandez, Toshio Kasamatsu, Dan Levy, Takeshi Morita, Lutz Müller, Rita Schoeny, Maik J. Schuler, Véronique Thybaud, and George E. Johnson: IWGT Report on Quantitative Approaches to Genotoxicity Risk Assessment I. Methods and metrics for defining exposure-response relationships and points of departure ( PoDs ), *Mutation*

- Research, ( in press ) 2014.
64. James T. MacGregor, Roland Frötschl, Paul A. White, Kenny S. Crump, David A. Eastmond, Shoji Fukushima, Melanie Guérard, Makoto Hayashi, Lya Soeteman-Hernandez, Toshio Kasamatsu, Dan Levy, Takeshi Morita, Lutz Müller, Rita Schoeny, Maik J. Schuler, Véronique Thybaud, and George E. Johnson: IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment II. Use of point-of-departure ( PoD ) metrics in defining acceptable exposure limits and assessing human risk, Mutation Research, ( in press ) 2014.
65. Yoshifumi Uno, Takeshi Morita, Mirjam Luijten, Carol Beevers, Shuichi Hamada, Satoru Itoh, Wakako Ohyama, Hironao Takasawa: Recommended protocols for the liver micronucleus test: report of the IWGT working group, Mutation Research, ( in press ) 2014.
66. Yoshifumi Uno, Takeshi Morita, Mirjam Luijten, Carol Beevers, Shuichi Hamada, Satoru Itoh, Wakako Ohyama, Hironao Takasawa: Micronucleus test in rodent tissues other than liver or erythrocytes: report of the IWGT working group, Mutation Research, ( in press ) 2014.
67. Shuichi Hamada, Wakako Ohyama, Rie Takashima, Keisuke Shimada, Kazumi Matsumoto, Satoru Kawakami, Fuyumi Uno, Hajime Sui, Yasushi Shimada, Takashi Imamura, Shoji Matsumura, Hisakazu Sanada, Kenji Inoue, Shigeharu Muto, Izumi Ogawa, Aya Hayashi, Tomomi Takayanagi, Yosuke Ogiwara, Akihisa Maeda, Emiko Okada, Yukari Terashima, Hironao Takasawa, Kazunori Narumi, Yumi Wako, Kazufumi Kawasako, Masaki Sano, Nobuyuki Ohashi, Takeshi Morita, Hajime Kojima, Masamitsu Honma, Makoto Hayashi: Evaluation of the repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: Summary of the collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test ( CSGMT ) /The Japanese Environmental Mutagen Society ( JEMS ) – Mammalian Mutagenicity Study Group ( MMS ) , Mutation Research, ( in press ) 2014.

## **G . 知的所有権の取得状況**

( 該当なし )

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
本間正充	変異原性の予測—医薬品中に存在する不純物の評価—	小島肇夫	In vitro毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	東京	2013	36-43
小野 敦	化学物質の内分泌攪乱性の予測評価	小島肇夫	In vitro毒性・動態評価の最前線	シーエムシー出版	東京	2013	29-35
森田 健	GHSにおける代替法の基準および規制の動向	小島肇夫	動物実験代替安全性試験プロトコル集	シーエムシー出版	東京	2013	11-15
本間正充	哺乳類細胞を用いたin vitro小核試験	小島肇夫	動物実験代替安全性試験プロトコル集	シーエムシー出版	東京	2013	169-186
小野 敦	BG1Luc細胞を用いるエストロゲン受容体転写活性化試験	小島肇夫	動物実験代替安全性試験プロトコル集	シーエムシー出版	東京	2013	221-242

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

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
Matsumoto, M., Masumori, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Honma, M., Yokoyama, K., Hirose, A.	Evaluation of in vivo mutagenicity of hydroquinone in Muta <sup>TM</sup> mice.	<i>Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen</i>	775-776	94-98	2014
Takahashi, M., Ishida, S., Hirata-Koizumi, 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

Hironao Takasawa, Rie Takashima, Akiko Hattori, Kazunori Narumi, Kazufumi Kawasako, Takeshi Morita, Makoto Hayashi, Shuichi Hamada	Development of a repeated-dose liver micronucleus assay using adult rats (II), Further investigation of 1,2-dimethylhydrazine and 2,6-diaminotoluene	<i>Mutation Research</i>	751	12-18	2013
Hayashi M, Honma M, Takahashi M, Horibe A, Tanaka J, Tsuchiya M, Morita T	Identification and Evaluation of Potentially Genotoxic Agricultural and Food-related Chemicals	<i>Food Safety</i>	1	32-42	2013
小野 敦	化学物質の安全性評価におけるin silico評価手法の利用について	<i>ILSI Japan</i>	115	8-14	2013
Hasegawa, R., Hirata-Koizumi, M., Dourson, M.L., Parker, A., Ono, A. and Hirose, A.	Safety assessment of boron by application of new uncertainty factors and their subdivision.	<i>Regul Toxicol Pharmacol.</i>	65	108-114	2013
Mirokuji, Y., Abe, H., Okamura, H., Saito, K., Sekiya, F., Hayashi, S., Maruyama, S., Ono, A., Nakajima, M., Degawa, M., Ozawa, S., Shibutani, M., Maitani, T.	The JFFMA assessment of flavoring substances structurally related to menthol and uniquely used in Japan.	<i>Food Chem Toxicol,</i>	64	314-321	2013

Yamada T, Hasegawa R, Nishikawa S, Sakuratani Y, Yamada J, Yamashita T, Yoshinari K, Yamazoe Y, Kamata E, Ono A, Hirose A, Hayashi M.	A new parameter that supports speculation on the possible mechanism of hypothyroidism induced by chemical substances in repeated-dose toxicity studies.	<i>J Toxicol Sci</i>	38	291-299	2013
Matsuda T., Takamune M., Matsuda Y. Yamada, M.	A Pilot Study for the Mutation Assay Using a High-throughput DNA Sequencer	<i>Genes &amp; Environ.</i>	35	53-56	2013
Ono, A., Takahashi, M., Hirose, A., Kamata, E., Kawamura, T., Yamazaki, T., Sato, K., Yamada, M., Fukumoto, T., Okamura, H., Mirokuji, Y. and Honma, M.	Validation of the (Q)SAR combination approach for mutagenicity prediction of flavor chemicals.	<i>Food Chem Toxicol</i>	50	1538-1546	2012
T. Morita, M. Honma, K. Morikawa	Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity	Mutation Research	741	32-56	2012
高橋美加, 松本真理子, 宮地繁樹, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 平田睦子, 中嶋徳弥, 小野敦, 鎌田栄一, 広瀬明彦	OECD化学物質対策の動向(第21報) - 第32回OECD高生産量化学物質初期評価会議(2011年パリ)	化学生物総合管理	8	166-172	2012
松本真理子, 高橋美加, 平田睦子, 小野敦, 広瀬明彦	OECD高生産量化学物質点検プログラムからOECD化学物質共同評価プログラムへ	化学物質総合管理	8	173-233	2012