

厚生労働行政推進調査事業費補助金

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、カテゴリーアプローチの

実用化に関する研究

（H27-化学-指定-005）

平成 2 8 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成 2 9 ( 2 0 1 7 ) 年 5 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）

エームス変異原性の予測精度の向上に関する研究_____	1 3
本間 正充	

In vivo 遺伝毒性試験 QSAR の開発；新規 in vitro 染色体損傷アラートの抽出とその in vivo 染色体損傷アラートへの適用_____	2 7
森田 健	

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_____	4 1
小野 敦	

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 3
広瀬 明彦	

反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの開発_____	6 9
山田 隆志	

III.研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）_____	7 9
-------------------------------	-----

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告書

研究課題名：化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）構造活性相関および、  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究  
（H27-化学-指定-005）

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

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。本研究では、規制の対象となるすべての化学物質のヒト健康リスクを評価するためのインシリコ手法を確立することことを目的とする。具体的には、カテゴリーアプローチと、構造活性相関（QSAR）手法により、各種毒性エンドポイントを定性・定量的に予測する手法を開発、改良し、化学物質のヒト健康リスク評価に利用することを実現させる。

エームス試験に関しては、これまで構築してきた大規模データベース利用し、予測精度の向上を目指した競争的国際共同研究を実施している。H28年度はPhase IIトライアルとして3,829化学物質のエームス変異原性の予測に世界7カ国、12のQSARベンダーが提供する16のQSARモデルが挑戦した。多くのQSARツールの予測精度は比較的高く、実際のエームス試験との一致率は75-87%であった。Phase Iでの一致率は68-84%であったことから、本共同研究は成功裡に推移していることが示された。

*In silico* 評価システム Derek Nexus における *in vitro* 染色体損傷の既存の構造アラートに関し、*in vivo* 活性との相関性を評価した。構造アラートの *in vivo* 染色体損傷（小核）データセットに対する予測性を評価し、次にアラートの妥当性を評価した。構築した広範なデータベースに基づき、化学物質の生体内活性と試験デザインまたは遺伝毒性メカニズムとの関連性ととも、アラートを新規に構築あるいは更新した。その結果、Derek Nexus の *in vivo* 染色体損傷予測性は著しく改善された。

反復投与毒性については、化学構造から計算される記述子や部分構造をもとに無毒性量（解析にはNOEL（無影響量）を用いた）を基準とした毒性クラスを判定する統計的予測評価モデルを構築した。ターゲット基準値を200mg/kg/dayとした毒性クラス判定を行うモデルを構築し、既存化学物質点検データセットを外部検証用データとして予測精度の検証を行った結果、sensitivity、specificityいずれも80%を超える予測精度が得られたことから、適用範囲（評価モデルのcoverageは約70%）の化学物質のスクリーニング評価における有用性が示された。

肝毒性エンドポイントに関連するKey Eventと生体内経路プロファイルとの組み合わせにより構築した予測モデルを改良する目的で、Key Eventモデルの適用可能範囲の定義とWhichCypの予測利用、化合物の求電子性炭素原子の部分電荷、Key Eventのリードアクロ

スモデルの類似性カットオフの較正を行った。Key Eventプロファイラーの継続的改善を行うことにより、予測性能の信頼性向上が見込まれる。

OECDで2015年より開始されたIATA Case Studies Projectは、反復投与毒性を予測する手法のひとつとして、カテゴリーアプローチの行政的利用のため、適正なグルーピング手法の評価事例をメンバー国で共有し、IATAの国際的なガイダンスを作成することを目指している。そこで、我々は、アリルエステルの肝毒性をもとに、IATAケーススタディの文書を作成し、メンバー国の専門家によるレビューを受けた。

**キーワード：**定量的構造活性相関(QSAR)、カテゴリーアプローチ、データベース、遺伝毒性、反復毒性、肝毒性

#### 研究分担者

本間 正充

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部  
部長

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

小野 敦

岡山大学・医歯薬学総合研究科

教授

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

山田 隆志

国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部  
室長

リーアプローチは、コンピュータトキシコロジーの重要な研究分野であり、有害作用を引き起こす可能性が高い化学物質を、その化学構造から *in silico* で予測する手法である。これら手法は統合型毒性評価系の重要な構成要素の1つであり、安全性評価が必要とされる化学物質の優先順位付けや絞り込みに有用である。また、毒性試験における動物利用の大幅な削減にも貢献できる。

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QSARやカテゴリーアプローチ手法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基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。

エームス変異原性に関しては、これまで我が国で行われたエームス試験データを収集し、大規模データベースを再構築してきた。本データベースもつ化学物質の種類は世界最大規模になると予想され、かつ、個々の試験はOECDガイドラインに従い、GLP管理下で行われた試験であるため、信

#### A . 研究目的

化学物質の規制に関わる国際機関や、各国規制当局の最近の関心の焦点は、規制の対象となるすべての化学物質を実験的に試験することなく、有害作用を引き起こす化学物質を同定するための単純なスクリーニングツールを確立することにある。定量的構造活性相関(QSAR)、およびカテゴ

頼性の高いデータベースである。このデータをベンチマークデータセットとして、世界中のQSARベンダーに提供し、全てのQSARツールの予測率の向上を目指した国際共同研究を実施している（本間）。

*In vitro*染色体損傷試験で陽性結果が得られた場合、当該化学物質は遺伝毒性を示す可能性がある。しかし、多くの場合、*in vitro*試験で認められた結果が*in vivo*遺伝毒性試験でも反映されるかどうかの予測は容易ではない。そこで、種々の情報と化学物質の想定曝露条件を組み合わせ、最適な*in vivo*試験デザインによる試験結果を基に、個々の*in vitro*染色体損傷アラートと*in vivo*活性との関連性を評価し、最適な染色体損傷アラートを構築することを目的とした（森田）。

反復投与毒性については、評価対象物質について既知情報からの評価が可能であるか判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、化学構造からの評価が可能と判断された物質については化学構造を指標として可能な限り効率的なリスク評価を行う。類似物質について毒性情報が得られておらず化学構造のみからの評価が困難と判断された化学物質について、基本的な化学構造的特徴と短期毒性試験結果をもとにした毒性クラス判定を行い、段階的評価スキームを構築することにより、信頼性の高い効率的リスク評価手法の開発を目的とした研究を進めている。本年度は、リスク評価において重要となる無毒性量評価のための化学構造記述子を用いた統計学的評価モデルの構築と検証を行った（小野）。

これまで肝毒性エンドポイントに関連するkey eventを予測し、生体内経路の攪乱に関与する化合物群のプロファイルと組み合

わせることにより予測モデルの構築を試みてきた。このプロファイラーは肝毒性反復投与データセットに対して比較的良好な感度を示したが（60%）、特異度は低かった（44%）。これは、特定のKey Eventのアクティブ化が臓器毒性につながる代謝に関連する因子について、ほとんど考慮しなかった可能性もある。今年度は、各Key Eventモデルの適用可能範囲の定義とWhichCypの予測利用、化合物の求電子性炭素原子の部分電荷、Key Eventのリードアクロスモデルの類似性カットオフの較正による改良を行った（広瀬）。

カテゴリーアプローチは、反復投与毒性のような複雑な毒性エンドポイントを予測する手法のひとつとして期待されているが、行政的受け入れは十分に進んでいない。検証の不足、成功事例の不足、国際的なガイドラインがないこと、本手法を理解する評価者が不足していることが理由として挙げられる。本研究では、カテゴリーアプローチによる反復投与毒性の予測事例を本プロジェクトへ提案し、専門家レビューを受けることにより、本手法開発促進のため国際貢献を果たすと共に、化審法スクリーニング評価へ本手法を適用するときの課題を整理することを目的とする（山田）。

## B. 研究方法

### B.1. エームス変異原性の予測精度の向上（本間）

安衛法によって実施された約20,000化学物質のエーム試験結果を精査し、QSARの開発に有用である12,451化学物質（内エームス陽性1,776化合物）をデータベース化した。そのうち3,829化合物のデータを共同研究のPhase IIデータとした。これらエーム

ス試験の結果以下の3つに分類される。

- Class A: エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg以上の強い陽性と判定される物質 (253物質)
- Class B: エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質 (309物質)
- Class C: エームス試験における陰性判定物質 (3,267物質)

Phase II 国際共同研究は世界7カ国、12のQASRベンダーが共同研究に参画した。合計16のQSARツールが評価に提供され、Phase IIトライアルにチャレンジした

#### B.2. 新規*in vitro*染色体損傷アラートの抽出とその*in vivo*染色体損傷アラートへの適用 (森田)

選択した *in vivo* 染色体異常試験のデータセットを整理・統合し、この大規模データセットを Derek Nexus において *in vitro* 染色体損傷のエンドポイントに対して処理し、Derek Nexus の各 *in vitro* 染色体損傷アラートの *in vivo* データに対する予測性能を評価した。 *In vitro* アラートが *in vivo* データを十分に予測し、かつ、同じメカニズムが関与すると考えられる場合には、当該アラートを拡大し *in vivo* 活性の予測に適用した。

#### B.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 (小野)

モデル構築のためのデータセットとして Munro ら (Munro IC et.al., (1996) Food and Chemical Toxicology, 34, 829-867) により、Cremer ルールの検証に用いられたデータセットを用いた。予備的なモデル構築のため評価ターゲット用量

200mg/kg/day で用意したデータセットを用い、ADMEWORKS/ModelBuilder により記述子を用いた約 2000 モデルを構築して、内部検証より予測精度が高かった 4 モデルの予測結果を用いた。最終的なモデル構築においては、モデルの適用範囲となる分子量を MW=200~500 と MW=100~600 とした 2 モデルを構築した。モデル構築においては、Munro データセットから各モデルの適応範囲に該当する物質を学習母集団として選択して用いた。構築した評価スキームについて、化審法既存点検試験により毒性試験が実施された物質を外部検証用データとして、予測精度の検証を行った。

#### B.4. 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 (広瀬)

リードアクロスモデルに用いる所定の当該 Key Event データセットの一連の RDKit 記述子の最大値と最小値を考慮し、各 Key Event モデルの適用可能範囲を定義した。WhichCyp は、Lhasa 社が KNIME 解析プラットフォームに統合したウェブサービスである。WhichCyp 予測アウトカムは、プロファイラーにおいて、DX 知識ベースにマッピングされた Key Event に統合した。Key Event モデルについてのリードアクロスは、類似性係数スコアのカットオフ (0.69) 以上の化合物を検討対象としている。Key Event データセットに「陽性」および「陰性」の化合物の両方がある場合、最もバランスのとれた正確度を達成するために、5 層交差バリデーション法を用いてそれらの類似性カットオフを較正することにより、Key Event のリードアクロスモデルを改良した。

#### B.5. 反復投与毒性のカテゴリアプローチモデルの開発 (山田)

カテゴリーアプローチによる反復投与毒性の評価事例を継続的に提案しており、本研究ではそのうちのひとつ（アリルエステルの肝毒性）をもとにして、以下のOECDのIATAテンプレートに従って、IATAケーススタディの文書を作成し、メンバー国の専門家によるレビューを受けた。

\*OECD IATA テンプレートの構成：

- ・ 目的
- ・ カテゴリーアプローチの仮説
- ・ カテゴリーメンバー
- ・ データギャップ補完の正当化
- ・ データギャップ補完の戦略と結論
- ・ 引用文献
- ・ Annex

\*専門家レビュー：

ケーススタディの査読を受け、コメントに従って適宜修正した。さらに、ケーススタディ作成者、査読者、並びにOECD事務局による対面会議によって、ケーススタディのレビュー結果について議論が深めた。

## C. 結果

### C.1. エームス変異原性の予測精度の向上（本間）

2016年8月までに12のQSARベンダーに3,829化合物の情報を送付した。情報は、管理番号、CAS#、化学物質名、SMILESである。2016年11月末までに参加機関のQSARツールによるエームス試験判定予測結果を回収し、予測精度を評価した。最終的にはすべての判定結果を“陽性 (positive) ”、“陰性 (negative) ”、“不適用(unapplicable) ”に分類した。不適用化合物は、予測対象化合物からは外し、陽性もしくは陰性と判定されたもので“適用率 (applicability) ”を計算した。基本的な能力評価として、感度

(Sensitivity)、特異度 (Specificity) を用いた。感度はエームス陽性を陽性と判定できる能力で、さらに変異原性の強い物質の感度 (A-Sensitivity) を別に計算した。

15のモデルの内、Phase Iの結果をトレーニングセットしてモデルに組み込んだことを確認できたモデルは8モデルであった。DEREKやToxtreeのような知識ベースQSARモデルはルールの開発に時間がかかるためモデルの改良は困難であった。一方、統計ベースモデルは簡単に組み入れることができた。特に高いA-sensitivityを示したのはMCASEのCASEUltraであり、89.5%であった。また、Specificity85.6%、Concordance83.5%と極めて良好な結果を示した。他に高いA-sensitivityを示したのはプルウスのSymmetry(81.7%)、MCASEの知識ベースGT-Expert(84.1%)、ブルガス大のTIMESで(80.0%)、高いSpecificityを示したのはSwetoxのAZAMES(92.8%)、ラーサのDEREK(90.1%)、ブルガス大のTIMES(93.5%)、リードスコープのLSMA(90.6%)であった。概して、Phase IではA-Sensitivity 51-81%、AB-Sensitivity 39-70%、Specificity 65-92%、Concordance 68-84%、これがPhase IIでは59-90%、45-72%、78-93%、75-87%と全て増加した。このことはこの共同研究が順調に推移していることを示している。

### C.2. 新規in vitro染色体損傷アラートの抽出とそのin vivo染色体損傷アラートへの適用（森田）

本研究前ではDerekにおけるin vivo染色体損傷の予測能力は限定的で、知識ベース内の同エンドポイントに対するアラートはわずか10種であった。本研究の結果、in vivo

染色体損傷のエンドポイントに関するアラートが33種類（既存のアラート10種と本研究で開発した新規アラート23種）構築され、さらに、*in vitro*染色体損傷に関するアラート9種が更新された。

### C.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（小野）

Munroらのデータセット(613物質)から、解析ソフトADMEWORKS/ModelBuilder (MB)で対応できない金属系、イオン系及び混合物を除外した505物質のうちNOEL基準200で分類された483物質(強毒性:345物質、弱毒性138物質)を学習母集団として、パラメータを変更しながら約2000回のモデル構築を行い、予測精度の高い上位4モデルを用いて、既存点検データセット183物質、Munroデータセット483物質の分類を実施して、基本的な物性の予測精度の関連を検証した。分子量が200未満もしくは500以上の物質では予測精度が悪く、一方、水素結合供与基の有無により予測精度に違いがあることが示された。

分子量の適用範囲を限定したモデルとして構築した分子量200~500、100~600を対象としたモデルの分子量適用範囲の物質については、分子量を限定したモデルと水素結合供与基の有無によるモデルの2モデルの評価結果が一致した場合のみ評価結果を採用し、分子量適用範囲外の物質については、水素結合供与基の有無によるモデルの評価結果のみから評価を行う評価スキームを構築した。内部検証結果ではいずれのケースでもsensitivityは90%以上を超えた。specificityは、評価対象を分子量200~500の物質のみに限定した場合には85%、分子量の高いものに評価対象を広げたケースで

は、74~75%であった。一方、外部検証では分子量100~600のモデルを用いた場合、sensitivity = 92%、specificity = 80%を達成した。分子量200~500モデルにおいても同程度の予測精度が得られたものの、coverageは30%であった。これは、既存化学物質データセットには分子量200未満の化学物質が多く含まれるためである。

### C.4 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（広瀬）

WhichCypをKey Event プロファイラーに統合した結果、特異度が上昇し、感度が低下した。Key Event モデルの陽性適中率が上昇した反復投与毒性データセットを作成したプロファイラーで処理して毒性予測を行った結果、感度は57%で、特異度は44%となった。プロファイラーに用いた30のKey Event データセットがあり、このうち16は陽性および陰性両方の注釈を包む。12のリードアクロスKey Event モデルのカットオフ値を較正した。選択したリードアクロスKey Event モデルに対して最もバランスのとれた正確度が得られるカットオフを求めた。カットオフ値は0.45から0.85の範囲にあり、それらのうち2つ、すなわちMMP阻害物質とPPARdelta結合物質については、経験に基づく値0.69に非常に近い。これらの較正したカットオフ値をKey Event プロファイラーに統合した。

### C.5. 反復投与毒性のカテゴリアプローチモデルの開発（山田）

今回のケーススタディは、化審法の化学物質のリスク評価におけるハザード同定に適用するために作成された。肝毒性物質が、アシルエステルの共通代謝産物であるアク



ロレインである AOP の仮説に基づいて、反復投与時の肝毒性エンドポイントについて、19 のアリルエステルから構成されるカテゴリーが形成された。カテゴリーは、直鎖アルキル鎖を有するアリルエステル、および分岐アルキル鎖を有するアリルネステルの 2 つのサブカテゴリーに分類された。試験データを持たない 15 のカテゴリーメンバーの NOAEL 値を、リードアクロスによって予測した。本ケーススタディは、スクリーニング評価、優先順位付け、分類などの加盟国の規制目的のために使用することができるであろうと考えられた。本ケーススタディの結果は、REACH 登録のための情報要件を満たさない可能性が高いので、REACH の登録目的には使用できない。しかし、近い将来、そのようなケーススタディの結果は、日本の化審法のもとで使用されうると考えられる。

## D. 考 察

### D.1. エームス変異原性の予測精度の向上 (本間)

今回の3,829化合物の予測精度に関しては、ICH-M7を契機にエームス試験の予測性の向上に積極的に取り組んでいるラーサ社、マルチケース社、リードスコープ社の QSAR ツールの予測性に期待が持たれた。3社は、知識ベース、統計ベースの両者のモデルをコマーシャルベースで提供している。概して、3社の QSAR ツールは Sensitivity、Specificity とともにバランスがよく、81~86% の一致率 (Correspondence) を示した。特に、規制当局が懸念する A-Sensitivity に関しては、MCASE の CASEUltra が 89.5% を示し、ROC 解析でもバランスの取れた予測結果を示した。しかしながら、

CASEUltra の Applicability は 65.3% と他の QSAR ツール (80-100%) に比べて著しく低かった。予測率を上げるために Domain 構造を限定することは、Out of Domain となり評価不可能な状況になることが多くなると考えるが、安全性を担保する考えからすれば正当で有る。一方、Out of Domain となった場合は実際の試験を求められるため、スクリーニングの役割としてはその利用価値が低下する。着実にデータを蓄積し、ケミカルスペースを拡大し、確実な構造アラートを開発していくストラテジーが重要である。

同様にブルガス大学の TIMES モデルも高い Sensitivity を示したが、適用ドメインが 18% と極めて低かった。TIMES には薬物代謝モデルが組み込まれているが、本プロジェクトでは化学物質の代謝情報に関しては開示していない。今後、TIMES のようなモデルの向上には、エームス試験の S9 の条件の有無、仕様菌株の情報などが必要と考えられる。

A-Sensitivity が低いツールとして、前回、スウェーデンの AZMES、スペインの Symmetry、ブルガリアの AMBIT、日本の ADMEWORKS が挙げられた。このうち、AZMES と Symmetry に関しては、Phase II で 20% 以上の A-Sensitivity の向上が認められた。これはモデルの改良が着実に進んでいることを示している。概して、Phase I の結果をモデルにトレーニングデータとして取り入れたツールで、大幅な予測率の向上が認められた。

### D.2. 新規 *in vitro* 染色体損傷アラートの抽出とその *in vivo* 染色体損傷アラートへの適用 (森田)

特異的メカニズムを介して染色体損傷を引き起こす化合物クラスに関して、知識ベースに既存の知識 (*in vitro* 染色体損傷アラート) と *in vivo* 染色体損傷データセットとを組み合わせ活用することにより *in vivo* 染色体損傷に関する予測 *in silico* システムを開発するのが本研究のアプローチある。しかしながら、残りのアラートを評価する利用可能な *in vivo* データが限られているため、*in vivo* 染色体損傷のエンドポイントに対する感度を向上させるためには本研究の手法には限界がある。今後は関連する他のエンドポイントに対するアラートの調査や *in vivo* データのみに基づくアラートの開発といったアプローチが、*in vivo* 染色体損傷エンドポイントの予測能向上に寄与すると考えられる。

#### D.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 (小野)

本年度は、化学構造から計算される記述子や部分構造をもとに無毒性量 (解析には NOEL (無影響量) を用いた) を基準とした毒性クラスを判定する統計的予測評価モデルを構築してスクリーニング評価への適用性について検討を行った。本研究では、分子量適用範囲を、200~500と100~600に限定した評価モデルと、水素結合供与基の有無を適用範囲とした評価モデルを構築し、これらを組み合わせ評価を行う評価スキームを構築した。また、モデル構築には、既存化学物質データセットより多くの化学物質情報を含むMunroらの報告による毒性試験データセットを学習母集団として用い、ターゲット基準値を200mg/kg/dayとした毒性クラス判定を行うモデルを構築し、既存化学物質点検データセットを外部検証用

データとして予測精度の検証を行った。結果として、分子量適用範囲を、100~600の評価スキームを用い評価対象分子量を100~600とした場合において、ある程度のカバー率 (68%) を確保した高精度の予測が可能であることが示された。さらに、分子量適用範囲100~600の評価スキームでは全物質対象の評価結果においても sensitivityは、若干下がるものの sensitivity、specificityいずれも80%を超える予測精度が得られたことから、本研究で構築した評価スキームはスクリーニング評価において十分実用的であると考察される。一方で、分子量適用範囲100~600の評価スキームでは全物質対象とした場合でも、coverageが77%であった。これは、分子量適用範囲内の物質のうち、分子量モデルと水素結合供与基モデルの評価結果が一致しないため判定結果が得られなかった物質が多くあることによる。

#### D.4. 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 (広瀬)

反復投与毒性試験データの肝毒性プロファイラーにより予測した「偽陽性」の数は68減少した一方で、「偽陰性」の数は45増加した。全般的に、正確度は変化しなかったにも関わらず、予測はより良好なクオリティの状態にあるという傾向が見られた。また、これまでの作業が円滑に行えるように、Instant JChemを利用して可視化ツールのプロトタイプを作成した。このツールは、Key Eventプロファイラーの結果を示すわかりやすい明確な方法を提供するとともに、潜在的な肝毒性物質としてのクエリー化合物について決定する際に役立つと考えられる。プロファイルが示されなかったクエリ

ー化合物は、Key Eventプロファイラーにおける不足を示唆しており、こうした不足に対して追加のデータを検索することが必要となる。例証化合物としては、TO901317、ロテノンおよびジルロタピドが挙げられる。TO901317はLXR核受容体の既知のアゴニストであり、実際、現在のプロファイラーにはLXRアゴニストに関するデータが全くない。この可視化ツールを用いる同じ手法では、Key Eventプロファイラーがカバーしない毒性のメカニズムに対しても適用できる。定量的な方法で可視化ツールのプロトタイプを用いて行う予測の正確度/精密度を明確に示すのは困難であることがわかったにも関わらず、このアプローチによって、知識/データの不足を埋められるおよび/または見つけ出せる可能性がある。予測の正確度の質的評価は、許容可能であることがわかった。今後の研究として感度と特異度の両方を向上させるためには、偽陰性や偽陽性の化学物質クラスの解析等を行うことによって、様々なkey eventを予測する方法をさらに調査することが有用であることが示された。

#### D.5. 反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの開発 (山田)

2015年度のOECD IATA Case Studies Project (第1サイクル)では、本ケーススタディを含めて計4つのケーススタディが提出され、レビューが行われた。レビューの経験から、ケーススタディが使用されるスコープおよびフレームワークを非常に明確に記述することが必要かつ重要であることが強調された。これは、ケーススタディによってどのような側面が対処されるか、どのレベルのレポートが要求され、

どの程度の不確実性が受け入れられるかについての情報を提供する。レビューによってケーススタディで特定された不確実性のいくつかは、サブカテゴリーの組み込み、より詳細な議論の提供、QSAR予測のサポートなど、さまざまな方法で低減された。これは、ケーススタディを改善するのに不確実性を考慮することが有用であることを示しているが、他方で不確実性は残っており、この場合、不確実性の分析は、レビューアが不確実性の影響とケーススタディの使用目的に関する不確実性の許容度を考慮するのに役立った。不確実性の記述とコミュニケーションの重要性は、IATAのさらなる経験を得るための重要な分野として特定された。

#### **E. 結論**

エームス試験予測QSARモデルの向上を目指した国際共同研究を実施している。日本で実施された安衛法に基づくエームス試験データから、QSARモデルの開発に有用と考えられる、12,451化学物質をデータベース化した。H28年度はこのうち3,829化合物について、エームス試験結果の予測精度を競うPhase IIトライアルを行った。世界7カ国から、12のQSARベンダーがこの国際競争に参画し、21のQSARツールについて予測精度の評価を行った。多くのQSARツールの予測精度はPhase Iトライアルと比較して大幅向上された。特に、強いエーム陽性化学物質見逃す確率は大きく減少した。このことは、本共同研究が成功裡に推移していることを示すのものである。今後、さらにPhase IIIトライアルを実施し、さらなる予測性の向上を目指す。

*In vivo*染色体損傷のエンドポイントに関

するアラートが33種類構築され、さらに、*in vitro*染色体損傷に関するアラート9種が更新された。

反復毒性については、化学構造から計算される記述子や部分構造をもとに無毒性量（解析にはNOEL（無影響量）を用いた）を基準とした毒性クラスを判定する統計的予測評価モデルを構築した。モデル構築には、Munroらの報告による毒性試験データセットを学習母集団として用い、ターゲット基準値を200mg/kg/dayとした毒性クラス判定を行うモデルを構築し、既存化学物質点検データセットを外部検証用データとして予測精度の検証を行った結果、分子量適用範囲を、100~600の評価スキームにおいて、sensitivity、specificityいずれも80%を超える予測精度が得られた。構築した評価モデルの適用範囲の化学物質については、評価モデルから信頼性の高いスクリーニング評価が可能であることが示された。本研究で構築を進めている、化学構造から適用可能な評価手法を判定し、評価を行う評価スキームは、評価未済みの化学物質のスクリーニング評価の効率化へ寄与するものと結論される。

肝毒性につながるKey Eventの統計学的なモデル化について、リードアクロス法の類似性閾値を較正することで改善され、適用可能範囲ルールを肝毒性プロファイラーに統合した。リードアクロスKey Eventモデルの適用可能範囲は、化学的記述子(RDKit)の最小値と最大値で定義した。肝毒性のメカニズムが既知の化学物質に対する予測で例証されるInstant JChemを用いて、プロファイラー予測用の可視化ツールを設計することとした。このツールは、Key Eventプロファイラーの結果を示すわかりやすい明確な方法を提供するとともに、

潜在的な肝毒性物質としてのクエリー化合物に関して決定する際に役立つ。

IATAケーススタディの文書については、メンバー国の専門家より、カテゴリーメンバーとその代謝、毒性、作用機序などのデータの収集の方法の詳述、リードアクロスを行うときの類似物質の選択の適切性、構造的な差異が別の毒性を引き起こす可能性についての説明、カテゴリーの構造領域の明確化、リードアクロスに用いる試験データの信頼性を評価すること、ヒト関連性について情報を追加し補強すること、不確実性の半定量化などが求められ、修正版文書でこれらを反映させ、対面会議で了承を得た。いずれもカテゴリーアプローチの透明性、再現性、信頼性を確保するために重要であり、今後、本手法を別のカテゴリーに適用するときにも有用である。ケーススタディを通じて共有された経験は、OECD加盟国におけるカテゴリーアプローチを含むIATAの使用を拡大するための方法として有望である。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. Manganelli S, Benfenati E, Manganaro A, Kulkarni S, Barton-Maclaren TS, Honma M; New quantitative structure-activity relationship models improve predictability of Ames mutagenicity for aromatic azo compounds. *Toxicol Sci.* 153, 316-326 (2016)

2. Petkov PI, Schultz TW, Donner EM, Honma M, Morita T, Hamada S, Wakata A, Mishima M, Maniwa J, Todorov M, Kaloyanova E, Kotov S, Mekenyan OG; Integrated approach to testing and assessment for predicting rodent genotoxic carcinogenicity. *Journal of Applied Toxicology*, 36, 1536-1550 (2016)
  3. Benfenati E, Belli M, Borges T, Casimiro E, Cester J, Fernandez A, Gini G, Honma M, Kinzl M, Knauf R, Manganaro A, Mombelli E, Petoumenou MI, Paparella M, Paris P, Raitano G; Results of a round-robin exercise on read-across. SAR and QSAR in Environmental Research, 27, 371-384 (2016)
  4. Morita T, Hamada S, Masumura K, Wakata A, Maniwa J, Takasawa H, Yasunaga K, Hashizume T, Honma M; Evaluation of the sensitivity and specificity of in vivo erythrocytemicronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. *Mutat. Res.*, 802, 1-29 (2016)
  5. Ahlberg E, Amberg A, Beilke LD, Bower D, Cross KP, Custer L, Ford KA, Van Gompel J, Harvey J, Honma M, Jolly R, Joossens E, Kemper RA, Kenyon M, Kruhlak N, Kuhnke L, Leavitt P, Naven R, Neilan C, Quigley DP, Shuey D, Spirkl HP, Stavitskaya L, Teasdale A, White A, Wichard J, Zwickl C, Myatt GJ; Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: A case study using aromatic amine mutagenicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 77, 1-12 (2016)
  6. Amberg A, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cross KP, Custer L, Dobo K, Dowdy E, Ford KA, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Nicolette J, Plaper A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Spirkl HP, Stavitskaya L, Teasdale A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Myatt GJ; Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol.* 77, 13-24 (2016)
  7. 大内 淳子、山田 隆志;化粧品安全性評価のためのコンピューター予測モデルの活用. *Cosmetic Stage*10, 1-8 (2016)
  8. Takahashi M, Matsumoto M, Yamada T, Ono A, and Hirose A; Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances, *Bull. Natl Inst. Health Sci.*, 134, 79-83 (2016)
- 学会発表
1. Honma M; AMES/QSAR International Collaborative Study.

- 17th International Conference on QSAR in Environmental and Health Sciences (2016.6、マイアミ、米国)
2. Ono A, Ciloy J, Matsumoto M, Takahashi M, Kawamura T and Hirose A: Development and validation of a QSAR model to classify chemicals for toxic potency of sub-acute repeated dose toxicity. 17th International Conference on QSAR in environmental and health sciences (2016.6、マイアミ、米国)
  3. 本間正充、増村健一、森田健；遺伝毒性発がん物質のリスク評価 第43回日本毒理学学会学術年会(2016.7、名古屋)
  4. Honma M; Current Topics in Genotoxic Toxicology. Symposium on Genetic Toxicology and Developmental Toxicology in Chinese Society of Toxicology (2016.8、ハイラル、中国)
  5. Ono, H. Jinno and A. Hirose: Evaluation of the OECD QSAR Toolbox in the screening of chemical sensitizer. The 14th International Congress of Toxicology (2016.10、Mメリダ、メキシコ)
  6. 本間正充；何故、今、変異原性in silicoなのか？日本環境変異原学会第45回大会(2016.11、つくば)
  7. Rathman JF, Benfenati E, Honma M, Kitazawa A, Raitano N, Yamada T, Yang C; Models Combined by Decision Theory to Enhance Outcomes in DGM/NIHS Ames/QSAR International Collaborative Study. 56th Annual Meeting of Society of Toxicology (2017.3、バルチモア、米国)
  8. 福地準一、北澤愛莉、平林啓司、本間正充；(Q)SARによる変異原性不純物の評価に対するエキスパートレビューに関する研究 日本薬学会第137年会 (2017.3、仙台)
  9. Yamada T, Honma M, and Hayashi M; Recent advances in Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) and read-across for chemical safety assessment. ICCA-LRI and NIHS Workshop (2016.6、淡路島)
  10. Yamada T, Hayashi Mand Hirose A; Development of read-across for chemical safety assessment. Asian Congress 2016 on Alternatives and Animal Use in the Life Science (2016.11、唐津)
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

**平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書**

研究課題名：化学物質のヒト健康リスク評価における(定量的)構造活性相関およびカテゴリー  
アプローチの実用化に関する研究（H27-化学-指定-005）

**分担研究課題名：エームス変異原性の予測精度の向上に関する研究**

研究分担者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長  
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

**研究要旨**

エームス試験予測 QSAR モデルの向上を目指した国際共同研究を 2014 年から実施中である。日本で実施された安衛法に基づくエームス試験データから、QSAR モデルの開発に有用と考えられる 12,451 化学物質をデータベース化した。平成 28 年度はこのうち 3,829 化合物について、エームス試験結果の予測精度を競う Phase II トライアルを行った。世界 7 カ国から、12 の QSAR ベンダーがこの国際競争に参画し、17 の QSAR ツールについて予測精度の評価を行った。多くの QSAR ツールの予測精度は比較的高く、実際のエームス試験との一致率は 75-87%であった。Phase I での一致率は 68-84%であったことから、本共同研究は成功裡に推移していることが示された。様々な構造を持つ化学物質での試験データを収集し、トレーニングデータとして QSAR ツールに組み込み、ケミカルスペースを拡大させることが、QSAR の予測精度の向上に繋がるものと考えられる。Phase II の結果は各 QSAR ベンダーで共有し、更に実際のエームス試験結果を開示した。QSAR ベンダーはこの結果を取り入れ、次年度の Phase III トライアルに向けてモデルの改良を行う。このような公正な競争により各 QSAR ツールの予測性が格段に向上することが期待される。

**A . 研究目的**

EU 各国および米国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（QSAR）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 QSAR の利用を明文化したICH-M7ガイドラインが2015年1月から適用されたことから、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。

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部ではこれまで我が国で行われた エームス試験データを収集し、大規模データベースを再構築してきた。本エームス試験データベースは2万化学物質以上からなり、現在では世界最大規模のデータベースである。また、個々の試験はOECDガイドラインに従い、GLP管理下で行われた試験であるため、その信頼性も高い。この最大且つ、信頼性

の高いエームス試験データはエームス試験ベンチマークデータセットとして内部利用している。このデータベースの中で、未公開データを、外部評価データとしてQSARベンダーに提供し、世界中で汎用されているQSARツールの予測性の検証と、改良を行うことが本研究の目的である。

未公開のエームス試験データは主に安衛法に従って、化学・製薬メーカーが要求され、自社、もしくは外部の試験受託機関で、GLPで試験されたデータである。安衛法では、労働者が曝露する可能性がある年間100kg以上の中間体を含む化学物質について試験をすることを求めており、その化学物質の種類は多岐にわたるため、極めて有用なデータベースである。安衛法のエームス試験データは2万化合物を超えるが、このうち、高分子ポリマー、混合物、金属化合物を除き、QSARモデルの開発に有用と考えられる12,199の低分子化学物質のデータベースを構築した。

国際共同研究では、この試験データを3回に分けて、エームス試験結果を伏せたままでQSARベンダーに提供する。各QSARベンダーは計算した予測結果を、本研究班に伝え、本研究班でその予測率を評価する。評価後、各QSARベンダーに実際のエームス試験結果を開示する。各QSAR開発者はその結果を基に、QSARモデルの改良や、トレーニングセットのアップデートを行い、次のトライアルに参加する。このようなトライアルを繰り返すことにより、全てのQSARツールの予測性の向上が期待できる。

H27年度は、3,950化合物について第1回目(Phase I)のトライアルを行った。H28年度はこのPhase Iトライアルの結果を各QSARモデルに組み込み、新たに3,840化合

物についてチャレンジを行った(Phase IIトライアル)。Phase IIでの予測結果は、Phase Iよりも向上していることが期待できる。

## B. 研究方法

### B-1. エームス試験データ

労働安全衛生法に基づき実施された変異原性試験の結果評価書から入手した、Ames試験判定結果約20,000のうち、12,451を電子データ化し、CAS番号がある約8,009物質について、QSARで使用できるようにSMILES形式の構造式情報を追加したEXCELファイルを作成し、さらにQSARソフトが直接読み込めるSDファイル形式に変換した物を作成した。

国際共同研究Phase IIでは、上述の8,009物質のうち、Phase Iで使用した4,018のデータを除く、3,991物質のデータをまとめ、各QSARベンダーにエームス試験結果の予測計算の依頼を行った(表1)。その後、QSARベンダーのクレームにより、データを精査した結果、評価から162物質を除外した。除外した162化合物の理由は以下の通りである。

#### 1) 混合物

混合物は、多くのQSARモジュールでOut of domainもしくは計算不可とされ、予測計算が行われない。一部のQSARソフトでは、計算は可能なものの、フラグメント毎に単体として分離され、分子量の一番大きなフラグメントのみ予測計算が行われることから、正しい予測が行われない。以上の理由で、予測計算が正しく実施されないため除外した。

#### 2) イオン結合がある物質

イオン結合がある場合ほとんどのQSARソフトで、予測計算前のQSAR最適化過程



でイオンの中性化と分離が行われる。それにより、ケース1および2では記載のような問題が生じるため除外した。一方、ケース3および4では記載のように処理することとし、除外しなかった。

- ケース1：物質内のフラグメントがイオン結合で繋がれており、QSAR最適化過程の中性化の後、混合物とみなされる場合、混合物と同様の処理を行い除外した。
  - ケース2：HCl、HBr、ナトリウム等の塩、水和物。QSAR最適化過程で中性化後に塩が分離され、Phase II データベース内で単体の物質と重複する場合は除外した。
  - ケース3：QSAR最適化過程の中性化で分離しない場合。QSAR最適化過程でエラーが出ないように修正を加え、評価対象物質とした。修正内容については以下に記載する。
    - i. ラジカルについて、構造式を直せるものは直した。不自然に電荷が残った場合は編集履歴に “ラジカル” と記載した。
    - ii. 共鳴構造の一部等、標準的ではないSMILESを標準的なものに変えた。記載ミスではないものの、QSARソフトによってはエラーを出す事から修正した。
    - iii. ANEIdataのデータソースに問題があったCAS#を修正した。これは記載ミスであった。
  - ケース4：ケース2と同様の物質であって、QSAR最適化過程で中性化後に塩が分離されても他の物質と重複しない場合。データベースに残し、評価対象物質とした。
- 3) その他(Phase IIデータに含めた物質、重複除外物質)

- ANEIdataのデータソースに問題が見つかった物質の内、記載ミスにより構造式に問題がある場合はPhase IIデータからは除外した。修正したものを次回Phase IIIデータに加えた。
- データベース内で同じ物質を再試験していたデータを重複物質として除外した。

## B-2. 評価対象物質

3,991化合物の内、162化合物を除外した3,829化合物を評価対象とし、Phase IIチャレンジ化合物とした(表1)。これらエームス試験の結果以下の3つに分類される。

- Class A：エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg以上の強い陽性と判定される物質(253物質)
- Class B：エームス試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質(309物質)
- Class C：エームス試験における陰性判定物質(3,267物質)

## B-3. 共同研究参加機関

Phase II 国際共同研究は世界7カ国、12のQASRベンダーが共同研究に参画した。合計17のQSARツールが評価に提供され、Phase IIトライアルにチャレンジした(表2)。

## C. 結果

### C-1. 評価結果の判定基準

各QSARモデルの陽性、陰性の判定予測表記方法は統一されていない。判定予測表記の他に、In Domain、Out of Domain、判定不能、予測不能についても、各QSARツールで表記方法が異なり、判定予測の条

件付けも異なる。ブルガス大のTMESとアルタミラのChemTunesは他のQSARツールの様に判定予測にIn Domain、Out of Domainが含まれた表記ではなく、判定予測とDomain情報が別々である。特にChemTunesには判定予測の結果があってもOut of Domain = no ならば予測不能扱いの物質も存在する。上記の分類は最終的にはすべての判定結果を“陽性(positive) ”、“陰性(negative) ”、“不適用(unapplicable) ”に分類した。不適用化合物は、予測対象化合物からは外し、陽性もしくは陰性と判定されたもので“適用率(applicability) ”を計算した。

また、基本的な能力評価として、感度(Sensitivity) 特異度(Specificity) を用いた。感度はエームス陽性を陽性と判定できる能力で、さらに変異原性の強い物質の感度(A-Sensitivity) を別に計算した。

### C-2. Phase II 3,829化合物のQSARによるエームス試験結果の予測

表3に12のQSARベンダーが提供するQSARツールによるエームス試験予測結果を示す。ブルガス大学のTIMESは代謝物をメカニズムベースで予測するツールを含んでおり、情報となるドメイン構造が少ないため、ドメイン内とドメイン外で別々に計算した。ラーサ社、マルチケース社、リードスコープ社は知識ベース、統計ベースの2つのQSARツールを提供した。また、ラーサ社の統計ベースのSarahモデルはモジュールの違う3つのツールで計算した。アルタミラのChemoTunesも2つのモジュールで計算した。イタリアのマリオネグリ研究所は、3つの統計ベースのQSARツールで計算したが、最終的にはコンセンサスモデル

(VEGA) の結果を尊重した。

表4にPhase IとPhase IIの15のQSARモデル評価結果の比較を示す。15のモデルの内、Phase Iの結果をトレーニングセットしてモデルに組み込んだことを確認できたモデルは8モデルであった。特にDEREKやToxtreeのような知識ベースQSARモデルはルールの開発に時間がかかるため困難であった。一方、統計ベースモデルは簡単に組み入れることができた。特に高いA-sensitivityを示したのはMCASEのCASEUltraであり、89.5%であった。また、Specificity85.6%、Concordance83.5%と極めて良好な結果を示した。CASEUltraでのClass A+C、およびClass A+B+CのRCOカーブを図1に示す。他に高いA-sensitivityを示したのはプルウスのSymmetry(81.7%)、MCASEの知識ベースGT-Expert(84.1%)、ブルガス大のTIMESで(80.0%)、高いSpecificityを示したのはSwetoxのAZAMES(92.8%)、ラーサのDEREK(90.1%)、ブルガス大のTIMES(93.5%)、リードスコープのLSMA(90.6%)であった。概して、Phase IではA-Sensitivity 51-81%、AB-Sensitivity 39-70%、Specificity 65-92%、Concordance 68-84%、これがPhase IIでは59-90%、45-72%、78-93%、75-87%と全て増加した。このことはこの共同研究が順調に推移していることを示している。

### C-3. QSARで検出できない強いエームス陽性化合物(偽陰性)

今回の3,829化学物質には253の強いエームス陽性化合物が含まれる(A判定)。しかしながら、このうち4化合物については、全てのQSARツールで、5化合物については1

つを除くほとんどQSARツールで陰性、もしくは評価不能と判定された(図2)。これら化合物は”False Negative(偽陰性)”化合物と考えられる。

#### C-4. QSARで検出できないエームス陰性化合物

今回の3,829化学物質のうち3,267化合物はエームス陰性である(C判定)。しかしながら、このうち7化合物については、全てのQSARツールで、別の7化合物については1つを除くほとんどQSARツールで陽性の判定がされた(図3)。これら化合物は”False Positive(偽陽性)”化合物と考えられる。

#### D. 考 察

これまで開発されたQSARツールの予測性の検証には、多くの場合、開発者が有する内部データによって検証されてきた。内部データはQSAR開発のためのトレーニングデータセットを含むため、その予測率が高いのは当然で有り、客観的評価となっていない。特に、化学メーカーや製薬企業が公開するデータの多くは、エームス陰性化合物で有り、それを基に開発されるQSARツールは、Specificityは高いものの、Sensitivityは低いか、もしくはその値は信頼性に乏しい。規制当局としては、スクリーニング試験であるQSARはSensitivityと陰性予測率(Negative Prediction Value; NPV)が十分に高いことが、偽陰性を避ける上で重要である。これにより、変異原性ハザードの高い化学物質が、安易に環境中に放出されること無く、適切に管理されることが可能となる。従って、外部データを用い、QSARモデル、QSARツールの精度を評価することは、QSAR開発ベンダーにと

っても、QSAR利用者にとっても、そして規制側にとっても有益である。また、これら結果を各QSARベンダーで共有し、更に実際に試験データを開示することは、QSARベンダーの公正な競争により各QSARツールの予測性の向上に繋がる。本研究班では、このような研究を通じ、QSARベンダー、QSARユーザー、規制当局が”ウィン、ウィン、ウィン“の関係となることを目指す。

今回の3,829化合物の予測精度に関しては、ICH-M7を契機にエームス試験の予測性の向上に積極的に取り組んでいるラーサ社、マルチケース社、リードスコープ社のQSARツールの予測性に期待が持たれた。3社は、知識ベース、統計ベースの両者のモデルをコマーシャルベースで提供している。概して、3社のQSARツールはSensitivity、Specificityともバランスがよく、81~86%の一致率(Correspondence)を示した。特に、規制当局が懸念するA-Sensitivityに関しては、MCASEのCASEUltraが89.5%を示し、RCO解析でもバランスの取れた予測結果を示した。しかしながら、CASEUltraのAplicabilityは65.3%と他のQSARツール(80-100%)に比べて著しく低かった。予測率を上げるためにDomain構造を限定することは、Out of Domainとなり評価不可能な状況になることが多くなると考えるが、安全性を担保する考えからすれば正当で有る。一方、Out of Domainとなった場合は実際の試験を求められるため、スクリーニングの役割としてはその利用価値が低下する。着実にデータを蓄積し、ケミカルスペースを拡大し、確実な構造アラートを開発していくストラテジーが重要である。

同様にブルガス大学のTIMESモデルも高いSensitivityを示したが、適用ドメインが18%と極めて低かった。TIMESには薬物代謝モデルが組み込まれているが、本プロジェクトでは化学物質の代謝情報に関しては開示していない。今後、TIMESのようなモデルの向上には、エーム試験のS9の条件の有無、仕様菌株の情報などが必要と考えられる。

A-Sensitivityが低いツールとして、前回、スウェーデンのAZMES、スペインのSymmetry、ブルガリアのAMBIT、日本のADMEWORKSが挙げられた。このうち、AZMESとSymmetryに関しては、Phase IIで20%以上のA-Sensitivityの向上が認められた。これはモデルの改良が着実に進んでいることを示している。概して、Phase Iの結果をモデルにトレーニングデータとして取り入れたツールで、大幅な予測率の向上が認められた。

ほとんど全てのQSARツールの全てが陰性と間違えて判定したClass A化学物質が9化合物であり、これは3.6%に相当する。Phase Iでは10%も存在したことから、この場合でも共同研究は順調に推移していることがうかがわれる。すなわち、多くの試験データを組み入れエームス陽性のケミカルスペースを拡大することが、偽陰性を減らすことに繋がる。また、偽陽性も多く見つかった。警告アラートとは別に、それらアラートを修飾する部分構造や、トキシコフォアを同定することが偽陽性の削減に役立つ。さらに多くの化学物質の情報と、予測のためのパラメータの組み合わせやアルゴリズムの変更が必要である。

今回の3,829化合物には26組の立体異性体が存在し、そのうち25組はエームス試験

結果判定が一致し、1組は判定が異なった。一般に、2D-QSARモデルでは立体異性体を区別することはできないが、この結果は化学物質の立体異性体構造は、ほとんど変異原性に影響を与えないことを示している。この知見は、今後QSARモデルを構築する上で重要な知見となる。

## E. 結論

エームス試験予測QSARモデルの向上を目指した国際共同研究を実施している。日本で実施された安衛法に基づくエームス試験データから、QSARモデルの開発に有用と考えられる、12,451化学物質をデータベース化した。H28年度はこのうち3,829化合物について、エームス試験結果の予測精度を競うPhase IIトライアルを行った。世界7カ国から、12のQSARベンダーがこの国際競争に参画し、21のQSARツールについて予測精度の評価を行った。多くのQSARツールの予測精度はPhase Iトライアルと比較して大幅向上された。特に、強いエームス陽性化学物質見逃す確率は大きく減少した。このことは、本共同研究が成功裡に推移していることを示すのものである。今後、さらにPhase IIIトライアルを実施し、さらなる予測性の向上を目指す。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. Manganelli S, Benfenati E, Manganaro A, Kulkarni S, Barton-Maclaren TS, Honma M; New

- quantitative structure-activity relationship models improve predictability of Ames mutagenicity for aromatic azo compounds. *Toxicol Sci.* 153, 316-326 (2016)
2. Petkov PI, Schultz TW, Donner EM, Honma M, Morita T, Hamada S, Wakata A, Mishima M, Maniwa J, Todorov M, Kaloyanova E, Kotov S, Mekenyan OG; Integrated approach to testing and assessment for predicting rodent genotoxic carcinogenicity. *Journal of Applied Toxicology*, 36, 1536-1550 (2016)
  3. Benfenati E, Belli M, Borges T, Casimiro E, Cester J, Fernandez A, Gini G, Honma M, Kinzl M, Knauf R, Manganaro A, Mombelli E, Petoumenou MI, Paparella M, Paris P, Raitano G; Results of a round-robin exercise on read-across. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 27, 371-384 (2016)
  4. Morita T, Hamada S, Masumura K, Wakata A, Maniwa J, Takasawa H, Yasunaga K, Hashizume T, Honma M; Evaluation of the sensitivity and specificity of in vivo erythrocytemicronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens. *Mutat. Res.*, 802, 1-29 (2016)
  5. Ahlberg E, Amberg A, Beilke LD, Bower D, Cross KP, Custer L, Ford KA, Van Gompel J, Harvey J, Honma M, Jolly R, Joossens E, Kemper RA, Kenyon M, Kruhlak N, Kuhnke L, Leavitt P, Naven R, Neilan C, Quigley DP, Shuey D, Spirkl HP, Stavitskaya L, Teasdale A, White A, Wichard J, Zwickl C, Myatt GJ; Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: A case study using aromatic amine mutagenicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 13, 1-12 (2016)
  6. Amberg A, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cross KP, Custer L, Dobo K, Dowdy E, Ford KA, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Nicolette J, Plaper A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Spirkl HP, Stavitskaya L, Teasdale A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Myatt GJ; Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol.* 77, 13-24 (2016)
- 学会発表
1. Honma M; AMES/QSAR International Collaborative Study. 17th International Conference on QSAR in Environmental and Health Sciences (2016.6、マイアミ、米国)
  2. 本間正充、増村健一、森田健；遺伝毒性発がん物質のリスク評価 第43回日

本毒性学会学術年会(2016.7、名古屋)

3. Honma M; Current Topics in Genotoxic Toxicology. Symposium on Genetic Toxicology and Developmental Toxicology in Chinese Society of Toxicology (2016.8、ハイラル、中国)
4. 本間正充; 何故、今、変異原性in silicoなのか? 日本環境変異原学会第45回大会(2016.11、つくば)
5. Rathman JF, Benfenati E, Honma M, Kitazawa A, Raitano N, Yamada T, Yang C; Models Combined by Decision Theory to Enhance Outcomes in DGM/NIHS Ames/QSAR International Collaborative Study. 56th Annual Meeting of Society of Toxicology (2017.3、バルチモア、米国)
6. 福地準一、北澤愛莉、平林啓司、本間正充; (Q)SARによる変異原性不純物の評価に対するエキスパートレビューに関する研究 日本薬学会第137年会 (2017.3、仙台)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

**表 1 共同研究 Phase II 試験化学物質**

クラス	変異原性	計算依頼 化合物数	評価対象 化合物数
A	強い陽性 (>1,000 rev/mg)	260 (6.5%)	253 (6.6%)
B	陽性 (< 1,000 rev/mg)	328 (8.2%)	309 (8.1%)
C	陰性	3,403 (85.3%)	3,267 (85.3%)
合計		3,991	3,829

**表 2 共同研究 Phase II 参加機関**

QSAR Builders	QSAR Model
1. Lhasa Limited (UK)	DEREK Nexus, SARAH
2. MultiCASE Inc (USA)	CASE Ultra rule-, statistical-based
3. Leadscope Inc (USA)	Leadscope rule-, statistical-based
4. Prous Institute (Spain)	Symmetry
5. Bourgas University (Bulgaria)	OASIS TIMES
6. Istituto Superiore di Sanita (Italy)	Toxtree
7. Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (Italy)	SARpy, VEGA, CAESAR
8. Swedish Toxicology Sciences Research Center (Sweden)	SwetoxAZAMES
9. FUJITSU KYUSHU SYSTEMS (Japan)	ADMEWORKS
10. IdeaConsult Ltd. (Bulgaria)	AMBIT
11. Molecular Networks GmbH and Altamira LLC (USA)	ChemTunes
12. Simulations Plus (USA)	MUT_Risk







表4 共同研究 Phase I と Phase II 評価結果比較

Builders	Contact Person	Phase I (3902)										Phase II (3929)									
		QSAAR Models	Sensitivity [A] (%)	Sensitivity [A+B] (%)	Specificity (%)	Concordance (%)	Applicability (%)	QSAAR Models	Integration Phase I chemicals	Sensitivity [A] (%)	Sensitivity [A+B] (%)	Specificity (%)	Concordance (%)	Applicability (%)	Sensitivity [A] (%)	Sensitivity [A+B] (%)	Specificity (%)	Concordance (%)	Applicability (%)		
Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (Italy)	Emilio Benfanti	VEGA, Consensus (CASAR, Toxref, SARpy)	78.0	66.1	70.0	69.5	99.6	VEGA Consensus (KIN, SARpy) predictions		77.5	60.5	78.4	75.8	99.9	-0.5	-5.6	8.4	6.3	0.3		
Sveidan Toxicology Science Research Center (Sweden)	Ulf Norinder	Svetox-AZAMES v1	56.2	38.6	91.5	83.9	97.1	SvetoxAZAMES v2	Yes	76.8	56.5	92.8	87.7	93.1	20.6	17.9	1.3	3.8	-4.0		
Lhasa Limited (UK)	Alex Croyley	Derek_NX ver.4.0.5	72.1	58.8	86.2	82.2	100.0	Derek_NX ver.4.2.0, Nexus 2.1.0	No	73.5	54.3	90.1	84.8	100.0	1.4	-4.5	3.9	2.6	0.0		
Istituto Superiore di Sanita (Italy)	Cecilia Bossa	Sarah ver.1.1.2	64.7	51.2	82.0	77.6	80.0	Sarah NX 1.1.19, pushHS1 (ver.2.0.1)	Yes	66.5	52.4	88.6	83.5	83.3	1.8	1.2	6.6	5.9	3.3		
Prous Institute (Spain)	Christine Delleo	ToxTree 2.6.6	74.9	65.3	68.0	67.6	99.9	ToxTree 2.6.6	No	73.9	59.3	78.1	75.3	100.0	-1.0	-6.0	10.1	7.7	0.1		
Bourgas University (Bulgaria)	Ovanes II dikenyan	Symmetry S. typhimurium (Ames)- gene mutation in vitro microbial	51.4	43.8	80.3	75.0	99.9	Symmetry Ensemble (S. typhimurium (Ames) gene mutation)		81.7	61.9	85.9	82.4	99.9	30.3	18.1	5.6	7.4	0.0		
Leadscope Inc (USA)	Glen M Wyatt	TIMES-AMES mutagenicity v.09.09 (in domain)	79.4	49.5	88.3	81.8	14.5	TIMES-AMES mutagenicity v.11.11. (in domain)	No	80.0	51.0	93.5	87.1	18.0	0.6	1.5	5.2	5.3	3.5		
		TIMES-AMES mutagenicity v.09.09 (AU)	59.3	50.4	76.9	73.0	99.9	TIMES-AMES mutagenicity v.11.11. (AU)	No	60.5	47.5	83.8	78.4	99.8	1.2	-2.9	6.9	5.4	-0.1		
		Leadscope genetox expert alerts suite (Bacterial mutagenicity v1)	74.1	60.2	79.0	76.3	94.3	Leadscope genetox expert alerts suite (Bacterial mutagenicity v2)	Yes	76.6	57.8	90.6	85.8	93.8	2.5	-2.4	11.6	9.5	-0.5		
		Leadscope genetox statistical QSAR suite (Salmonella v3 and E.coli/TA102 v1)	76.2	58.7	83.2	79.8	86.0	Leadscope genetox statistical QSAR (Salmonella (in domain) E.coli/TA102 v1)	Yes	79.0	63.9	88.0	84.5	90.7	2.8	5.2	4.8	4.7	4.7		
MULTICASE Inc (USA)	Rousten Saalakhov	BIL-PHARMA v1.5.2.0 (Statistical approach, SALM/ECOLI consensus)	65.5	52.9	84.7	80.1	90.5	Statistical approach, SALM/ECOLI consensus	Yes	89.5	72.1	85.6	83.5	65.3	24.0	19.2	0.9	3.4	-25.2		
		GT-EXPERT v1.5.2.0 (Rule based)	81.3	69.8	75.0	74.2	91.0	GT-EXPERT (Rule based)	Yes	84.1	67.9	83.1	80.8	89.4	2.8	-1.9	8.1	6.6	-1.6		
Ideaconsult Ltd. (Bulgaria)	Nina Jelazkova	Ambit consensus model	59.1	43.6	86.1	80.0	93.6	Ambit consensus model	Yes	58.5	44.8	83.1	77.5	100.0	-0.6	1.2	-3.0	-2.5	6.4		
FUJITSU KYUSHU SYSTEMS (Japan)	Hitomi Koga	ADMEWORKS/PreditAmes-v1/1	58.5	46.5	80.1	76.0	57.7	AMES-QQ (improved model)	Yes	68.3	55.4	79.3	74.7	22.7	9.8	8.9	-0.8	-1.3	-35.0		
Molecular Networks GmbH and Alamina LLC	Chihae Yang	ChemTunes 1.0 AMES2015-02	77.7	65.7	76.1	74.5	90.3	ChemTunes 1.0 AMES2015-01	Yes	77.1	66.5	83.9	81.3	92.7	-0.6	0.8	7.8	6.8	2.4		

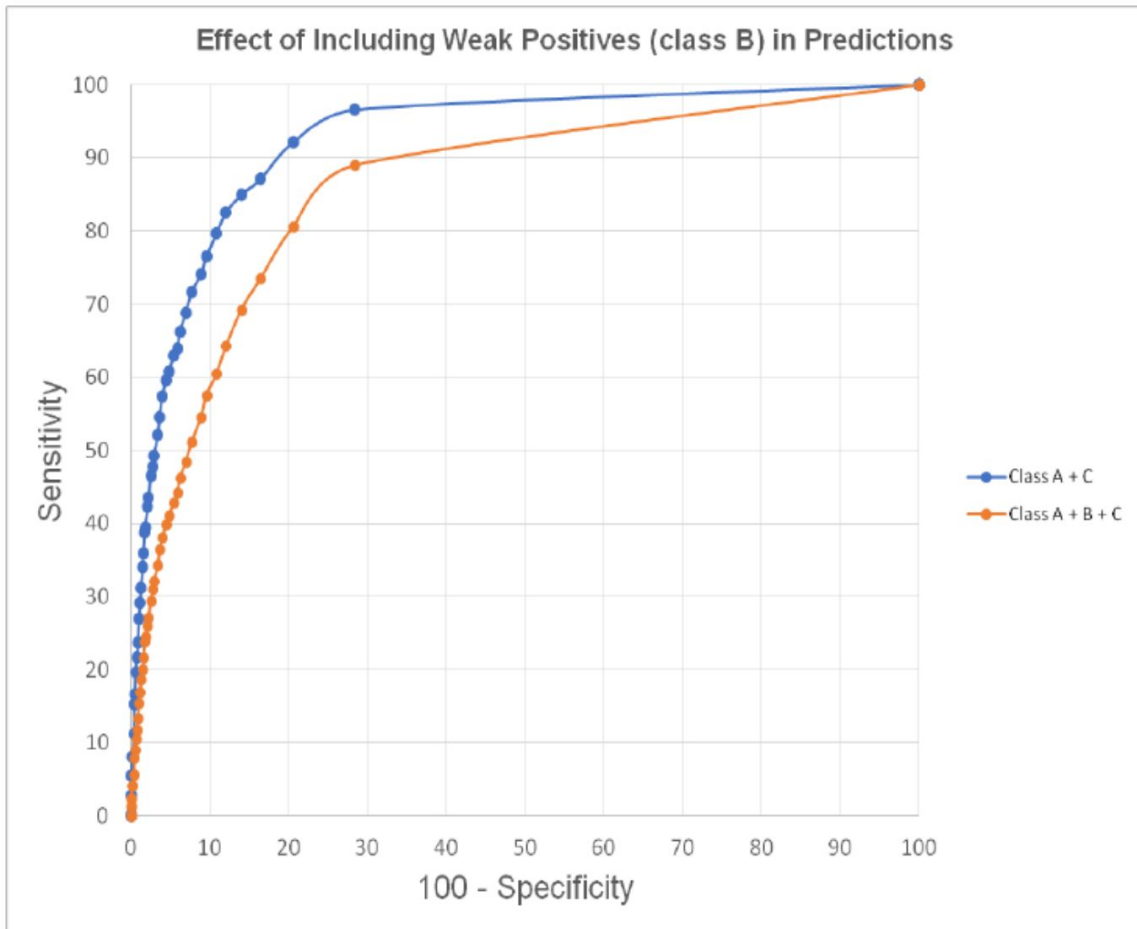


図1 CASEUltra での Phase II 予測の ROC 曲線

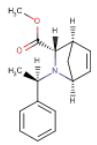


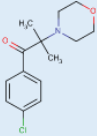
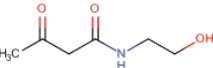
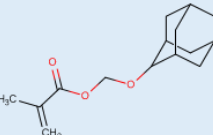
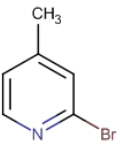
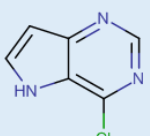
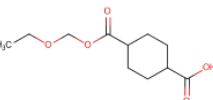
Serial_Id	Result	ANEI_No.	CAS#	Structure	Chemical_name	
12505	A	8-(1)-2876	130194-96-6		(1S,3S,4R)-2-[(1R)-1-phenylethyl]-2-azabicyclo[2.2.1]hepta-5-ene-3-carboxylic acid methyl ester	
22336	A	2-(7)-361	373-91-1		trifluoromethyl hypofluorite	
22628	A	2-(13)-275	661-54-1		3,3,3-trifluoropropyne	
23476	A	8-(7)-1816	88324-57-6		1-(4-chlorophenyl)-2-methyl-2-morpholin-4-ylpropan-1-one	
Serial_Id	Result	ANEI_No.	CAS#	Structure	Chemical_name	陽性と判定したQSARモデル
570	A	2-(6)-1115	24309-97-5		N-(2-hydroxyethyl)acetoacetamide	Symmetry
15583	A	7-(2)-209	791611-93-3		methacrylic acid 2-adamantylloxymethyl ester	Derek NX
18616	A	8-(1)-3476	4926-28-7		2-bromo-4-methylpyridine	VEGA SARpy
19081	A	8-(2)-2304	84905-80-6		4-chloro-5H-pyrrolo[3,2-d]pyrimidine	Symmetry
22823	A	3-(4)-718	1173478-74-4		4-(ethoxymethoxycarbonyl)cyclohexane-1-carboxylic acid	Derek NX

図2 ほとんど QSAR ツールで陰性と判定されたエームス強陽性化合物 (Clasee 1) (偽陰性)

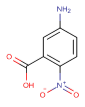
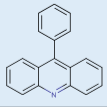
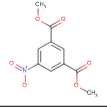
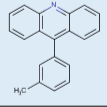
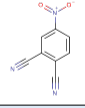
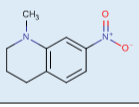
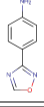
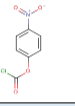
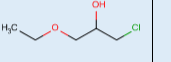
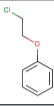
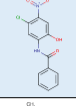
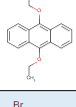
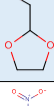
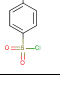
Serial_id	Result	ANEL_No.	CAS#	Structure	Chemical_name	
6912	C	4-(4)-1087	13280-60-9		5-amino-2-nitrobenzoic acid	
8420	C	8-(1)-2473	602-56-2		9-phenylacridine	
8840	C	4-(7)-1875	13290-96-5		dimethyl 5-nitroisophthalate	
20718	C	8-(1)-3704	294847-79-3		9-(3-methylphenyl)acridine	
11831	C	4-(7)-2044	31643-49-9		4-nitrophthalonitrile	
12535	C	8-(1)-2881	39275-18-8		1-methyl-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroquinoline	
14751	C	8-(7)-1495	59908-70-2		4-(1,2,4-oxadiazol-3-yl)aniline	
Serial_id	Result	ANEL_No.	CAS#	Structure	Chemical_name	毒性と判定したQSARモデル
5599	C	4-(7)-1680	7693-46-1		(4-nitrophenyl) carbosochloridate	TIMeS out of domain
6593	C	2-(8)-622	4151-98-8		1-chloro-3-ethoxypropan-2-ol	ADME
6394	C	4-(14)-224	622-86-6		2-chloroethoxybenzene	VEGA KNN
7366	C	4-(7)-1803	5099-06-9		N-(5-chloro-2-hydroxy-4-nitrophenyl)benzamide	TIMeS out of domain
8807	C	7-(1)-629	68818-86-0		9,10-diepoxyanthracene	VEGA KNN
8871	C	8-(5)-261	4360-63-8		2-bromomethyl-1,3-dioxolane	TIMeS In domain
9167	C	4-(8)-225	98-74-8		4-nitrobenzene sulfonfyl chloride	AMBIT

図3 ほとんど QSAR ツールで陽性と判定されたエームス陰性化合物 (Clasee 3) (偽陽性)

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名：化学物質のヒト健康リスク評価における(定量的)構造活性相関およびカテゴリー  
アプローチの実用化に関する研究 (H27-化学-指定-005)

分担研究課題名：In vivo 遺伝毒性試験 QSAR の開発; 新規 in vitro 染色体損傷アラートの抽出  
とその in vivo 染色体損傷アラートへの適用

研究分担者 森田 健 国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部第三室室長  
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

## 研究要旨

化学物質の遺伝毒性活性は *in vivo* と *in vitro* で必ずしも良好に相関するわけではないが、特定の化学物質クラスでは両者に十分な一致が認められる場合がある。しかし、このような相関性に該当するケースを立証することや、最適な試験デザインを選択して *in vivo* での有害性を明らかにすることは困難である。この点を踏まえ、*in silico* 評価システム Derek Nexus における *in vitro* 染色体損傷の既存の構造アラートに関し、*in vivo* 活性との相関性を評価した。これらの構造アラートの *in vivo* 染色体損傷 (小核) データセットに対する予測性を評価し、次にアラートの妥当性を評価した。構築した小核 (MN) 試験とトランスジェニック動物突然変異 (TG) 試験の広範なデータベースに基づき、化学物質の生体内活性と試験デザインまたは遺伝毒性メカニズムとの意味がある関連性ととも、アラートを新規に構築あるいは更新した。本手法により *in vitro* アラートを更新した結果、データセットに対する Derek Nexus の *in vivo* 染色体損傷予測性は著しく改善された。アラートに追加された *in vivo* 活性や試験デザインに関する詳細な情報と併に、得られたメカニズムに関する情報を組み合わせれば、新規 *in vivo* 染色体損傷アラートは極めて有効な情報となることが示された。

### A. 研究目的

*In vitro* 染色体損傷試験で陽性結果が得られた場合、当該化学物質は遺伝毒性を示す可能性がある。しかし、多くの場合、*in vitro* 試験で認められた有害性が *in vivo* 遺伝毒性試験や発がん性試験でも反映されるかどうかの予測は容易ではない。*In vitro* での陽性結果が *in vivo* での活性に結びつ

かない理由は多くある。例えば、化学物質の効率的な解毒や排泄、代謝の代替経路、吸収率の悪さなど、これらはいずれも作用部位における不十分な曝露につながる可能性がある。また *in vitro* 系は高濃度の被験物質に曝露されている可能性があり、その結果 *in vivo* では該当しそうな生理的状況が原因となり、陽性結果を示すこと

がある。さらに複雑なことに、*in vivo* 試験の結果（したがって *in vitro* 結果との関連性）は選択した試験デザインに依存し、場合によっては対象組織や投与経路により異なる結果が得られることがある。そのため、不適切な *in vivo* 試験は不要な動物使用につながり、さらに被験物質の真のリスクを十分に反映しない結果をもたらす可能性があることから、適切な *in vivo* 試験デザインを選択することが重要である。最適な *in vivo* 試験を選択する際の重要な要素として、遺伝毒性発現メカニズムの理解の他、実施する試験に関する知識および被験物質または同様のメカニズムで作用する可能性のある類似物質でみられる試験デザインの特異性などがある。このような情報と当該化学物質の代謝、分布、生物学的利用能などの予想される曝露条件とを組み合わせ、十分な情報を入手した上で、特定の状況で最適な *in vivo* 試験デザインを選択し、決定することができる。以上を考慮し、個々の *in vitro* 染色体損傷アラートと *in vivo* 活性との関連性を評価することを本研究の目的とした。

## B. 研究方法

まず選択した *in vivo* 染色体損傷データのデータセットを整理、統合し、より大きなデータセットを作成した。次にこの大規模データセットを Derek Nexus（バージョン 2.0）において *in vitro* 染色体損傷のエンドポイントに対して処理し、Derek Nexus の各 *in vitro* 染色体損傷アラートの *in vivo* データに対する予測性能を評価した。Derek Nexus において、*in vitro* 染色体損傷のエンドポイントは開発が進んでいるが（アラート数 91 種）、*in vivo* 染色体損傷の

エンドポイントは少ない（アラート数 10 種）。さらに詳細な調査に値すると考えられたアラートを優先づけた後、クラス内の各化合物の活性に関する専門家による分析を含めた入手可能なデータおよび一次文献の詳細な分析を行った。すなわち、*in vitro* アラートが *in vivo* データ（主に *in vivo* での小核試験および染色体異常試験の結果を用いて評価）を十分に予測し、かつ、いずれのエンドポイントにおいても同じメカニズムが関与すると考えられる場合には、当該アラートを拡大し *in vivo* 活性の予測に適用した。拡大適用されたアラートは *in vitro* と *in vivo* の染色体損傷を同様に予測する。予測性能が不良の場合や *in vivo* での毒性には別のメカニズムが関与していると考えられる場合には、*in vitro* アラートの拡大適用は行わなかった。いずれの場合も利用可能な全データを専門家が評価し、結果の要約をアラートの記述に加えた。*In vitro* アラートの試験には、より大きなデータセットを形成するため 3 種類の別個のデータセットを統合したデータを使用した。これらのデータを用いたアラートの検証結果からさらに調査すべきアラートの優先順位を決め、文献検索および一次文献の参照を含む詳細な調査を行った。このデータは、化合物が染色体損傷の原因となるメカニズムに関連する他の補足情報と共に、知識ベースにおける変更を裏付けるために使用した。

### B.1. 使用データセット

本研究では以下に概説する *in vivo* 染色体損傷データ [小核 (MN) 試験データおよび染色体異常 (CA) 試験データの両方からなる] の 3 種類のデータセットを用い

た：

**MMS データセット：**日本の MMS 研究会提供。関連する *in vivo* での MN 試験データを有する計 255 化合物を含む。各化合物の総合判定は専門家による一次データの解釈に基づいて行われ、112 化合物が陽性、129 化合物が陰性、14 化合物が inconclusive (判定不可) と判定した。

**FDA データセット：**米国 FDA から得た *in vivo* 染色体損傷データ。データセットには関連する *in vivo* での MN 試験や CA 試験データを有する計 939 化合物を含む。各化合物の MN および CA に関する総合判定は FDA に代わって Leadscope Enterprises により行われた。必要に応じて、これらの結果を組み合わせ *in vivo* 染色体損傷に関する総合判定を行った。いずれかの試験で陽性結果が得られた場合には総合判定を陽性とした。陽性結果は示さなかったがいずれかの試験で equivocal (不確か) な結果が得られた場合には、equivocal と判定した。それ以外の場合には陰性と判定した。ひとつの試験でのみで検査された化合物については、その試験の結果を総合判定の根拠として用いた。288 化合物が陽性、625 化合物が陰性、13 化合物が equivocal、13 化合物が inconclusive と判定された。

**Vitic Nexus データセット：**オンラインデータベース Vitic Nexus (version 1.75) より抽出。関連する *in vivo* での MN 試験データを有する計 804 化合物を含む。各化合物の総合判定は個々の研究データに基づいて行われた。いずれの試験でも陽性と判定された化合物は総

合判定を陽性とした。陽性結果は示さなかったがいずれかの研究で「弱陽性」と判定された化合物は弱陽性とした。陽性判定はないがいずれかの研究で equivocal と判定された化合物は equivocal とし、実施したいずれの試験でも陰性結果のみを示した化合物は総合判定を陰性とした。241 化合物が陽性、503 化合物が陰性、3 化合物が弱陽性、25 化合物が equivocal、32 化合物が inconclusive と判定された。

各化合物に関する総合判定を有する上記 3 種類の小規模なデータセットから統合データセットを作成した。化学構造または CAS 番号に基づき、2 つ以上のデータセットに存在する構造を特定した。重複する構造の総合判定は以下に基づき行った。いずれかひとつのデータセットで陽性結果を示した化合物は総合判定を陽性とした。総合判定が陽性とならなかった化合物のうち、いずれかのデータセットで弱陽性とされたものは弱陽性と判定した。いずれのデータセットでも陽性または弱陽性とは判定されなかったが equivocal と判定されていた化合物については、総合判定を equivocal とした。ひとつのデータセットのみで検討された化合物についてはその結果を総合判定として用いたが (例、inconclusive) それ以外の場合には陰性と判定した。データセットの統合後、陽性または陰性と判定された化合物以外はデータセットから除外した。その結果得られた統合データセットは、陽性化合物 484 種、陰性化合物 977 種の計 1461 化合物から構成された。次にこの統合データセットを用いて *in vitro* アラートの解析を進めた。

## B.2. 候補アラートの特定

統合データセットをDerek Nexus( version 2.0 ) に収録されている既存の *in vitro* 染色体損傷アラートに対して処理し、各アラートの陽性適中率 ( PP ) を算出した。次に PP の一覧に基づいてアラートの優先順位づけを行った。*In vivo* 試験系への適用性の点から検討の余地があると考えられるアラートを選択した。本研究の目的のひとつはDerek Nexusにおける *in vivo* 染色体損傷のエンドポイントの予測性能を向上させ、同エンドポイントに対するさらに包括的な知識ベースの *in silico* システムを開発することであった。この点を踏まえて、PP が 50% を超え、なおかつ計 3 種類以上の化合物によって評価されるアラート ( *in vivo* エンドポイントと *in vitro* エンドポイントとが十分な重複を示す ) を優先して詳細な調査を行った。21 種類以上の化合物により評価される( 同化合物クラスの *in vivo* 活性を評価するためのデータが大量に存在する ) アラートも優先した。以上の基準に合致すると確認されたアラート 24 種全てについて、*in vivo* 染色体損傷のエンドポイントに関する専門家による検討を行った。さらに、上記の基準に合致しなかったが有望と確認されたアラート 8 種についても本研究の一環として詳細な調査を行った。

## B.3. *In vivo* 染色体損傷予測の開発

調査を行った 32 種のアラートそれぞれについて、可能な場合には引用文の原文に戻って参照しながらデータセット中の全 *in vivo* データを詳細に検討した。優先づけに用いた統合データセットのデータに加え、公開科学文献の追加データの検索も実施した。最初は ChemIDplus を用いて

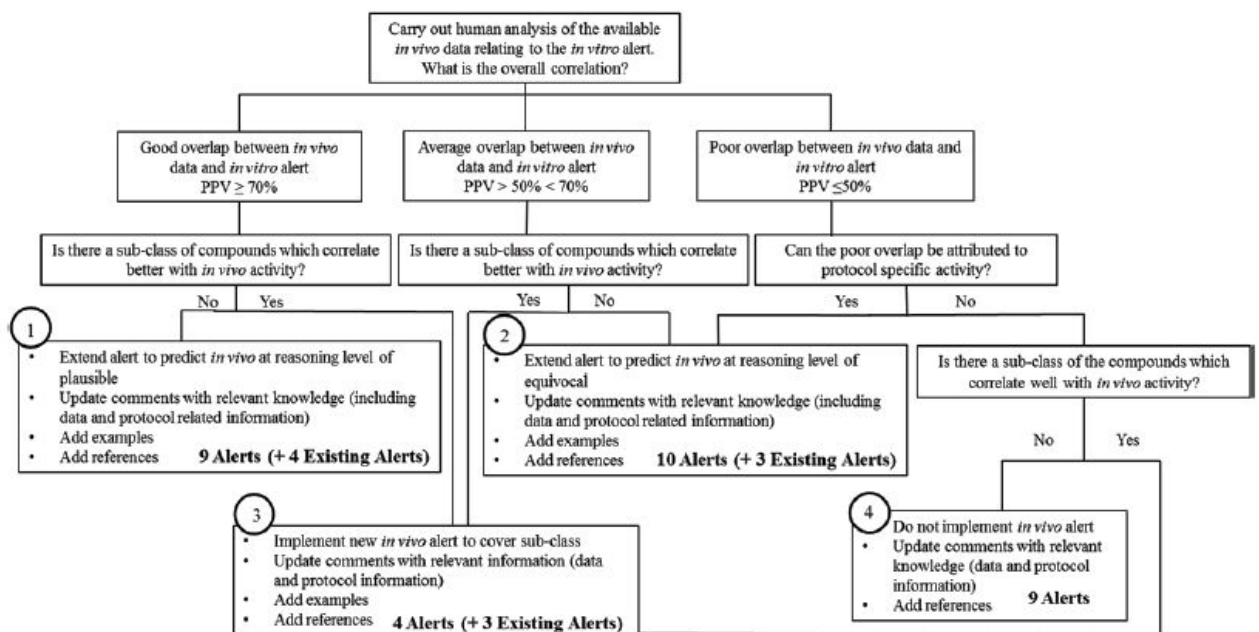
PubMed、CCRIS などの毒性学的に関連のある大規模データベースを検索した。その後これらのデータベースから得た知見に基づいて、より広範かつ詳細な検索を行った。*In vivo* での染色体損傷試験データ、および活性の根拠や化合物クラスが活性を生じるメカニズムに関する情報を収集した。当該化合物クラスに関する入手可能な全ての関連情報を収集するとその情報を照合し、専門家が各化合物の活性に関する全体的結論を下した。これらの結論を出す際には、実施された試験の質 ( GLP 遵守状況 ) に加え、化合物の推定される吸収、分布、代謝、排泄 ( ADME ) 特性および染色体損傷の原因となるメカニズムに基づいて試験デザインの妥当性が考慮された。データは *in vivo* 小核試験および染色体異常試験から得た。コメント試験は化学物質の染色体損傷誘発性よりもむしろ突然変異事象および全般的な DNA 損傷を評価するものであるため、同試験のデータは使用しなかった。同一化合物に関する矛盾した結果については、可能であれば試験デザインの違い ( 例、用量、サンプリング時間、組織、投与経路など ) に基づいて妥当性を確認した。利用可能な全てのデータを使用し、各 *in vitro* アラートの *in vivo* 活性との関連性を判断した。*In vitro* アラートにより *in vivo* 活性が予測できると考えられた場合には、アラートを両エンドポイントの予測に拡大適用した。新たな推論ルールをアラートに追加し、裏付けとなる証拠の強さによって尤度を plausible( 妥当 ) または equivocal ( 不確か ) と設定した。アラートコメントを更新し、必要に応じて裏付けとなる参考文献や例を追加した。*In vitro* 系と *in vivo* 系で認められる活性の間に十分な重複が



ないアラートに関しては、当該化合物クラスが活性を示す特別な条件があるのか、または特有のサブクラスを同定できるのかを確認する評価を行った。これらの条件のいずれかを満たした場合には知識ベースを適宜更新し、活性を示す特別な条件がある場合にはアラートコメントに適切に要件を記述し、サブクラスが同定された場合には当該サブクラスに対する新たなアラートを実行した。*In vivo* での結果が *in vitro* アラートによって十分に予測されず、かつ上述の条件を満たさない場合には、当該アラートの *in vivo* 活性予測への外挿は行わなかった。上記の全ての場合において、判断に用いたキーとなるデータに関する情

報を当該アラートに関連するコメントに記述した。実際に観察された、または専門家による解釈によって毒性の原因となるメカニズムに基づいて予測された全ての試験デザイン特異性についてもコメントに記載した。これらの結論を導くために用いた簡略化した意思決定プロセスの概要（決定樹）を図1に示す。この決定樹を各化合物クラスの遺伝毒性に関する現在の知識（利用可能な場合にはメカニズムの説明に関する情報を含む）に対する専門家の評価と組み合わせて用いることで、各クラスの活性予測に最適な方法についての結論を導いた。

図1 *In vivo* 知見に対応した知識ベースを構築するための判断基準を示す決定樹



### C. 研究結果

本研究の前には Derek における *in vivo* 染色体損傷の予測能力は限定的であり、知識

ベース内の同エンドポイントに対するアラートはわずか 10 種であった。これらのアラートが適用できる化学物質は限られ

ており、表 1 に示す通り、このことは日本の MMS によって提供されたデータセット

に照らして Derek の感度の低さに反映されていた。

**表 1 MMS データセットに対する DfW (Ver. 13)の染色体損傷性 (CD) 予測性能**

	DfW の <i>in vivo</i> CD 予測：不明確あるいは高	DfW の <i>in vivo</i> CD 予測：報告なし	試験報告数
<i>in vivo</i> CD 陽性	4	108	112
<i>in vivo</i> CD 陰性	0	130	130

感受性：4/112 = 4%、特異性：130/130 = 100%、一致性：134/242 = 55%

本研究では、32 種類の *in vitro* 染色体損傷アラートを調査した。調査を行ったアラートのうち、19 種が *in vivo* 活性への拡大適用の基準を満たした (図 1)。これら 19 種のアラートは *in vivo* データを十分に予測し、*in vitro* エンドポイントと *in vivo* エンドポイントが同じメカニズムを共有すると結論づけられた。これらのアラートに新たな推論ルールを追加し、*in vivo* 活性を裏付ける証拠の重みによって尤度を plausible (アラート 9 種+既存アラート 4 種) または equivocal (アラート 10 種+既存アラート 3 種) と設定した。調査を行った中には、最初 *in vivo* での活性が *in vitro* での結果を反映しないと思われたものもあった。しかし専門家によるデータおよびメカニズムの分析の結果、活性が試験デザインに依存する可能性が示唆され、当該クラスの化合物に関して特定の条件を用いた場合には *in vivo* で陽性結果が得られる可能性が高いことが明らかになった。このような場合でも、アラートの根拠に関する説明や当該化合物が陽性を示す最も感度の高い試験方法の具体的な情報を含めた上で、*in vivo* 染色体損傷を予測することはできる。さらに特定の化学物質について、*in vivo* で活性を

示すと考えられたが他のサブクラスは活性を示さないあるサブクラスもあり、その活性の違いが理論的に説明できた。このようなアラートは 4 種類 (+既存アラート 3 種)あり、*in vitro* アラートのコメントを更新し、*in vivo* で陽性のサブセットをカバーする新たなアラートを実行した。最後に 9 種類のアラートでは *in vitro* 活性と *in vivo* 活性との間に十分な相関関係がなく、かつ試験デザイン特異性が特定されないかメカニズムや ADME に基づき当該化合物クラスで *in vivo* 活性が認められない有力な理由があった。このような場合には *in vivo* 染色体損傷を予測することはできなかったが、利用可能なデータに関する情報や不活性である理由を関連する *in vitro* アラートの情報に含めた。本研究の結果、Derek Nexus の知識ベースにおいて *in vivo* 染色体損傷のエンドポイントに関するアラートが 33 種類 (既存のアラート 10 種と本研究で開発した新規アラート 23 種) 構築された (表 2、表 3)。さらに、*in vitro* 染色体損傷に関するアラート 9 種が更新され、*in vivo* 活性との関連性に関する情報が追加された。

表2 *in vivo* 染色体損傷に関する 33 種のアラート

アラート	結果	評価
N-Nitro or N-nitroso compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Epoxide	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Alkylating agent	Comments updated. New alert implemented	N/A
Mono- or di-alkylhydrazine	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Azirine or aziridine	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Nitrogen or sulphur mustard	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Alkyl carbamate	<i>In vivo</i> alert	
Aryldialkyltriazene	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Aromatic nitro compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Chromium compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	Comments updated. New alert implemented	N/A
Carbodiimide	<i>In vivo</i> alert	
Vinyl carbamate	<i>In vivo</i> alert	
Acridine or analogue	Comments updated	N/A
Phenol	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Imidazole nucleoside analogue	<i>In vivo</i> alert	
Aminocarbazole analogue	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Xanthine	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Inorganic arsenic compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Di- or tri-phenylethylene	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Thymine or cytosine derivative	Comments updated. New alert implemented	Plausible
Purine base	Comments updated. New alert implemented	Plausible
Vinca alkaloid	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Inorganic cadmium compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Bisdioxopiperazine	<i>In vivo</i> alert	
Inorganic selenium compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Camptothecin or analogue	<i>In vivo</i> alert	
Taxane derivative	<i>In vivo</i> alert	
Colchicinoid	<i>In vivo</i> alert	

Benzimidazole derivative	In vivo alert	
5-Azacytidine or analogue	In vivo alert	
Dimethyl phosphorothiolate ester	Alert extended to in vivo	Equivocal
Alkyl sulphate or sulphonate	Implemented to extend	Plausible

表3 *in vivo* 染色体損傷に関するアラートの構築

**新規のアラート 23 種**

in vivo への適用拡大 (19) :

- |                                   |                                       |
|-----------------------------------|---------------------------------------|
| 1) N-Nitro or N-nitroso compound, | 2) Epoxide,                           |
| 3) Mono- or di-alkylhydrazine,    | 4) Azirine or aziridine,              |
| 5) Nitrogen or sulphur mustard,   | 6) Aryldialkyltriazene,               |
| 7) Aromatic nitro compound,       | 8) Chromium compound,                 |
| 9) Acridine or analogue,          | 10) Phenol,                           |
| 11) Aminocarbazole analogue,      | 12) Xanthine,                         |
| 13) Inorganic arsenic compound,   | 14) Di- or tri-phenylethylene,        |
| 15) Vinca alkaloid,               | 16) Inorganic cadmium compound,       |
| 17) Inorganic selenium compound,  | 18) Dimethyl phosphorothiolate ester, |
| 19) Alkyl sulphate or sulphonate  |                                       |

in vivo 新規 (4):

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 1) Alkylating agent,               | 2) Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue, |
| 3) Thymine or cytosine derivative, | 4) Purine base   |

**in vivo 既存アラート 10 種**

- |                              |                                   |
|------------------------------|-----------------------------------|
| 1) Alkyl carbamate,          | 2) Carbodiimide,                  |
| 3) Vinyl carbamate,          | 4) Imidazole nucleoside analogue, |
| 5) Bisdioxopiperazine,       | 6) Camptothecin or analogue,      |
| 7) Taxane derivative,        | 8) Colchicinoid,                  |
| 9) Benzimidazole derivative, | 10) 5-Azacytidine or analogue     |

**D. 考察**

*In vivo* での染色体損傷の予測に知識ベースの専門家アプローチを用いることにより、利用可能なデータの評価に専門家による分析を適用し結論を導き出すことができる。化合物の重複があった 3 種類のデータセットにおいて 18 ~ 46% の確率で結

果の不一致が認められたという事実から、この分析の意義は明らかである。この結果を専門家が分析することにより、結果の矛盾を十分に解消することができた。さらにその全ての情報を、予測システムを構成する知識ベースに収めることも可能であった。特定の化合物クラスに関して、予測に

利用可能なデータの情報とともに、活性の原因となるメカニズムや観察または予想された試験デザイン特性、または不活性と考えられる場合の理由が収録された。また必要に応じて類似例証化合物の活性も追加された。特に有用であるとわかった情報が収録されたアラートの例を以下に示す。

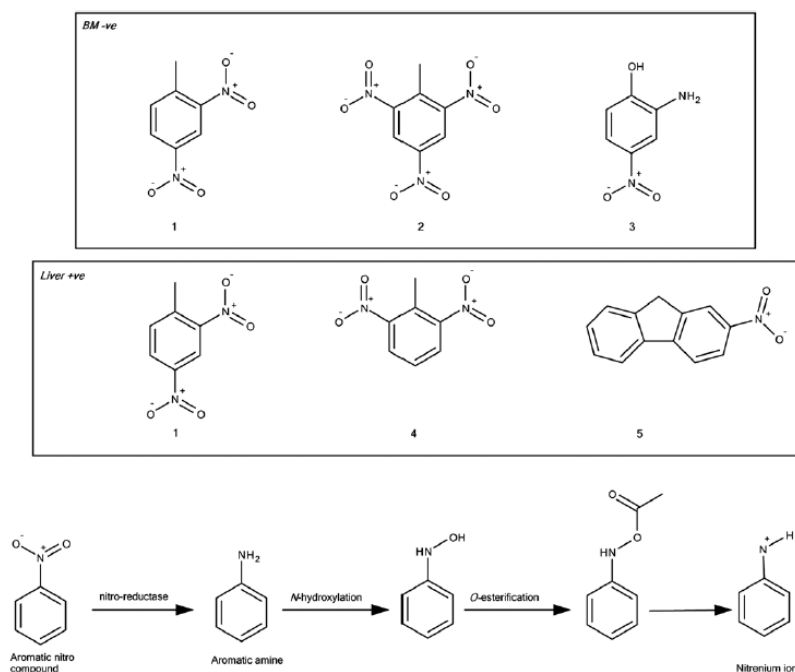
## D.1. 構造アラートに付加される情報の例

### D.1.1. 芳香族ニトロ化合物は組織特異的に活性を示す可能性がある

芳香族ニトロ化合物に関する *in vitro* アラートの *in vivo* データに対する PP は低かった (23%)。しかし *in vivo* データをより厳密に調査すると、芳香族ニトロ化合物はげっ歯類の骨髄小核試験では通常不活性であるのに対し、肝臓では活性を示す例があることが明らかとなった(図2)。例えば、マウス骨髄小核試験では 2,4-ジニトロトルエン (#1)、2,4,6-トリニトロトルエン (#2)、

2-アミノ-4-ニトロフェノール (#3) は陰性を示すことが報告されているが、対照的にラット肝小核試験においては 2,4-ジニトロトルエン (#1)、2,6-ジニトロトルエン (#4)、2-ニトロフルオレン (#5) の経口投与によって陽性反応が認められている。芳香族ニトロ化合物の変異原性および染色体異常誘発性には、ニトロ還元酵素によるヒドロキシルアミンへの還元と、これに続く O-エステル化およびニトレンウムイオンの形成が関与していると考えられる。この反応種は DNA などの細胞求核性分子に対する結合能を有する。芳香族ニトロ化合物の組織特異的活性を考慮すると、ニトレンウムイオンを形成する代謝過程(図2)のひとつ以上において肝臓に存在する酵素が必要であり、代謝活性化により生成される反応種が骨髄では形成されない、または分布していない可能性がある。

図2 芳香族ニトロ化合物の組織特異的活性と染色体異常誘発性の想定機序

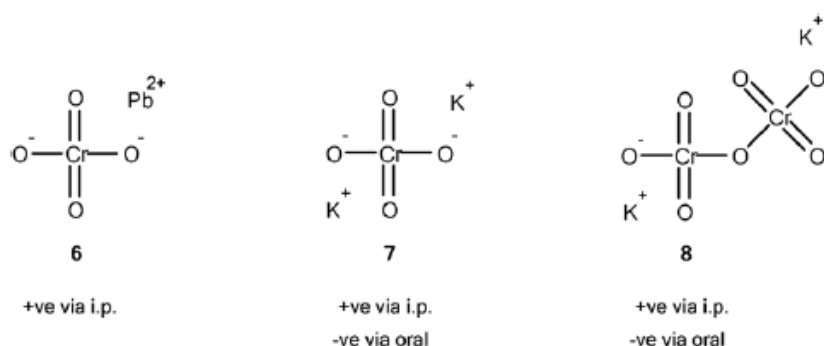


### D.1.2. クロム化合物は投与経路特異的に活性を示す可能性がある

クロム化合物に関する *in vitro* アラートの *in vivo* データに対する PP は良好 (100%) であった。しかし、実験データを詳細に分析すると、活性が投与経路に依存することが明らかになった。確認した化合物は腹腔内投与時のみ活性を示し、経口投与時には不活性であった (図 3)。例えばマウス骨髄

小核試験において、クロム酸鉛 (#6)、クロム酸カリウム (#7)、二クロム酸カリウム (#8) の腹腔内投与で陽性反応が報告されているが、クロム酸カリウムおよび二クロム酸カリウムは経口投与時には小核を誘発しなかった。六価クロム化合物が経口投与で活性を示さないのは、消化管からの吸収不良が原因とされている。

図 3 クロム化合物の投与経路特異的活性

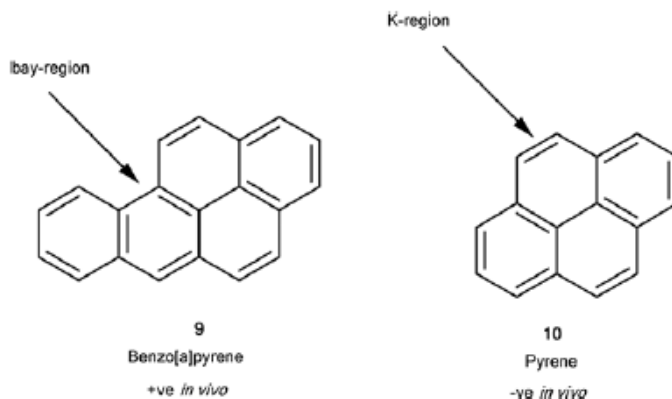


### D.1.3. Bay領域を有するPAHは*in vivo*で活性を示す可能性が高い

多環芳香族炭化水素 (PAH) に関する *in vitro* アラートの *in vivo* データに対する PP は中程度 (50%) であった。しかしデータをより厳密に調査すると、化合物のあるサブクラスの大部分が活性であることが示された。*In vitro* では bay 領域を有する PAH と K 領域を有する PAH の両方が活性を示すが、*in vivo* では bay 領域を有する PAH の

みが活性を示すことがデータより示唆されている (図 4)。例として、7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン、ベンゾ[a]ピレン (#9)、ジベンズ[a,h]アントラセンなどが挙げられる。K 領域は有するが bay 領域を欠く化合物は、*in vivo* 細胞遺伝学的試験で概して陰性を示した。このような化合物としてはピレン (#10) およびフェナントレンがある。

図4 多環芳香族炭化水素の *in vivo* 活性



#### D.1.4. ヒドロペルオキシドは *in vivo* では染色体損傷を誘導しないと考えられる

調査を行ったアラートのうち9種では、評価する化合物が *in vivo* 細胞遺伝学的試験で概して陰性を示した。よってこれらの *in vitro* アラートは *in vivo* 活性の予測には適さないと結論づけられた。これら9種については新たな推論ルールは追加しなかったが、アラートコメントを更新し当該アラートクラスが *in vivo* で不活性である説明を追加した。一例として、ヒドロペルオキシドが挙げられる。ヒドロペルオキシドは *in vitro* 染色体異常試験では活性を示すが、骨髄または末梢血で行う *in vivo* 試験では活性を示さないと考えられる。例えば過酸化水素は、*in vitro* 染色体異常試験において S9 mix 非存在下で陽性反応が報告されているが、マウス骨髄小核試験での経口投与時および腹腔内投与時、ラット骨髄染色体異常試験においては陰性と報告された。これらのケースでは、投与された反応性過酸化物がげっ歯類モデルの発達した *in vivo* 防御機構によって十分な不活化を受けたと考えられる。過酸化水素および他のヒドロペルオキシドは、ペルオキシダーゼ酵素

によって水やアルコールおよび酸素に効率的に代謝されるが、このような防御機構は *in vitro* では存在しないか抑制されている場合がある。一方で、過酸化水素が発がん性試験で陽性を示している場合もあることに注意する必要がある。過酸化水素を経口投与（飲料水）したところマウス小腸でがんが発現した。したがってこの場合も組織特異的な活性である可能性があるが、本仮説を裏付ける十分な *in vivo* 遺伝毒性試験の実験データがない。上記の例は、この種のアラートに関して得られる情報が豊富にあること、および専門家が利用可能な生データを解釈することの利点を明らかにする。さらに *in vitro* と *in vivo* で認められる結果の違いを説明する本研究のより一般的な知見も反映している。すなわち *in vivo* と *in vitro* の結果の相違が、様々な ADME 特性に起因すると考えられる場合もある。活性化合物は試験を行う組織に到達しなければならず、化学種の組織到達能力はいくつかの要素に左右される。親化合物が直接的に染色体損傷を引き起こし反応性であれば、被験組織に到達することが重要である。そして到達しているか不明な

場合には、十分な曝露が予想される組織（通常投与部位近辺）で試験を行う必要がある。化合物が代謝活性化により遺伝毒性を発現すると考えられる場合には、必要な活性化が *in vivo* 系で行われるかどうか検討する必要がある。さらに必要であれば、選択した活性部位に近接する組織とこれらの代謝活性産物との反応性についても考慮すべきである。またいずれの場合も、*in vitro* では存在していなかった可能性のある *in vivo* 系の代謝不活化経路も考慮する必要がある。以上のような詳細な情報は、本研究の一環として更新したアラートのコメント要約に統合した。

本研究開始時には知識ベースの予測 *in silico* システム Derek Nexus における *in vivo* 染色体損傷のエンドポイントの予測能は限定的であり、このことは MMS によって

提供されたデータセットに対する Derek nexus の性能統計から明らかであった（表 1）。*In vivo* 染色体損傷データの大きなデータセットを統合し、さらに Derek の知識ベースに既存の知識を活用することにより、Derek Nexus における *in vivo* 染色体損傷の予測能は比較的短期間で著しく改善された。MMS データセットに対して感度と一貫性の向上（各々、4%～40%、55%～61%）を認め、これに伴う特異度の低下は軽微であった（最終的な特異度は 79%：表 4）。本研究で調査した *in vitro* 染色体損傷アラート 32 種のうち、19 種を *in vivo* 活性の予測に拡大適用し、4 種を新たな *in vivo* SAR アラートに発展させた。そして 9 種は利用可能なデータに基づき拡大適用には適さないと判断した。

**表 4 MMS データセットに対する Derek Nexus 2014 の染色体損傷性（CD）予測性能**

	DfW の <i>in vivo</i> CD 予測：不明確あるいは高	DfW の <i>in vivo</i> CD 予測：報告なし	試験報告数
<i>in vivo</i> CD 陽性	45	67	112
<i>in vivo</i> CD 陰性	28	102	130

感受性：45/112 = 40%、特異性：102/130 = 79%、一貫性：147/242 = 61%

#### E. 考察

特異的メカニズムを介して染色体損傷を引き起こす可能性のある化合物クラスに関して、知識ベースに既存の知識（*in vitro* 染色体損傷アラート）と *in vivo* 染色体損傷データの大規模データセットとを組み合わせることで活用することにより *in vivo* 染色体損傷に関する知識ベースの予測 *in silico* システムを開発するという本研究で述べたアプローチは、効率的な手段であることが明らかに

なった。さらに採用した手法では、*in vivo* 試験結果の専門家による解釈が同結果の予測システム内へのコード化以前に行われ、予測を行う際にこの解釈が考慮される。本研究の結果、*in vivo* 染色体損傷の予測能は大幅に向上し、MMS データセットに対する感度は研究開始前の 4%から現在の 40%に改善すると同時に特異度は良好に維持された（79%）。残りのアラートを評価する利用可能な *in vivo* データが限られているという



ことは、*in vivo* 染色体損傷のエンドポイントに対する感度を向上させるという点において本研究の手法が限界に達したことを示している。しかし今後は関連する他のエンドポイント（例、変異原性や発がん性）に対するアラートの調査や *in vivo* データのみに基づくアラートの開発といった代替的アプローチが、*in vivo* 染色体損傷エンドポイントの予測能向上に寄与すると考えられる。

## F. 結論

*In vivo* 染色体損傷のエンドポイントに関するアラートが 33 種類構築され、さらに、*in vitro* 染色体損傷に関するアラート 9 種が更新された。その結果、Derek Nexus の *in vivo* 染色体損傷予測性は著しく改善された。

## G. 研究発表

### 誌上発表

1. Steven Canipa, Alex Cayley, William C Drewe, Richard V Williams, Shuichi Hamada, Akihiko Hirose, Masamitsu Honma, Takeshi Morita, Using *in vitro* structural alerts for chromosome damage to predict *in vivo* activity and direct future testing. *Mutagenesis*, 31, 17-25, 2016.
2. Takeshi Morita, Shuichi Hamada, Kenichi Masumura, Akihiro Wakata, Jiro Maniwa, Hironao Takasawa, Katsuaki Yasunaga, Tsuneo Hashizume, Masamitsu Honma, Evaluation of the sensitivity and specificity of *in vivo* erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens, *Mutation Research*, 802 (2016) 1-29.
3. Yurika Fujita, Takeshi Morita, Shoji Matsumura, Taisuke Kawamoto, Yuichi Ito, Naohiro Nishiyama, Hiroshi Honda, Comprehensive retrospective evaluation of existing *in vitro* chromosomal aberration test data by cytotoxicity index transformation, *Mutation Research* 802 (2016) 38-49
4. Petko I. Petkov, Terry W. Schultz, E. Maria Donner, Masamitsu Honma, Takeshi Morita, Shuichi Hamada, Akihiro Wakata, Masayuki Mishima, Jiro Maniwa, Milen Todorov, Elena Kaloyanova, Stefan Kotov, Ovanes G. Mekenyan, Integrated Approach to Testing and Assessment for Predicting Rodent Genotoxic Carcinogenicity, *Journal of Applied Toxicology*, 32, 1536-1550, 2016
5. Takeshi Morita, Chikako Uneyama, Genotoxicity assessment of 4-methylimidazole: Regulatory perspectives, *Genes and Environment* (2016) 38:20, DOI 10.1186/s41021-016-0050-z

### 学会発表

1. 本間 正充、増村 健一、森田 健：遺伝毒性発がん物質のリスク評価、第 43 回日本毒性学会、2016 年 6 月 28 日～7 月 1 日（7/1）、名古屋
2. 森田 健：安全性評価におけるイヌ慢性毒性試験とマウス発がん性試験の有用性、農薬評価におけるマウス発がん性試験の必要性、ラット発がん性試験に追加の意義、第 43 回日本毒性学会、

2016年6月28日～7月1日(6/29)  
名古屋

3. Yurika Fujita, Hiroshi Honda, Shoji Matsumura, Taisuke Kawamoto, Yuichi Ito, Takeshi Morita, Osamu Morita, Cytotoxicity-index transformation formulae and statistical-structural alerts for improvisation of current in silico clastogenicity evaluation, 45th Annual EEMGS (European Environmental Mutagenesis and Genomics Society) meeting, August 14-18, 2016, Copenhagen, Denmark.
4. Hiroshi Honda, Yurika Fujita, Shoji Matsumura, Taisuke Kawamoto, Yuichi Ito, Takeshi Morita, Osamu Morita, Cytotoxicity-Index-Transformation Formulae And Statistical-Structural Alert Enabling Refinement Of in silico Evaluation of Chromosomal Damage, 47th Annual EMGS (Environmental Mutagenesis and Genomics Society) meeting, September 24-28, 2016, Kansas City, Missouri.
5. Hamada S, Shigano M, Wakata A, Kawakami S, Uno F, Sui H, Yamada K,

Hagio S, Momonami A, Maeda A, Terashima Y, Ohyama W, Morita T, Honma M, Hayashi M, Novel Liver Micronucleus Assay using Formalin-fixed Rodent Liver, 47th Annual EMGS (Environmental Mutagenesis and Genomics Society)meeting, September 24-28, 2016, Kansas City, Missouri.

6. 山田雅巳, 森田健: 遺伝毒性評価における染色体異常試験の要否を問う、日本環境変異原学会第45回大会、平成28年11月17日(木)～18日(金)つくば
7. 藤田侑里香、本田大士、松村奨士、伊藤勇一、松田知成、森田健、森田修: 各種遺伝毒性試験結果を用いた発がん性の統合的評価戦略、日本環境変異原学会第45回大会、平成28年11月17日(木)～18日(金)つくば

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名：化学物質のヒト健康リスク評価における(定量的)構造活性相関および  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究(H27-化学-指定-005)

分担研究課題名：構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究

研究分担者 小野 敦 岡山大学・医歯薬学総合研究科 教授

### 研究要旨

本研究では、既知情報からの評価の可能性を判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、化学構造を指標として可能な限り効率的なリスク評価スキームを構築することを目的とした研究を進めている。本年度は、化学構造から計算される記述子や部分構造をもとに無毒性量（解析には NOEL（無影響量）を用いた）を基準とした毒性クラスを判定する統計的予測評価モデルを構築してスクリーニング評価への適用性について検討を行った。予備的な検討の結果、分子量、水素結合供与基の有無が予測精度に影響することが示されたことから、分子量と水素結合供与基の有無により適用範囲を限定した評価モデルをそれぞれ構築して、複数の評価モデルを組み合わせて、NOEL で設定した毒性クラスの評価を行う評価スキームを構築した。モデル構築には、Munro らの報告による毒性試験データセットを学習母集団として用い、ターゲット基準値を 200mg/kg/day とした毒性クラス判定を行うモデルを構築し、既存化学物質点検データセットを外部検証用データとして予測精度の検証を行った結果、分子量適用範囲を、100~600 の評価スキームにおいて、sensitivity、specificity いずれも 80% を超える予測精度が得られたことから適用範囲（評価モデルの coverage は約 70%）の化学物質のスクリーニング評価における有用性が示された。

#### A. 研究目的

現在、世の中には数万種に及ぶ既存化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、それらの化学物質のリスク管理は、世界的な課題となっている。さらに、我が国の化学物質規制法である化審法（「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」）では、良分解性物質や 10t 未満の物質（少量新規及び低生産量物質）については、ヒト健康影響に関するスクリーニング毒性試験の実施

無しに申請可能であるが、そうした物質であっても可能な限りヒト健康リスクを把握し適切な管理を行うことが望まれる。

化学物質のヒト健康影響評価は、動物を用いた安全性試験により評価されているが、評価の効率化や動物愛護の観点から、動物試験の削減と効率的な評価法が求められている。そうした背景から、既に安全性評価が実施済みの化学物質の毒性情報をもとに化学構造との関連から安全性評価を行う構造

活性相関手法の開発が世界中で進められているが、特にヒト健康影響評価において求められる反復投与毒性試験で評価される *in vivo* 毒性についての構造活性相関による評価については、これまでのところ国際的にリスク評価に受け入れ可能とされた評価モデルは開発されてない。一方、構造類似の化学物質群に含まれる幾つかの物質について得られている毒性情報をもとに、未評価の構造類似物質の毒性を類推評価するカテゴリアプローチによる安全性評価の検討も進められており、既に一部で実用化されている。しかし、カテゴリアプローチによる化学物質の類似性評価には、合意された客観的な手法が存在するわけではなく、評価を行うエキスパートによりケースバイケースでカテゴリの妥当性が判断されており、1つのカテゴリ評価を行うために非常に時間や労力がかかっているのが実情であり、またさらにカテゴリアプローチによる評価の実施に十分な毒性情報が得られている化学物質群は限られている。

構造活性相関モデル及びカテゴリアプローチは、既知情報から評価対象物質の評価を行う経験則に基づく手法であり両者に共通する問題点として、いずれの手法とも評価に用いたデータベースに毒性既知の類似物質の情報が得られていない新規構造物質については信頼できる評価や予測は不可能であることにある。

そこで本研究では、評価対象物質について既知情報からの評価が可能であるか判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、化学構造からの評価が可能と判断された物質については化学構造を指標として可能な限り効率的なリスク評価を行い、類似物質

について毒性情報が得られておらず化学構造のみからの評価が困難と判断された化学物質について、基本的な化学構造的特徴と短期毒性試験結果をもとにした毒性クラス判定を行う、段階的評価スキームを構築することにより、信頼性の高い効率的なリスク評価手法の開発を目的とした研究を進めている。本年度は、リスク評価において重要となる無毒性量評価のための化学構造記述子を用いた統計学的評価モデルの構築と検証を行った。

## B. 研究方法

### 1. モデル構築のためのデータセットの準備

モデル構築のためのデータセットとして Munro ら (Munro IC et.al., (1996) *Food and Chemical Toxicology*, 34, 829-867) により、Cremer ルールの検証に用いられたデータセットを用いた。毒性試験の無毒性量 (無影響量) は、用量設定にも依存することから Munro らの論文に掲載された毒性試験情報から、NOEL と LOEL を整理して、NOEL と LOEL いずれもが評価ターゲットとして設定した投与量に設定した無毒性量より低い物質を強毒性クラス、いずれもが高い物質を弱毒性クラスに分類し、NOEL と LOEL が、ターゲット投与量を挟む物質は除外してモデル構築に用いた。

### 2. 予備的なモデル構築による予測結果の解析

本研究に先立って、化学物質の反復投与毒性の強さ (NOEL) を定性的に評価するため、既存化学物質点検で実施された反復投与毒性試験結果について幾つかの NOEL 基

準値により化学物質を分類する評価モデルの構築を実施したが、いずれのモデルとも評価精度が不十分（外部検証 70%未満）であったことから、全ての化学物質を一つのモデルで評価することは困難であると判断された。そのため、本研究では、まず予備的なモデル構築を実施した。

予備的なモデル構築のため評価ターゲット用量 200mg/kg/day で用意したデータセットを用い、ADMEWORKS/ModelBuilderにより記述子を用いた約 2000 モデルを構築して、内部検証より予測精度が高かった 4 モデルの予測結果を用いて予測精度の悪い物質の特徴について分子量や物性の解析を行った。

### 3. 物性を限定した無毒性量クラス分類モデルと評価スキームの構築

上記 2 で実施した予測結果の解析より、評価対象物質の分子量及び水素結合供与基の有無による予測精度への影響が示唆されたため、最終的なモデル構築においては、モデルの適用範囲となる分子量を MW=200~500 と MW=100~600 とした 2 モデルを構築した。また、水素結合供与基を持つ物質を対象としたモデルと水素結合供与基を持たない物質を対象としたモデルを構築して、分子量域を限定したモデルとの組み合わせで評価を行う評価スキームを構築した。モデル構築においては、Munro データセットから各モデルの適応範囲に該当する物質を学習母集団として選択して用いた。構築した評価スキームについて、化審法既存点検試験により毒性試験が実施された物質を外部検証用データとして、予測精度の検証を行った。

## C. 研究結果

### 1. モデル構築のためのデータセットの準備

本研究では、Munro らのデータセットを学習母集団として、既存化学物質点検で得られたデータセットを外部検証集団として用いた。図 1 に、Munro らのデータセット (613 物質) から、解析ソフト ADMEWORKS/ModelBuilder (MB) で対応できない金属系、イオン系及び混合物を除外した 505 物質をターゲット投与量 200mg/kg/day で分類した NOEL、LOEL 分布を示した。横線の色は学習用クラス分類を示す。本研究ではターゲット投与量として 200mg/kg/day を設定した。図 1 において赤線で示す強毒性物質は 345 物質、青線で示す弱毒性は 138 物質であった。NOEL と LOEL が 200 mg/kg/day をまたぐ緑線で示す 22 物質は、学習母集団から排除した。外部検証の用いた既存化学物質点検データについても同様に分類して解析に用いた。

### 2. 予備的なモデル構築による予測精度の検証

Munro らのデータセット (613 物質) から、解析ソフト ADMEWORKS/ModelBuilder (MB) で対応できない金属系、イオン系及び混合物を除外した 505 物質のうち NOEL 基準 200 で分類された 483 物質 (強毒性: 345 物質、弱毒性 138 物質) を学習母集団として、パラメータを変更しながら約 2000 回のモデル構築を行い、予測精度の高い上位 4 モデルを用いて、既存点検データセット 183 物質、Munro データセット 483 物

質の分類を実施して、基本的な物性の予測精度の関連を検証した。図 2 には、学習母集団として用いた 483 物質中に類似度 85% 以上の類似物質が含まれない物質について、分子量分布と水素結合供与基の有無と全 4 モデルで正しく予測された物質と間違っ予測された物質の分布を示す。結果より分子量が 200 未満もしくは 500 以上の物質では予測精度が悪く、一方、水素結合供与基の有無により予測精度に違いがあることが示された。

### 3. 物性を限定した無毒性量クラス分類モデルと評価スキームの構築

分子量の適用範囲を限定したモデルとして構築した分子量 200~500、100~600 を対象としたモデルの分子量適用範囲の物質については、分子量を限定したモデルと水素結合供与基の有無によるモデルの 2 モデルの評価結果が一致した場合のみ評価結果を採用し、分子量適用範囲外の物質については、水素結合供与基の有無によるモデルの評価結果のみから評価を行う評価スキームを構築した。図 3 に、分子量を限定したモデルと水素結合供与基の有無によるモデルの組み合わせにより評価を行う評価スキームを示した。構築した分子量 200~500 及び 100~600 の評価スキームについて Munro らのデータセットを用いた内部検証結果を図 4 と表 1 に、化審法既存点検データセットを用いた外部検証結果を図 5 と表 2 に示した。いずれの検証結果においても、NOEL200 モデルは、分子量 200~500 モデル、NOEL200-16 モデルは、分子量 100~600 モデルによる予測評価結果で、全物質（すなわち分子量モデルの適用範囲外

の物質については水素結合供与基の有無によるモデルのみの予測結果を採用) を評価対象とした場合と、各分子量モデルの適用範囲内の物質のみを評価対象とした場合の結果を示す。内部検証結果ではいずれのケースでも sensitivity は、90 以上を超えるものの specificity は、評価対象を分子量 200~500 の物質のみに限定した場合には、85% と高いものの評価対象を広げた他のケースでは、74~75% に低下した。一方、外部検証では分子量 100~600 のモデルを用いた場合、sensitivity = 92%、specificity = 80% を達成した。分子量 200~500 モデルにおいても同程度の予測精度が得られたものの、coverage は 30% であった。これは、既存化学物質データセットには分子量 200 未満の化学物質が多く含まれることによるものである。

### D. 考察

本研究では、化審法におけるヒト健康影響評価で要求されるスクリーニング毒性試験のうち、特に反復投与毒性試験により評価される *in vivo* 毒性について化学構造を指標とした推定評価手法の実用化を目的とした研究を進めている。

反復投与毒性の構造活性相関手法については、これまでに肝毒性や腎毒性など毒性標的臓器ごとの毒性発現の評価モデルの構築などの検討が行われてきているが、スクリーニングレベルのリスク評価における *in vivo* 反復毒性試験においては、毒性の強さに応じた化学物質の管理のため、毒性の起さない用量である無毒性量を明らかにすることが重要な目的である。様々な毒性メカニズムによる毒性が根拠となる無毒性量を

化学構造的特徴から単一の手法で予測するのは困難であるものの、非常に構造が類似した化学物質についての毒性情報が得られている場合には、カテゴリーアプローチを代表例とする毒性類推の手法が適用可能であることが示されてきている。一方で、カテゴリーアプローチを始めとした構造類似物質の情報をもとにした評価手法は、既知情報から評価対象物質の評価を行う経験則に基いており、用いたデータベースに毒性既知の類似物質の情報が得られていない、新規構造物質については予測不可能であるかもしくは予測結果が得られたとしてもその信頼性は低い。

そこで本研究では、評価対象とする化学物質について既知情報からの評価の可能性を判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、これまでに蓄積された毒性情報をもとに化学構造からスクリーニングレベルの評価が可能な物質については化学構造からの予測評価を行い、類似物質の情報が不十分等の理由から化学構造からの予測が困難な物質についてのみ毒性試験を実施することにより評価の効率化をはかる、段階的評価スキームの構築を進めている。

本年度は、化学構造から計算される記述子や部分構造をもとに無毒性量（解析にはNOEL（無影響量）を用いた）を基準とした毒性クラスを判定する統計的予測評価モデルを構築してスクリーニング評価への適用性について検討を行った。本研究に先立って、化学物質の反復投与毒性の強さ（NOEL）を定性的に評価するため、既存化学物質点検で実施された反復投与毒性試験結果を学習母集団として用いた評価モデルを構築したものの、十分な予測精度を得られなかつ

た。そこで本研究では、まず予備的なモデル構築を実施した結果、分子量、水素結合供与基の有無が予測精度に影響することが示された。この結果より、全ての化学物質を一括して同一のモデルで評価するのは困難であり、適用範囲を限定した評価モデルのほうが高精度の評価を行えることを示している。そこで本研究では、分子量適用範囲を、200~500 と 100~600 に限定した評価モデルと、水素結合供与基の有無を適用範囲とした評価モデルを構築し、これらを組み合わせて評価を行う評価スキームを構築した。また、モデル構築には、既存化学物質データセットより多くの化学物質情報を含むMunroらの報告による毒性試験データセットを学習母集団として用い、ターゲット基準値を200mg/kg/dayとした毒性クラス判定を行うモデルを構築し、既存化学物質点検データセットを外部検証用データとして予測精度の検証を行った。結果として、分子量適用範囲を、100~600の評価スキームを用い評価対象分子量を100~600とした場合において、ある程度のカバー率（68%）を確保した高精度の予測が可能であることが示された。さらに、分子量適用範囲100~600の評価スキームでは全物質対象の評価結果においても sensitivity は、若干下がるものの sensitivity、specificity いずれも80%を超える予測精度が得られたことから、本研究で構築した評価スキームはスクリーニング評価において十分実用的であると考察される。一方で、分子量適用範囲100~600の評価スキームでは全物質対象とした場合でも、coverage が77%であった。これは、分子量適用範囲内の物質のうち、分子量モデルと水素結合供与基モデルの評価

結果が一致しないため判定結果が得られなかった物質が多くあることによる。本研究では、化学構造からの評価手法として本年度、検討を進めた統計的モデルとは別に、より単純な化学構造類似性を指標とした評価手法について検討を進める予定をしている。今後、評価のベースとなるデータセット内に類似物質情報が得られていれば、化学構造類似性を指標とした評価手法による適用範囲の拡大について検討を進める予定である。

## 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、化審法におけるヒト健康影響評価で要求されるスクリーニング毒性試験のうち、特に反復投与毒性試験により評価される *in vivo* 毒性について化学構造を指標とした推定評価手法の実用化を目的としている。これまでの研究から *in vivo* 反復投与による毒性の強さの評価については、評価対象の化学物質に類似した化学物質について情報が得られていれば、カテゴリーアプローチのような評価が、ある程度、可能であることが示されている一方で、多様な化学構造の化学物質を一括して評価する評価モデルの構築は難しく、本研究における予備的な検討においても実用レベルの予測精度を達成することは困難であることが示された。一方、本研究の結果から、評価対象化学物質の適用範囲を限定することで実用可能な予測精度のモデルを構築可能であることが示された。すなわち全ての化学物質について同一のルールやモデルで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判定

した上で選択して評価を行う評価スキームのほうが信頼性も実用性は高いと考えられる。本年度構築した評価モデルの適用範囲の化学物質については、評価モデルから信頼性の高いスクリーニング評価が可能であることが示された。本研究で構築を進めている、化学構造から適用可能な評価手法を判定し、評価を行う評価スキームは、評価未済みの化学物質のスクリーニング評価の効率化へ寄与すると結論された。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. M. Matsumoto, H. Todo, T. Akiyama, M. Hirata-Koizumi, K. Sugibayashi, Y. Ikarashi, A. Ono, A. Hirose and K. Yokoyama ; Risk assessment of skin lightening cosmetics containing hydroquinone.; Regul Toxicol Pharmacol, 81,128–135 (2016)
2. M. Hirata-Koizumi, R. Ise, H. Kato, T. Matsuyama, T. Nishimaki-Mogami, M. Takahashi, A. Ono, M. Ema and A. Hirose ; Transcriptome analyses demonstrate that Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) activity of an ultraviolet absorber, 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole, as possible mechanism of their toxicity and the gender differences.; J Toxicol Sci, 41,(5) 693–700 (2016)

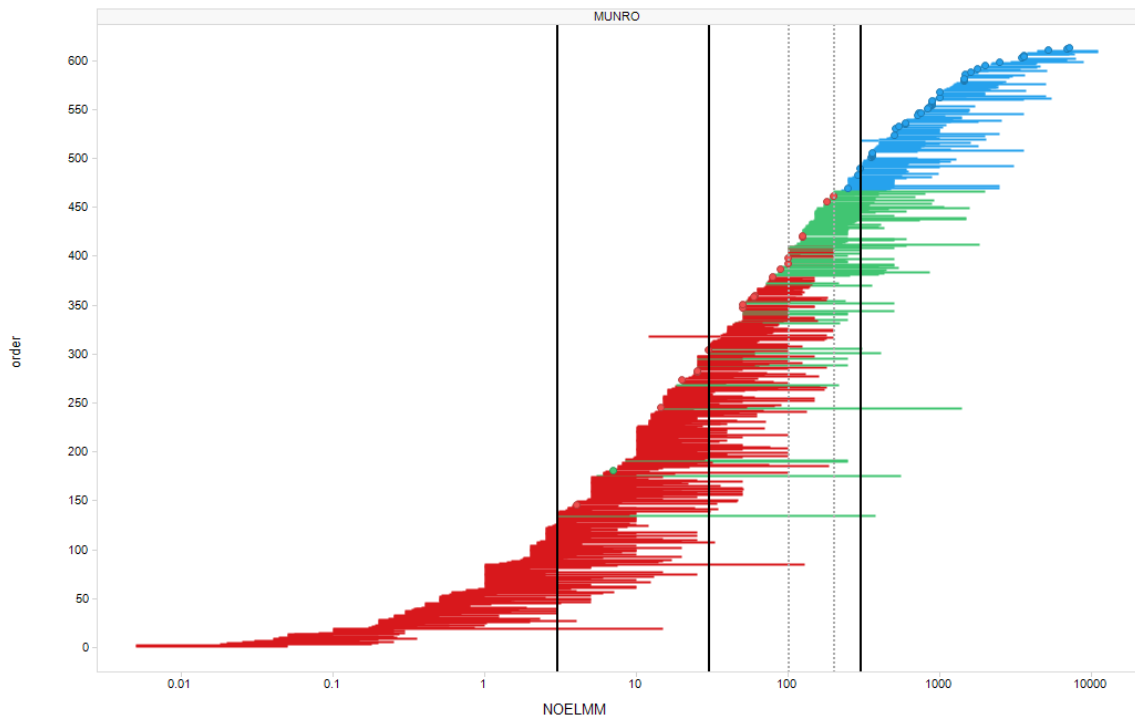
### 学会発表



1. A. Ono, J. Ciloy, M. Matsumoto, M. Takahashi, T. Kawamura and A. Hirose :Development and validation of a QSAR model to classify chemicals for toxic potency of sub-acute repeated dose toxicity. 17th International Conference on QSAR in enviromental and health sciences (2016.6, Miami Beach, Florida, USA)
2. A. Ono, H. Jinno and A. Hirose :Comparative analysis of respiratory and skin sensitization potential of chemicals using Japanese GHS classification.. The 52nd Eurotox2016 (2016.9, Sevilla, Spain)
3. A. Ono, H. Jinno and A. Hirose :Evaluation of the OECD QSAR Toolbox in the screening of chemical sensitizer.. The 14th International Congress of Toxicology (2016.10, Merida, Mexico)

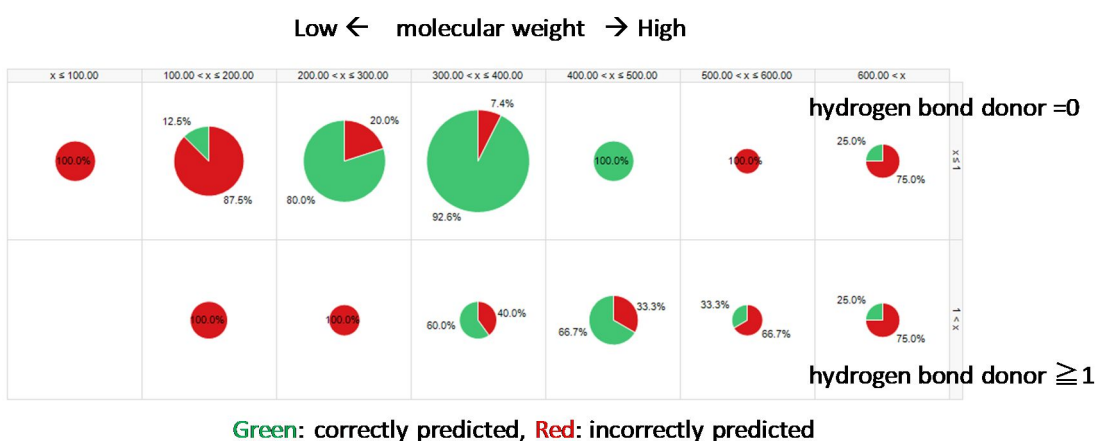
#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

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

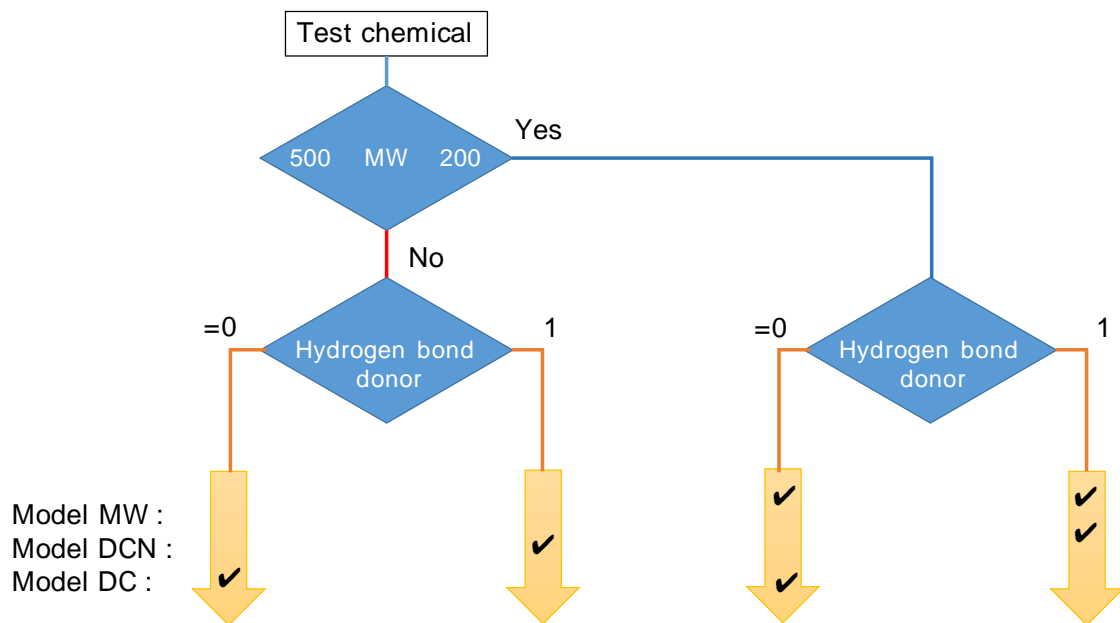


**図1 動物試験の NOEL-LOEL 範囲による毒性クラス分類**

; 学習母集団として用いた Munro IC et.al., (Food and Chemical Toxicology, 34, 829-867, 1996) のデータセットを投与量 200mg/kg/day でクラス分類した結果を示す。(各横線は化学物質の NOEL と LOEL の範囲を、線の色は、毒性クラス (赤: 強毒性、緑: 未分類、青: 弱毒性) を示す)

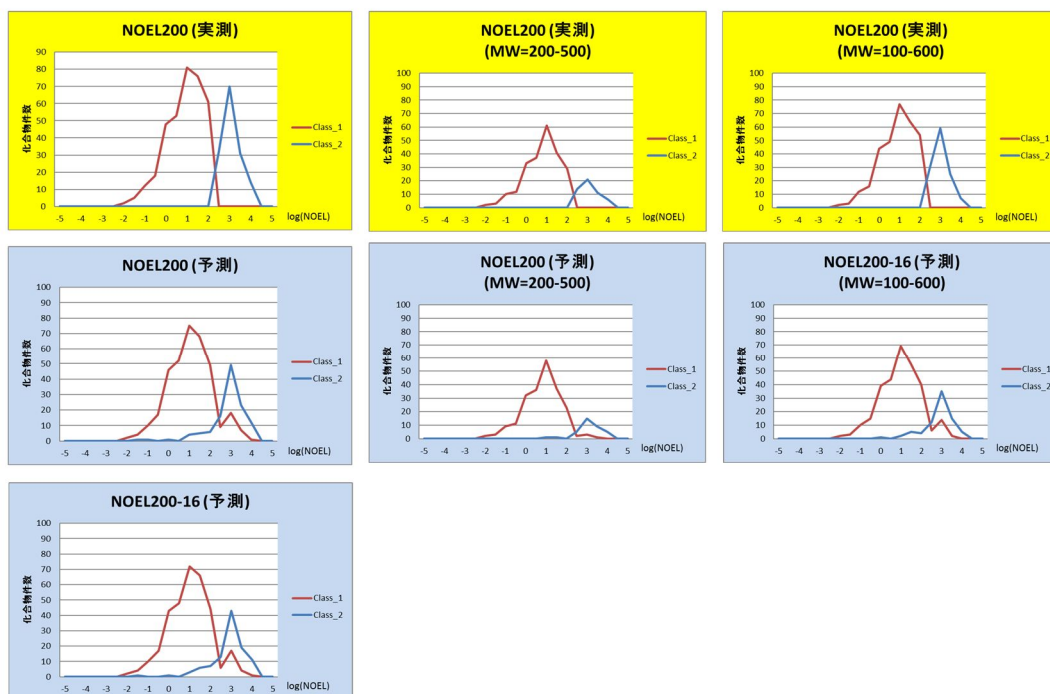


**図2 分子量と水素結合供与基の有無による予測精度の関係**



**図3 分子量モデルと水素結合供与基モデルの組み合わせによる評価スキーム**

；図は分子量 200～500 のモデルを用いた場合の評価スキームを示す。( Model MW : 分子量モデル、Model DCN : 水素結合供与基を有する物質を対象とした評価モデル、Model DC : 水素結合供与基を持たない物質を対象とした評価モデル)

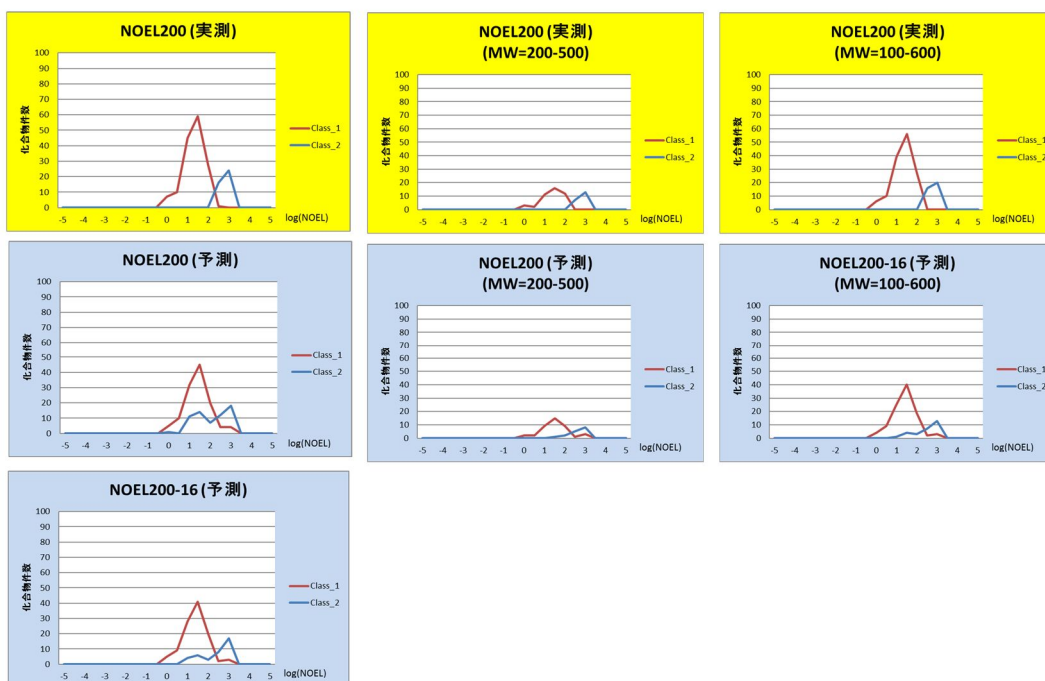


**図 4 組み合わせ評価スキームによる内部検証結果**

；動物試験結果（実測）による毒性クラスと予測モデルによる毒性クラスに分類された化学物質の NOEL 分布を示す。

**表 1 組み合わせ評価スキームによる内部検証結果**

モデル名	NOEL200	NOEL200-16	NOEL200 (MW=200-500)	NOEL200-16 (MW=100-600)
評価対象	全物質	全物質	MW=200-500の 物質のみ	MW=100-600の 物質のみ
TN	100	86	34	67
FP	35	28	6	22
TP	323	306	211	277
FN	18	18	2	12
ALL	476	438	253	378
COVERAGE	0.95	0.87	0.50	0.75
CONCORDANCE	0.89	0.89	0.97	0.91
SPECIFICITY	0.74	0.75	0.85	0.75
SENSITIVITY	0.95	0.94	0.99	0.96



**図5 組み合わせ評価スキームによる外部検証結果**

；動物試験結果（実測）による毒性クラスと予測モデルによる毒性クラスに分類された化学物質の NOEL 分布を示す。

**表2 組み合わせ評価スキームによる外部検証結果**

モデル名	NOEL200	NOEL200-16	NOEL200 (MW=200-500)	NOEL200-16 (MW=100-600)
評価対象	全物質	全物質	MW=200-500の 物質のみ	MW=100-600の 物質のみ
TN	29	24	13	20
FP	8	5	4	5
TP	112	103	37	97
FN	34	14	3	8
ALL	183	146	57	130
COVERAGE	0.96	0.77	0.30	0.68
CONCORDANCE	0.77	0.87	0.88	0.90
SPECIFICITY	0.78	0.83	0.76	0.80
SENSITIVITY	0.77	0.88	0.93	0.92



**平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書**

研究課題名：化学物質のヒト健康リスク評価における(定量的)構造活性相関および  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究(H27-化学-指定-005)

**分担研究課題名：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	安全性予測評価部	部長
研究協力者	高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	川村 智子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	Sebastien Guesne	ラーサ研究所		
研究協力者	Rachael Tennant	ラーサ研究所		
研究協力者	Lilia Fisk	ラーサ研究所		
研究協力者	Susanne Stalford	ラーサ研究所		

## 研究要旨

H28 年度は、昨年度に肝毒性エンドポイントに関連する Key Event と生体内経路プロファイルとの組み合わせにより構築した予測モデルを改良する目的で、各リードアクロス Key Event モデルの適用可能範囲の定義と WhichCyp の予測利用、化合物の求電子性炭素原子の部分電荷、Key Event のリードアクロスモデルの類似性カットオフの較正を行った。Key Event モデルの適用可能範囲を Key Event プロファイラーに統合した結果、予測性能は変わらなかったが、反復投与毒性データセットに対する性能数値計算から 7 種の化合物が out of domain となった。一連の CYP 酵素との結合予測は、Lhasa 社により KNIME に統合された WhichCyp ウェブサービスを利用し Key Event プロファイラーに統合した結果、特異度が上昇しが、感度が低下した。一方、部分的電荷の調査では、部分的電荷の記述子は、肝毒性化合物と非肝毒性化合物を識別できないことが示された。Key Event モデルの類似性係数スコアのカットオフについては、最もバランスのとれた正確度を達成するために、5 層交差バリデーション法\*を用いてそれらの類似性カットオフを較正した。これらの改良の結果、昨年度に比べて、特異度の上昇(44%から 52%に)と感度(57%から 49%へ)の低下が示されたが、正確度に変化は認められなかった。特異度の上昇で偽陽性の減少することができたが、低い感度は肝毒性につながる Key Event 不足を反映している。さらに適用可能範囲、生体内活性化、アラートや該当する Key Event、リードアクロスモデルの類似性係数を示す可視化ツールのプロトタイプを作成した。このツールを用いて Key Event プロファイラーの継続的改善を行うことにより、予測性能の信頼性向上が見込まれると考えられる。

## A. 研究目的

本研究に先立つ研究において、げっ歯類反復投与毒性データセットを用いて作成した肝毒性のラピッドタイプアラートをフルアラートへと発展させる研究を行ってきており、Derek Nexus における検出感度を、7%から 40%に上昇させることに成功してきた。しかし、公表論文の調査結果を用いて一つ一つアラートを検討するために相当の時間がかかることが問題点として挙げられてきた。そこで、昨年度は肝毒性エンドポイントに関連する key event を予測し、生体内経路の攪乱に関連する化合物群のプロファイルと組み合わせることにより予測モデルの構築を試みた。この肝毒性 Key Event プロファイラーは肝毒性反復投与データセットに対して比較的良好な感度を示したが(1000 mg/kg 超でのみ活性を示す化合物を除外すると 60%)、特異度は低かった(44%)。これは、特定の Key Event のアクティブ化が臓器毒性につながる代謝に関連する因子について、ほとんどまたは全く考慮しなかった可能性もあった。そこで今年度は、各 Key Event モデルの適用可能範囲の定義と WhichCyp の予測利用、化合物の求電子性炭素原子の部分電荷、Key Event のリードアクロスモデルの類似性カットオフの較正による改良を行った。

## B. 研究方法

### B-1 リードアクロスモデルの適用可能な範囲:

リードアクロスモデルに用いる所定の当該 Key Event データセットの一連の RDKit 記述子の最大値と最小値を考慮し、各 Key Event モデルの適用可能範囲を定義した。(図 1)

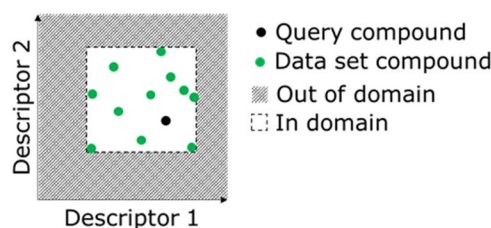


図 1. 適用可能範囲の定義。

Key Event データセットにおける記述子は、KNIME の RDKit Descriptor calculation ノードで化学構造から計算した。分子量、位相幾何学的(トポロジー)表面積、logP、原子の数、水素結合供与体の数、水素結合受容体の数、環の数など 117 の記述子がある。各 Key Event に対し、予測対象化合物の記述子の値が少なくとも 1 つの記述子変数の範囲を超える場合、モデルの適用可能範囲外と定義し、それ以外は範囲内と定義する。適用可能範囲外の予測対象化合物に関する予測は、信頼性に欠けると考えられたため、反復投与毒性データセットに対する性能数値の計算から除外した。

### B-2 WhichCyp 予測の統合:

WhichCyp は、Lhasa 社が KNIME 解析プラットフォームに統合したウェブサービスである。利用した KNIME の WhichCyp(バージョン 1.2)ノードは、基質がどのチトクロム P450 分子種に結合するかを予測する。バージョン 1.2 は、5 種の分子種(1A2、2C9、2C19、2D6 および 3A4)を検討する。こうした分子種それぞれへの結合に関する予測は、二値アウトカムとして得られる。WhichCyp 予測アウトカムは、プロファイラーにおいて、DX 知識ベースにマッピングされた Key Event に統合した。この Key Event は、基本となる予測対象化合物がチトクロム P450 分子種と結合しない場合、生



体内で活性化されないので反応性代謝物をもたらさないという前提に基づいた「求電子種に代謝される」カテゴリに属する。ワークフローは、図 2 に示す。

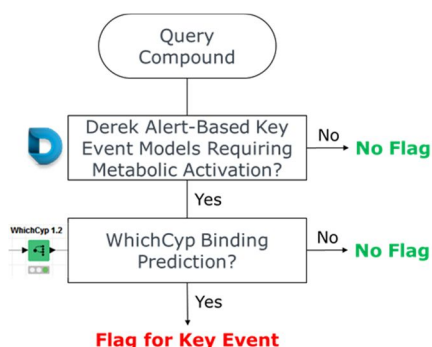


図 2. WhichCyp 予測統合のワークフロー

このルールを基に、Key Event をアクティブ化し代謝活性化を必要とするあらゆる予測対象化合物、およびチトクロム P450 分子種に結合しないと予測されたあらゆる予測対象化合物は不活性 (No Flag) と、それ以外は活性 (Flag for Key Even) とのプロファイルを示した。

### B-3 反応性の記述子としての部分的原子電荷

反復投与毒性試験データのデータセットの化合物のすべての部分的原子電荷を算出した。「直接的求電子性」カテゴリに属する Key Event でマッピングした DEREK NEXUS 知識ベースのアラートを特定し、次いで求電子反応に参与する原子位置の注釈を各パターンに付けた。予測対象化合物が「直接的求電子性」カテゴリに属するアラートとマッチする場合、求電子反応に参与している求電子性原子位置に対応した部分的原子電荷を抽出した。

最大値を予測対象化合物の反応性の定量値とみなした。次に、得られた真陽性および偽陽性の部分的原子電荷を比較し、陽性化合物と陰性化合物を識別する方法として適用した。

### B-4 リードアクロス Key Event モデルの類似性カットオフの校正

Key Event モデルについてのリードアクロスは、様々なアッセイでの比較的陽性の可能性が高い化合物のデータを使用すること、「陽性」データのみを使用すること、および類似性係数スコアのカットオフ (0.69) 以上の化合物を検討対象としている。このカットオフこれまで 0.69 は経験に基づいて選択していた。そこで、Key Event データセットに「陽性」および「陰性」の化合物の両方がある場合、最もバランスのとれた正確度を達成するために、5 層交差バリデーション法\*を用いてそれらの類似性カットオフを校正することにより、Key Event のリードアクロスモデルを改良した。

\*: 各データセットは、「陽性」および「陰性」の注釈に関して層別になるように大きさの等しい 5 層に分割する。1 層目はバリデーションセットとし、残りの 4 層はリードアクロスモデルのトレーニングセットとして使用する。0~1 の範囲内で増分が 0.01 のカットオフ値に対し、バリデーションセットとして扱う層での所見を基に、受信者動作特性 (ROC) 曲線パラメーターとその曲線下面積 (AUC) を算出する。この計算処理は、バリデーションセットとして扱う残りの 4 層についても繰り返した。この方法により、5 種の ROC 曲線パラメーターが得られ、単一の ROC 曲線パラメーターセットとして平均化により統合した。ROC 曲線では、1 つのモデルに対して 2 つのタイプのエラーを表示する。AUC でモデルの正確度を測定し、その性能を推定する。両タイプのエラーを最小限に抑えることを目的として、平均化した ROC

曲線パラメーターから、最もバランスのとれた正確度に対応するカットオフ値を、各リードアクロスモデルに対する最良のカットオフとして選択する。

## C. 研究結果

### C-1 リードアクロスモデルの適用可能範囲。

適用可能範囲を Key Event プロファイラーに統合した結果、予測性能は変わらなかったが、反復投与毒性データセットに対する性能数値計算から out of domain となったのは、7 種の化合物のみであった。この 7 種の化合物のうち 6 種には、反復投与毒性データセットでは陽性と判定されていた。これらの化合物は、リードアクロス Key Event モデルに用いたプロファイラーの Key Event によってカバーされないメカニズムを介して肝毒性が誘発されることを示している。各 Key Event に対して適用可能範囲内および範囲外にある反復投与毒性データセットの化合物の数を、適用可能範囲によってカバーされない反復投与毒性試験データのデータセットから得られた化合物の割合とともに表 1 に示す。

Out of domain となった化合物は新規性を示しており、その新規化学空間は、リードアクロス Key Event モデルのカバレッジを向上させることを目的として調査する必要がある。これは、該当する Key Event のカバレッジ不足を反映する範囲外の割合が高いという事実によっても裏付けられる。例証化合物として「CYP 阻害物質 (RA)」や「RAR 結合物質 (RA)」などがある。

### C-2 WhichCyp 予測の統合化

WhichCyp を Key Event プロファイラーに統合した結果、表 2 に示すように特異度が上昇し、感度が低下した。

図 3. は、Key Event プロファイラーへの WhichCyp 統合前および統合後において代謝活性化を必要とした Key Event に対する「真陽性」数および「偽陽性」数の内訳を示す。代謝活性化を必要とした Key Event 全体にわたり、「偽陽性」の減少幅は「真陽性」の減少幅よりも大きいという一般的傾向が見られる。そのため、Key Event モデルの陽性適中率が上昇した

「DNA 反応性求電子剤 (M)」および「タンパク質反応性求電子剤 (M)」の Key Event の陽性適中率は、それぞれ 46 から 56%、42 から 55% に上昇した。WhichCyp 予測が最も重要な CYP 分子種をカバーしているにも関わらず、他の分子種に結合するクエリー化合物が予測されないため、それらが実際に陽性である場合でも陰性とみなされる可能性がある。これは、相伴う「真陽性」の減少の説明となるかもしれない。

### C-3 反応性の記述子としての部分的原子電荷

求電子性原子の部分電荷の調査では、図 4 に示すように、この記述子は、用いたアルゴリズム (Lhasa Limited 社または RDKit) を問わず、「直接的求電子性」カテゴリに属する Key Event の「真陽性」と「偽陽性」を区別できないことが示された。しかし、中央値を見た場合、「真陽性」の部分電荷は「偽陽性」の部分電荷よりも大きくなりやすい傾向があるように思われる。

Key Event 別ボックスプロットの内訳を見た場合、**エラー! 参照元が見つかりません。**はこの傾向が Lhasa Limited 社のアルゴリズムを用いた「DNA 反応性求電子剤」Key Event の方が強いことを示している。しかし、「DNA 反

応性求電子剤」Key Event のデータが不十分なため、信頼性のある確信的な結論を明確に述べる事ができない。反応性の代替となる有効な記述子を探す必要があると考えられる。

#### C-4 リードアクロス Key Event モデルの類似性カットオフ値の校正

各 Key Event データセットに関する陽性および陰性の実験データの集計結果を図 6 に示す。

プロファイラーに用いた 30 の Key Event データセットがあり、このうち 16 は陽性および陰性両方の注釈を包む。これらに対し、類似性カットオフ法の校正を適用し、方法で述べたように ROC 曲線および AUC を算出した。AUC については、図 7 に要約する。AUC が 0.6 未満(図 7 中の赤い横線)のリードアクロス Key Event モデルは、校正に適合しているとみなさず、したがって経験に基づく 0.69 のカットオフは変更しなかった。これらのモデルは、Key Event プロファイラーの中にそのまま残した。

そのため、12 のリードアクロス Key Event モデルのカットオフ値を校正した。校正プロセスと結果を詳細に図示するため、3 つのリードアクロス Key Event モデルを選択した。図 8 はリードアクロスモデル BSEP 阻害物質、MMP 阻害物質および MRP2 阻害物質に関する結果を要約したものである。一番上のグラフは AUC であり、一番下のグラフはコスト関数である。コスト関数はバランスのとれた正確度がカットオフ(図では閾値)に応じてどのように変化するかを図示しており、バランスのとれた正確度が、下降する前にどのカットオフで最大値(赤い縦線)に達するのを示す。色付きのプロットは 5 つの個々のバリデーションセットであり、黒いプロットはそれらの平均を示す。

選択したリードアクロス Key Event モデルに対して最もバランスのとれた正確度が得られるカットオフを、表 3 に要約する。カットオフ値は 0.45 から 0.85 の範囲にあり、それらのうちと 2 つ、すなわち MMP 阻害物質と PPARdelta 結合物質については、経験に基づく値 0.69 に非常に近い。これらの校正したカットオフ値は、Key Event プロファイラーに統合した。

#### D. 考察

上述した改善の統合後における反復投与毒性試験データの肝毒性プロファイラーデータセットの予測性能を表 4 に示す。

肝毒性プロファイラーにより予測した「偽陽性」の数が 68 減少した一方で、「偽陰性」の数は 45 増加した。正確度は変わらず、感度は低下し、特異度は上昇した。

全般的に、正確度は変化しなかったにも関わらず、予測はより良好なクオリティの状態にあるという傾向が見られた。この傾向を調査するため、毒性メカニズムが既知の ToxBank プロジェクトから得た一連の化学物質を Key Event プロファイラーで処理した。その結果、18 種中 15 種の化学物質を捉え、予測の正確度を確認するためにプロファイラーの結果を表示した。化合物名、標的、毒性、構造および毒性メカニズムは、ToxBank プロジェクトのウェブサイトからの表 5 に要約した。これらの化学物質は「SEURAT-1 liver gold reference compounds」と呼ばれ、毒性のメカニズムは公開文献でレビューされている。

また、これまでの作業が円滑に行えるように、Instant JChem を利用して可視化ツールのプロトタイプを作成した。このツールは、Key Event プロファイラーの結果を示すわかりやす

い明確な方法を提供するとともに、潜在的な肝毒性物質としてのクエリー化合物について決定する際に役立つ可能性があると考えられる。表 5 の縦の列「毒性メカニズム」における太字テキストは、プロファイラーがカバーする既知の毒性メカニズムである。このツールで、ユーザーは、適用可能範囲、生体内活性化、示されるアラートや、それらにマッピングした該当する Key Event、ならびにリードアクロスモデルの類似性係数と該当する構造に関してプロファイラーが提供するあらゆる予測と情報を見ることが可能となる。

可視化ツールのスクリーンショットを、図 9 に示す。「SEURAT-1 liver gold reference compounds」のプロファイラーの結果は、文献に記述されている毒性メカニズムと比較可能な表 5 に要約する。プロファイルが示されなかったクエリー化合物は、Key Event プロファイラーにおける不足を示唆しており、こうした不足に対して追加のデータを検索することが必要となる。例証化合物としては、TO901317、ロテノンおよびジルロタピドが挙げられる。TO901317 は LXR 核受容体の既知のアゴニストであり、実際、現在のプロファイラーには LXR アゴニストに関するデータが全くない。この可視化ツールを用いる同じ手法は、Key Event プロファイラーがカバーしない毒性のメカニズムに対しても適用できる。定量的な方法で可視化ツールのプロトタイプを用いて行う予測の正確度 / 精密度を明確に示すのは困難であることがわかったにも関わらず、このアプローチによって、知識 / データの不足を埋められるおよび / または見つけ出せる可能性がある。予測の正確度の質的評価は、許容可能であることがわかった。

## 参考文献

- Rostkowski, M., Spjuth, O. & Rydberg, P. WhichCyp: Prediction of cytochromes P450 inhibition. *Bioinformatics* 29, 2051–2052 (2013). doi: 10.1093/bioinformatics/btt325
- Mathea, M., Klingspohn, W. & Baumann, K. Chemoinformatic Classification Methods and their Applicability Domain. *Mol. Inform.* 35, 160–180 (2016). doi: 10.1002/minf.201501019
- RDKit: Open-Source Cheminformatics Software. RDKit Nodes for KNIME (trusted extension). Available at: <https://tech.knime.org/community/rdkit>. (Accessed: 25th January 2017)
- James, G., Witten, D., Hastie, T. & Tibshirani, R. in *An Introduction to Statistical Learning with Applications in R* 175–202 (Springer, 2015).
- Fawcett, T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit. Lett.* 27, 861–874 (2006). doi:10.1016/j.patrec.2005.10.010
- ToxBank. Available at: <http://www.toxbank.net/>. (Accessed: 25th January 2017)
- Jennings, P. et al. SEURAT-1 liver gold reference compounds: a mechanism-based review. *Arch. Toxicol.* (2014). doi:10.1007/s00204-014-1410-8
- ChemAxon. Instant JChem 14.8.11.0, 2014. Available at: <http://www.chemaxon.com>. (Accessed: 25th January 2017)

## E. 結論

H28年度は、肝毒性につながる Key Event の統計学的なモデル化について、リードアクロス法の類似性閾値を較正することで改善され、適用可能範囲ルールを肝毒性プロファイラーに統合した。リードアクロス Key Event モデルの適用可能範囲は、各 MIE/KE データセット内の化学的記述子 (RDKit) の最小値と最大値で定義した。クエリー化合物は、その化学的記述子が、該当する MIE/KE データセットの化学的記述子の最小値と最大値の間に収まった場合に、MIE/KE 適用可能範囲の中で検討した。

「DNA 反応性求電子剤」または「タンパク反応性求電子剤」のようなエキスパートルールに基づいた Key Event を誘発する化学物質に関連した反応性記述子であると考えられたため、部分的電荷の記述子を調査したが、今回の検討では、部分電荷が「偽陽性」と「真陽性」を区別する有用な記述子でないことが示された。

一連の CYP 酵素への結合予測は、肝毒性プロファイラーにおいてエキスパートルールに基づいた Key Event に統合した。この Key Event は「求電子種に代謝される」カテゴリに属する。一連の CYP 酵素との結合予測は、Lhasa Limited 社により KNIME に統合された WhichCyp ウェブサービスを利用して得られた。

昨年度のプロジェクトと比べた適中率に関する周辺変化に促され、我々は肝臓毒性のメカニズムが既知の化学物質に対する予測で例証される Instant JChem を用いて、プロファイラー予測用の可視化ツールを設計することとした。このツールは、Key Event プロファイラ

ーの結果を示すわかりやすい明確な方法を提供するとともに、潜在的な肝毒性物質としてのクエリー化合物に関して決定する際に役立つ可能性があると考えられる。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Hirata-Koizumi M, Ise R, Kato H, Matsuyama T, Nishimaki-Mogami T, Takahashi M, Ono A, Ema M, Hirose A. Transcriptome analyses demonstrate that Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) activity of an ultraviolet absorber, 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole, as possible mechanism of their toxicity and the gender differences. *The Journal of Toxicological Sciences* 41:693-700 (2016)
2. Yamada, T., Hirose, A., Case study on the use of an integrated approach to testing and assessment for hepatotoxicity of allyl esters. Organisation for Economic Co-operation and Development, Series on Testing & Assessment No. 253, ENV/JM/MONO (2016)
3. 大内 淳子, 山田 隆志. 化粧品安全性評価のためのコンピューター予測モデルの活用. *Cosmetic Stage*10, 1-8 (2016)

## 学会発表

1. Yamada T, Hirata-Koizumi M, Ise R, Kato H, Matsuyama T, Nishimaki-Mogami T, Takahashi M, Kawamura T, Ema M, Hirose A, Ono A. Transcriptome analyses of an ultraviolet absorber, 2-(2-hydroxy-3,5-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in rats. DIOXIN2016 (Florence, August, 2016)
2. A. Ono, J. Ciloy, M. Matsumoto, M. Takahashi, T. Kawamura and A. Hirose: Development and validation of a QSAR model to classify chemicals for toxic potency of sub-acute repeated dose toxicity. 17th International Conference on QSAR in environmental and health sciences (2016.6, USA)
3. T. Yamada, M. Honma, and M. Hayashi: Recent advances in Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) and read-across for chemical safety assessment. ICCA-LRI and NIHS Workshop (2016.6, Awaji Island, Japan)
4. T. Yamada, M. Hayashi and A. Hirose: Development of read-across

for chemical safety assessment.

Asian Congress 2016 on Alternatives and Animal Use in the Life Science (2016.11, Karatsu, Japan)

## **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

表 1. Key Event の適用可能範囲内および範囲外にある反復投与毒性データセットの化合物数  
(RA = リードアクロス)

Key Event	Out of domain	In domain	% out of domain
BSEP Inhibitor (RA)	321	1136	22.0
MRP2 Inhibitor (RA)	288	1169	19.8
MRP3 Inhibitor (RA)	407	1050	27.9
MRP4 Inhibitor (RA)	407	1050	27.9
CPT1 Inhibitor (RA)	1287	170	88.3
CPT2 Inhibitor (RA)	1357	100	93.1
MitoTox (RA)	579	878	39.7
MMP Inhibitor (RA)	233	1224	16.0
NADH Depletor (RA)	1382	75	94.9
MTTP Binder (RA)	1452	5	99.7
CYP Inhibitor (RA)	1457	0	100
GSH Adduct Former (RA)	497	960	34.1
PPARalpha Binder (RA)	230	1227	15.8
PPARdelta Binder (RA)	376	1081	25.8
PPARgamma Binder (RA)	420	1037	28.8
FXR Binder (RA)	230	1227	15.8
PXR Binder (RA)	254	1203	17.4
P450 Inhibitor (MDI assay) (RA)	747	710	51.3
ROS Intensity Modifier (RA)	604	853	41.5
Lipid Intensity Modifier (RA)	604	853	41.5
CytoTox Causing (RA)	1352	105	92.8
CAR Binder (RA)	1444	13	99.1
ER Binder (RA)	612	845	42.0
LXR Binder (RA)	1189	268	81.6
AHR Binder (RA)	1334	123	91.6
GR Binder (RA)	1129	328	77.5
RAR Binder (RA)	1452	5	99.7
RXR Binder (RA)	1432	25	98.3
Tubulin Binder (RA)	1211	246	83.1
Topoisomerase Inhibitor (RA)	1116	341	76.6

表 2 WhichCyp 統合化による Key Event プロファイラーの性能指標。

PPV = 陽性適中率、NPV = 陰性適中率。

	Bal Accuracy	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Profiler	0.507	0.564	0.450	0.378	0.634
Profiler + WhichCyp	0.517	0.490	0.544	0.389	0.642

表 3 較正したリードアクロス Key Event モデルのカットオフ値。

Key Event	Cut-off
BSEP Inhibitor	0.61
CytoTox Causing	0.58
FXR Binder	0.64
MMP Inhibitor	0.68
MRP2 Inhibitor	0.85
MRP3 Inhibitor	0.77
MRP4 Inhibitor	0.59
MitoTox	0.75
PPARalpha Binder	0.45
PPARdelta Binder	0.67
PPARgamma Binder	0.54
PXR Binder	0.58

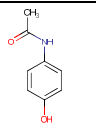
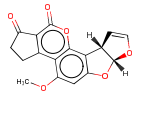
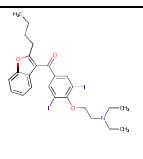
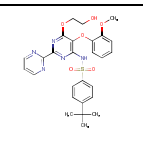
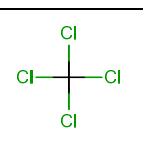
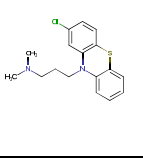
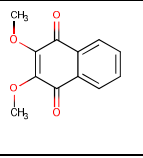
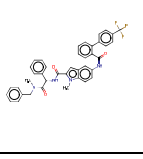
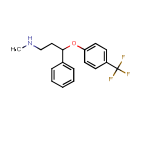
表 4. 反復毒性データセットに対する Key Event プロファイラーの予測性能。

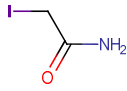
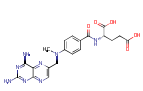
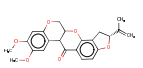
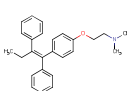
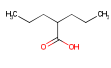
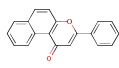
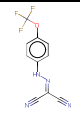
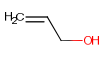
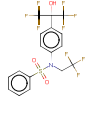
TP = 真陽性、FP = 偽陽性、TN = 真陰性、FN = 偽陰性。

Profiler (Year)	Bal Accuracy	Sensitivity	Specificity	TP	FP	TN	FN
Profiler (H27 年度)	0.51	0.57	0.44	310	511	402	234
Profiler (H28 年度)	0.50	0.49	0.52	265	443	470	279



表 5. ToxBank 及びプロファイラー結果から得られた毒性メカニズムが既知の化学物質 (M)は、生体内活性化が必要とされる;(\*) DX 知識ベースにおいて肝毒性アラートを示すクエリー化合物

Name	Target	Toxicities	Structure	Toxicity mechanism(s)
Acetaminophen*	COX-2c	Cytotoxicity		<b>Protein reactive (M)</b> <b>Depletion of GSH</b> <b>Mitochondrial Membrane potential</b>
Aflatoxin B1*	possibly DNA binding	Apoptosis		<b>DNA reactive (M)</b> <b>Protein reactive (M)</b> <b>Depletion of GSH</b> <b>Formation of ROS (lipid peroxidation, oxidative DNA damage)</b>
Amiodarone*	beta blocker K channel blocker	Cytotoxicity Phospholipidosis Steatosis		<b>Inhibition of electron transport</b> <b>Inhibition of fatty acids oxidation</b>
Bosentan	endothelin receptor antagonist	Cholestasis		<b>BSEP inhibition</b>
CCl4 (tetrachloromethane)*	MOA standard for free radical generation	Cytotoxicity Steatosis		<b>Protein reactivity (M)</b> <b>Lipid Oxidation (M)</b> <b>Covalent modification of MTP lipid transporter (followed by transporter proteolysis)</b> <b>Hypermethylation of RNA - leading to disruption of protein synthesis</b>
Chlorpromazine	dopamine, serotonin, adrenergic, histamine receptors	Cholestasis Cytotoxicity		<b>Protein reactive (M)</b> <b>Promiscuous protein inhibitor</b> <b>Decrease in mitochondrial membrane potential</b> <b>GSH depletion</b> <b>BSEP inhibition</b>
Dimethoxynaphthoquinone (DMNQ)	MOA standard for redox cycling	Cytotoxicity		<b>Redox cycling (leading to oxidative stress)</b>
Dirlozapide	MTTP inhibitor	Steatosis		<b>MTTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) inhibitor - leading to triglycerides accumulation</b>
Fluoxetine	Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), NMDA receptors containing the GluN2B	Phospholipidosis		<b>cationic amphiphilic drug (CAD) - accumulate in lysosomes leading to phospholipidosis</b>

Name	Target	Toxicities	Structure	Toxicity mechanism(s)
Iodoacetamide	MOA standard for thiol alkylation	Cytotoxicity		<b>Protein alkylation</b> <b>GSH alkylation</b> Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase inactivation
Methotrexate	Dihydrofolate reductase (DHFR) inhibition	Fibrosis		Inhibition (MXT polyglutamate) of dihydrofolate reductase, thymidylate synthase and AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) transformylase MTX indirectly inhibit MTHFR (methylene tetrahydrofolate reductase)
Rotenone	complex I/ubiquinone	Cytotoxicity		Inhibitor of complex I of mitochondrial respiratory chain - as result in increase of production of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , superoxide, oxygen radical species (mitochondria dysfunction, DNA fragmentation and lipid peroxidation)
Tamoxifen*	estrogen receptor	Cholestasis Steatosis		Increased synthesis of triglycerides <b>Phospholipidosis</b> <b>Mitochondrial dysfunction (uncoupling agent, inhibitor of electron transport chain)</b>
Valproic Acid*	GABA transaminase	Cytotoxicity		<b>Competitive inhibitor of fatty acid metabolism</b> Promiscuous activity - disruption of membrane integrity <b>Carnitine depletion (leading to inhibition of fatty acid transport)</b> Metabolism to Michael acceptor Free radical propagating activity
β-Naphthoflavone		Modulation of lipid metabolism with increased cholesterol metabolism and steatosis.		<b>AHR (aryl hydrocarbon receptor) agonist</b>
FCCP		Cytotoxicity		<b>Decrease mitochondrial membrane potential (due to protonophoric properties)</b> <b>Uncoupler of respiration from ATP synthesis</b>
Allyl alcohol*		Cytotoxicity Fibrosis		<b>Protein reactive (M)</b> Oxidative stress, reduction of Mitochondrial Membrane potential
TO901317		Steatosis via induction of fatty acid synthesis		Agonist for LXR-α and LXR-β nuclear hormone receptors

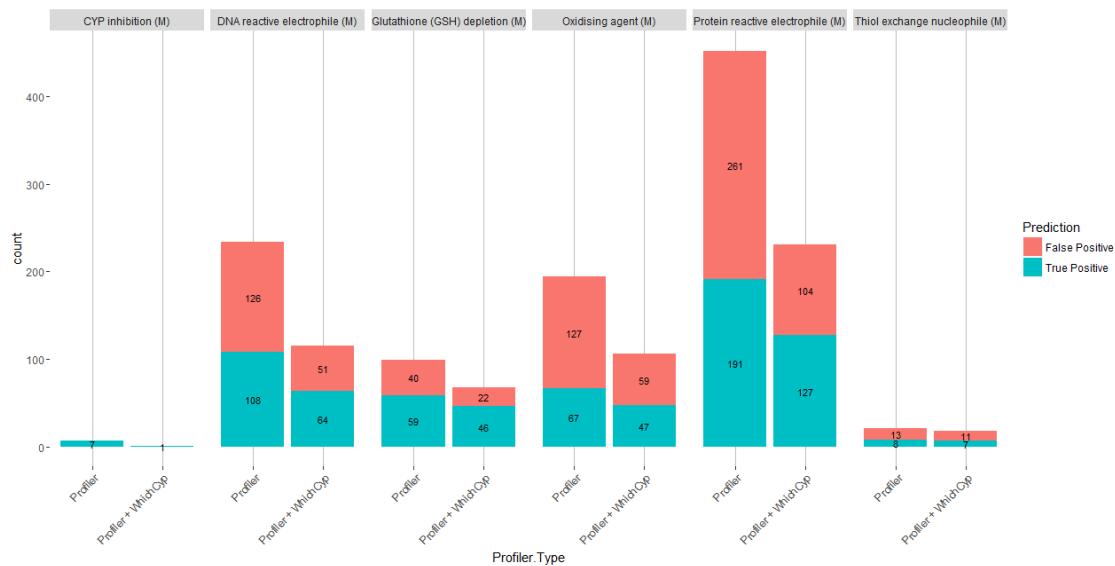


図 3. 反復投与毒性試験データセットに対する各 Key Event 性能

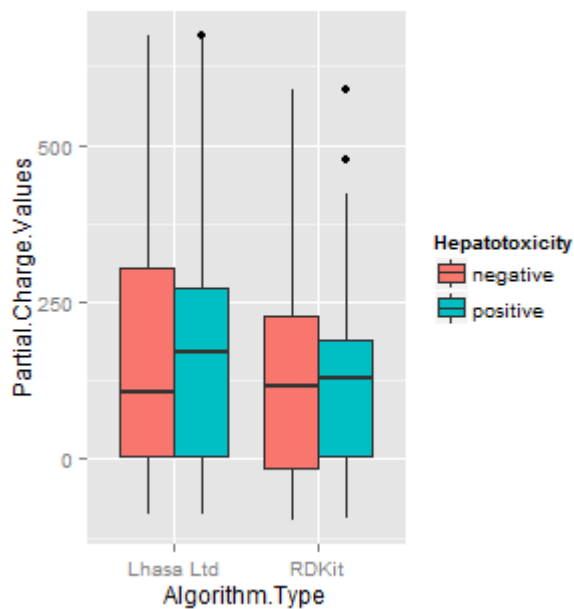


図 4. 「真陽性」および「偽陽性」に対する求電子性原子の部分電荷のボックスプロット

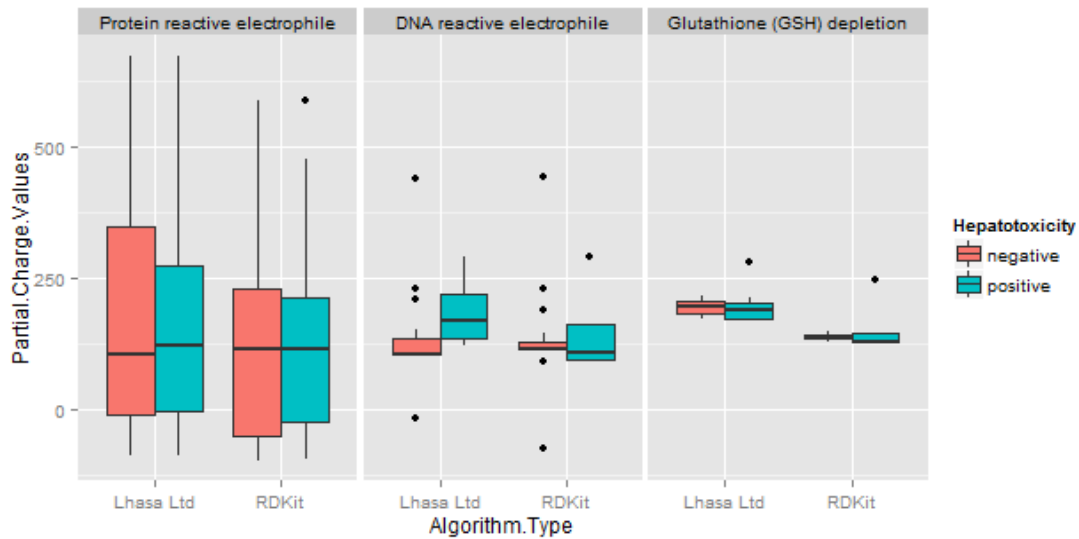


図 5. 「真陽性」および「偽陽性」に関する求電子性原子の部分電荷の Key Event 別ボックスプロット

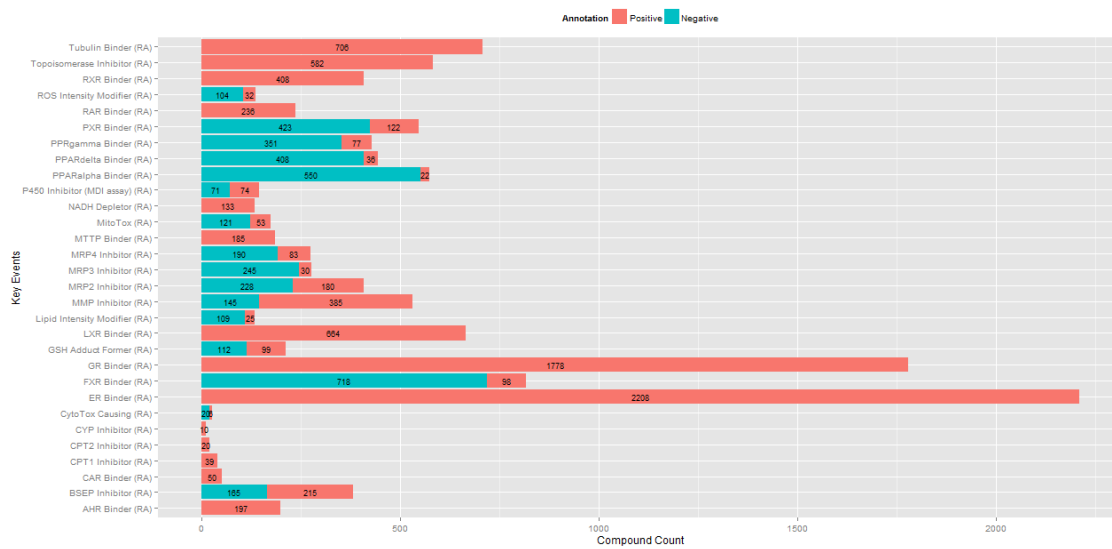


図 6. 各 Key Event データセットに関する陽性および陰性の実験データの集計結果

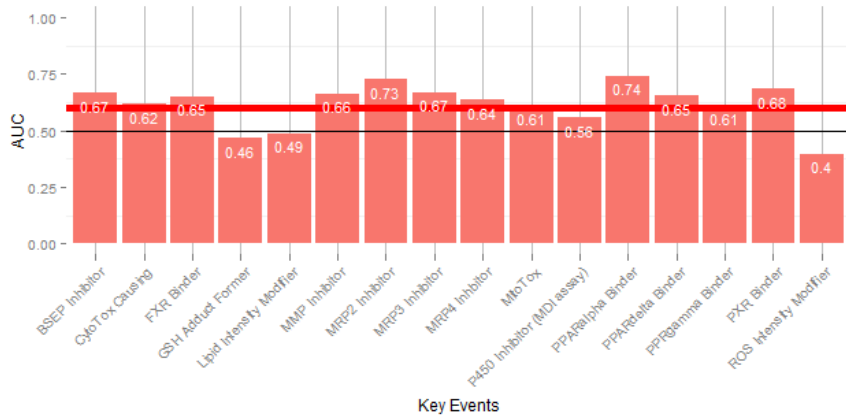


図 7. リードアクロス Key Event モデルの曲線下面積(AUC)

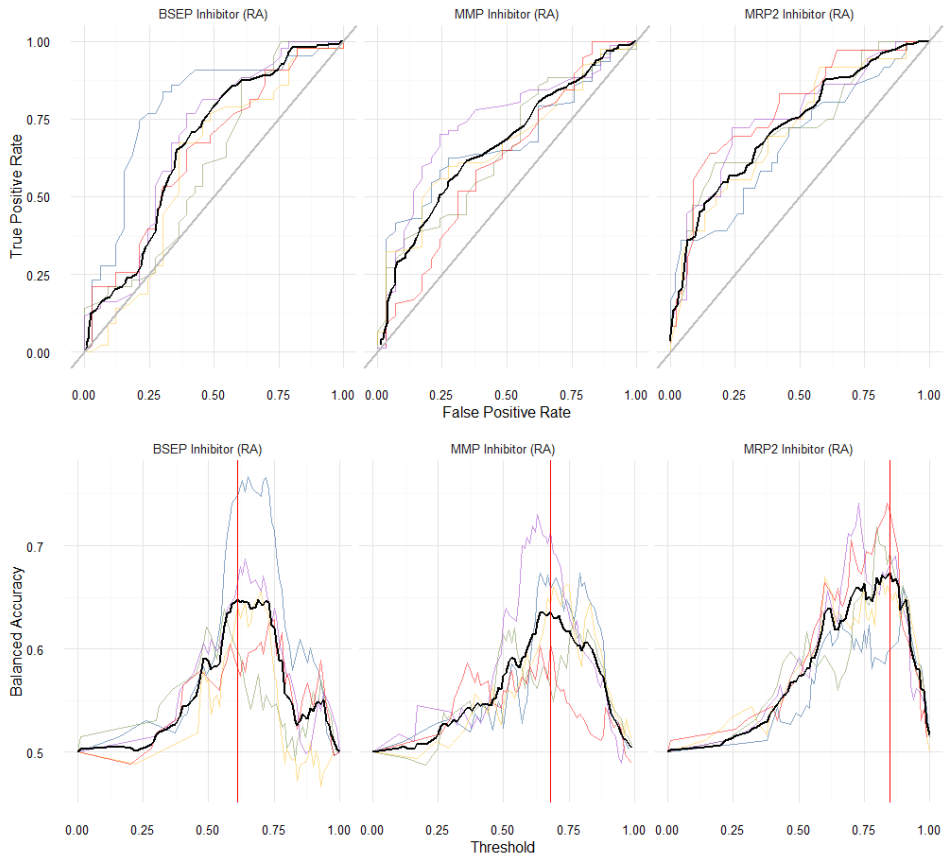
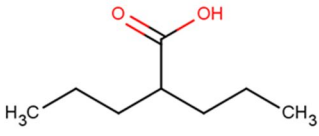





図 8. リードアクロスモデル BSEP 阻害物質、MMP 阻害物質および MRP2 阻害物質 (縦の列)の ROC 曲線(一番上のグラフ)とコスト関数(一番下のグラフ)  
色付きの線 = 個々のバリデーション、黒い線 = 平均

CHEMICAL\_NAME: Valproic Acid    CHEMICAL\_ID: 99-66-1    Mol Weight: 144.21

Structure



READ ACROSS MODEL

ENDPOINT_NAME	ENDPOINT_PREDICTION	ENDPOINT_APPDOM	Structure	SIMILARITY_COEFF
MRP4 Inhibitor (RA)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		0.64
PPARAlpha Binder (RA)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		1.00
PI3K Binder (RA)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		1.00

MAPPING TO DEREK NEXUS

ENDPOINT_NAME	ENDPOINT_PREDICTION	BIOACTIVATION	ALERT_ID	ALERT_NAME
1 Glutathione (GSH) depletion (M)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	546	Short chain fatty acid
2 Protein reactive electrophile (M)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	546	Short chain fatty acid
3 Acetyl CoA depletion	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	546	Short chain fatty acid
4 Carnitine depletion	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	546	Short chain fatty acid
5 P-Oxidation competitive substrate	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	546	Short chain fatty acid
6 Mitochondrial dysfunction	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	RapidPrototype 105	Short chain fatty acid

DESCRIPTION

This alert describes the mitochondrial dysfunction caused by short chain fatty acids. This is a rapid prototype alert generated using a proprietary data set of 362 compounds and two published data sets of 105 (Mehta et al) (data set A) and 283 compounds (Zhang et al) (data set B) respectively. Compounds were classified on the basis of their uncoupling/inhibitory activity on oxidative phosphorylation (proprietary data) and their effects on mitochondria in the published literature (published data sets A and B). 1) Proprietary data set: 6 compounds activate this rapid prototype alert of which 1 is reported positive 2) Published data set A: 6 compounds activate this rapid prototype alert of which 6 are reported positive 3) Published data set B: 105 compounds activate this rapid prototype alert of which 8 are reported positive

**リードアクロス key event モデルの一覧**

KEs (ENDPOINT\_NAME)  
Automatic prediction of the profiler (ENDPOINT\_PREDICTION)  
Applicability domain definition (ENDPOINT\_APPDOM)  
Supporting example (Structure)  
Similarity coefficient of the supporting example (SIMILARITY\_COEFF)

**Description of the alert**

**List of the alerts fired including:**

- KEs (ENDPOINT\_NAME)
- Automatic prediction of the profiler (ENDPOINT\_PREDICTION)
- WhichCyp prediction if appropriate (BIOACTIVATION)
- ID of the alert in DX (ALERT\_ID)
- Name of the alert (ALERT\_NAME)

図 9 フルオキシセチンのプロファイルの表示例

**平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書**

研究課題名：化学物質のヒト健康リスク評価における(定量的)構造活性相関および  
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究(H27-化学-指定-005)

**分担研究課題：反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの開発**

研究分担者 山田 隆志 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長

**研究要旨**

カテゴリーアプローチは、反復投与毒性を予測する手法のひとつとして認識されている。OECD で 2015 年より開始された IATA Case Studies Project は、行政的利用に適したグルーピング手法の評価事例をメンバー国で共有し、IATA の国際的なガイダンスを作成することを目指している。そこで、我々は、アリルエステルの肝毒性 (Yamada et al., 2013) をもとに、IATA ケーススタディの文書を作成し、メンバー国の専門家によるレビューを受けた。このケーススタディは、化審法のスクリーニング評価に適用することを想定して作成された。代謝および AOP に基づいたリードアクロスの仮説の構築、リードアクロスの根拠がよく正当化されていることが評価された一方で、同時にレビューされた他の 3 つのケーススタディを合わせて得られた教訓として、構造の類似性と比べて構造の違いに関する議論が不足していること、各ケーススタディは異なる不確実性が含まれているもののそれらを記述するための国際的な指針がないことが挙げられ、国際的な IATA ガイダンスを作成するうえで重要な領域と考えられた。

**A. 研究目的**

カテゴリーアプローチは、エンドポイントの試験データがない評価対象物質を試験済みの類似物質とともにグループ化し、そのデータギャップを類似物質のデータを用いて補完する方法である。反復投与毒性のような複雑な毒性エンドポイントを予測する手法のひとつとして期待されている。しかし、反復投与毒性に対し本手法は、行政的受け入れは十分に進んでいない。検証の不足、成功事例の不足、国際的なガイドラインがないこと、本手法を理解する評価者が不足していることが理由として挙げられる。

このような状況で、OECD は 2015 年より IATA Case Studies Project を立ち上げた。国際的に認められる規制利用に適した IATA による予測の実例を提示し、その経験をメンバー国で共有し、国際的なガイダンスを作成することを目指している。そこで本研究では、カテゴリーアプローチによる反復投与毒性の予測事例を本プロジェクトへ提案し、専門家レビューを受けることにより、本手法開発促進のため国際貢献を果たすと共に、化審法スクリーニング評価へ本手法を適用するときの課題を整理することを目的とする。

## B. 研究方法

本研究に先立って、カテゴリーアプローチによる反復投与毒性の評価事例を継続的に提案しており、本研究ではそのうちのひとつ(アリルエステルの肝毒性; Yamada et al., 2013) をもとにして、以下の OECD の IATA テンプレートに従って、IATA ケーススタディの文書を作成し、メンバー国の専門家によるレビューを受けた。

### B-1 OECD IATA テンプレートの構成：

テンプレートは以下の章から構成される。

- ・ 目的
- ・ カテゴリーアプローチの仮説
- ・ カテゴリーメンバー
- ・ データギャップ補完の正当化
- ・ データギャップ補完の戦略と結論
- ・ 引用文献
- ・ Annex

[目的] 3つの項目から構成される。“IATA を用いる目的”では、評価の目的を特定する(ハザードの同定、ハザードのキャラクター化、リスク評価、スクリーニングなど)。規制当局の場合、行政的必要性を述べる。“評価対象物質/カテゴリーの定義”では、カテゴリーアプローチの場合、カテゴリーメンバーの共通の特徴、カテゴリー領域、許容される構造的差異を説明する。“エンドポイント”では、カテゴリーアプローチを適用するエンドポイントを特定する。

[カテゴリーアプローチの仮説] なぜそのカテゴリーが構築できるか、なぜそのカテゴリー内ではリードアクロスを適用できるかを説明する。以下の要素によって論じられる。化学物質の同定と組成、物理化学的性状及びその他分子記述子、キネティクス：吸収・分布・代謝・排泄、Mode of Action (MOA)/AOP、化学/生物学的相互作用、代替

法で検出される応答、生物種、ルートから得られる情報、環境中での運命、想定される暴露の経路と期間、など。

[カテゴリーメンバー] 2つの項目から構成される。“カテゴリーメンバーの同定”では、カテゴリーメンバーを同定した時に用いた選抜のクライテリアを明示する。そしてその根拠を明示する。その際、選抜のバイアスにも考慮すると共に、カテゴリーメンバーを同定する方法(インベントリーやツール)を表記する。“カテゴリーメンバーのリスト”では、カテゴリーメンバーの CAS 番号、名称、組成、化学構造を提示する。

[データギャップ補完の正当化] 3つの項目から構成される。“データ収集”では、ターゲット物質とカテゴリーメンバーのデータ収集に使われた方法を明記する。QSAR の計算結果を用いる時には、ツールの名称、バージョン、モデルの所有者、QMRF インベントリーのレファレンス番号を掲載する。

“データマトリックス”では、データのマトリックスを掲載するとともに、詳細なデータは Annex に掲載する。“正当化”では、データマトリックスに基づき、これらのデータが、仮説をどのようにサポートするかを述べる。データマトリックス中の物質のエンドポイントの実測データにおける類似性や傾向を同定する。そして、どの要素が毒性/エンドポイントを駆動するのかを特定する。カテゴリーアプローチでは、信頼性のある予測が可能な範囲について述べるとともに、メカニズムの情報や、コンピュータ手法によるプロファイリング、in vitro 試験によるスクリーニングなどについても考慮する。カテゴリーの領域を明示するとともに、カテゴリーに入らない物質を同定する。QSAR や代替法等それぞれの計測手法の適



用範囲についても論じる。

[データギャップ補完の戦略と結論] “結論”では、データギャップ補完の戦略とその結論を述べる。カテゴリーアプローチの場合には、結論とデータギャップ補完により得られた予測値を提示する。“不確実性”では、結論の不確実性を論じる。カテゴリーメンバーの類似性の理論的根拠と、ソース物質からリードアクロスするために使用されるデータに関連する不確実性と信頼性および仮定に関連する不確実性が含まれる。

## B-2 専門家レビュー：

査読者は、ケーススタディの査読時に、以下の質問に回答することが求められた。

- ・ ケーススタディの目的は明瞭か？
- ・ それぞれのセクションの説明は妥当性があるか(仮説、類似物質の選択、データギャップ補完の正当化、結論、不確実性の議論など)？
- ・ そのケーススタディには、IATAの活用のためのガイダンスの開発の恩恵を受ける特定のトピック領域があるか？
- ・ そのケーススタディの最も強い側面は何か？
- ・ そのケーススタディを強化するものは何か？
- ・ 不確実性の支配的な領域は何か？どのように低減できると考えられるか？その低減によってケーススタディの異なる結論につながる可能性があるか？

元の IATA 文書は査読者のコメントに従って適宜修正した。さらに、ケーススタディ作成者、査読者、並びに OECD 事務局による対面会議によって、ケーススタディのレビュー結果について議論が深められた。

## C. 研究結果

### C-1 本ケーススタディの概要

このケーススタディは、化審法の化学物質のリスク評価におけるハザード同定に適用するために作成された。肝毒性物質が、アリルエステルの共通代謝産物であるアクロレインである AOP の仮説に基づいて、反復投与時の肝毒性エンドポイントについて、19 のアリルエステルから構成されるカテゴリーが形成された。カテゴリーは、直鎖アルキル鎖を有するアリルエステルおよび分岐アルキル鎖を有するアリルエステルの 2 つのサブカテゴリーに分類される。試験データを持たない 15 のカテゴリーメンバーの NOAEL 値を、リードアクロスによって予測した(図 1 参照)。

### C-2 本ケーススタディのレビューの結果

OECD メンバー国の専門家によって、本ケーススタディの最も強い側面は次のように特定された。

- ・ リードアクロスの仮説の要素は、代謝および MOA/AOP に基づいてよく記述されており、代謝の結果をはっきりと理解している。
- ・ リードアクロスの根拠はよく正当化されている。調査されたエンドポイントに関して反復投与後にカテゴリーのメンバーが同様の効果を示すと結論づけるために、異なるレベルで確かな証拠および全体的なデータがある。
- ・ 定量的な代謝加水分解経路情報を有する非常に類似した構造群であるサブカテゴリー 1 は高い信頼性がある。これらのアリルエステルの肝毒性は、アリアルアルコールへの加水分解の速度とよく相関する。

ケーススタディを改訂するために議論された主なポイントとそれに対する対応は次のとおりである。

- ・ 大部分の査読者は、サブカテゴリーの構造境界が明確に定義されていないことを指摘した(例えば、アリルエステルのカルボン酸部分の鎖長)。線状アルキル鎖を有するアリルエステルのサブカテゴリーの境界を明確にしたが、構造的変化のため、分岐アルキル鎖を有するアリルエステルのサブカテゴリーについては明らかにできなかった。
- ・ もっとも決定的な影響があるアクロレインの肝毒性影響の実証が欠如していることが指摘された。改訂したケーススタディでこの点を明確にした。
- ・ 査読者は、トキシカント以外の代謝産物が他の毒性作用を誘発しないという仮説に関する議論は不十分であると指摘した。より多くの参考文献を引用してこの点についての議論を強化した。
- ・ 査読者は、データ収集の実施方法(例えば、どのデータベースが使用されたか、使用されたデータの選択方法など)の詳細な説明を要求した。この記述を強化した。

本ケーススタディでは以下の不確実性の領域が特定された。

- ・ アクロレイン形成の律速因子およびADMEが毒性に与える影響
- ・ いくつかのカテゴリーのメンバーの反復投与毒性試験で観察された胆管過形成のメカニズムの理解の欠如。
- ・ トキシカント以外の代謝産物が他の毒性作用を誘発しないという仮説
- ・ ヒトへの関連性

本ケーススタディは、スクリーニング評

価、優先順位付け、分類などの加盟国の規制目的のために使用することができるであろうと考えられた。本ケーススタディの結果は、(ケーススタディ2の場合と同様に、) REACH登録のための情報要件を満たさない可能性が高いため、REACHの登録目的には使用できない。しかし、近い将来、そのようなケーススタディの結果は、日本の化審法のもとで使用されうると考えられる。

本ケーススタディの修正版は対面会議で了承され、対面会議の議論の結果とともにOECDのHPより公開された(<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm#casestudies>)。

#### D. 考察

2015年度のOECD IATA Case Studies Project(第1サイクル)では、本ケーススタディを含めて計4つのケーススタディが提出され、レビューが行われた。

- ・ In Vitro Mutagenicity of 3,3'-Dimethoxybenzidine (DMOB) Based Direct Dyes、エンドポイント:変異原性(リード:カナダ、米国)
- ・ Repeat Dose Toxicity of Substituted Diphenylamines (SDPA)、エンドポイント:反復投与毒性(リード:カナダ)
- ・ Hepatotoxicity of Allyl Ester Category、エンドポイント:反復投与毒性(リード:日本)\*本研究で作成したケーススタディ
- ・ Bioaccumulation Potential of Biodegradation Products of 4,4'-Bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl、エンドポイント:生物蓄積性(リード:日本)

本研究として提案したケーススタディのレビューの経験に基づいて、IATA ガイダンス開発のために以下の領域が特定された。

- ・ AOP に基づいたリードアクロスの仮説の構築
- ・ カテゴリーの構造上の境界の説明
- ・ AOP ベースのカテゴリーを正当化するためのサポートデータの使用
- ・ 不確実性のコミュニケーションおよび/または枠組み（例えば、不確実性のレポートリング）

また、4つのケーススタディのレビューの経験を通して IATA ガイダンス開発のために以下の領域が特定された。

[リードアクロス全体のスコープと内容の記述]

レビューの経験から、ケーススタディが使用されるスコープおよびフレームワークを非常に明確に記述することが必要かつ重要であることが強調された。これは、ケーススタディによってどのような側面が対処されるか、どのレベルのレポートリングが要求され、どの程度の不確実性が受け入れられるかについて読者へ状況を提供すること。この点について、著者へのさらなる指針を作成することができた。

[MOA/AOP に基づく仮説の構築]

メカニズム情報に基づいて類似性の仮説を構築することは、すべてのケーススタディにおいて、さらなる IATA ガイダンスの開発のためのトピックとして特定された。より精緻化された仮説は、各ケーススタディにおけるカテゴリーメンバーの標的エンドポイントに関する類似性（および潜在的な差異）を強化すると考えられる。さらに、ケーススタディで特定されたヒト関連性に関する不確実性は、それぞれのメカニズム

のキーイベントに対して明らかにすることができる。ケーススタディのメカニズムの根拠を強化することで、ケーススタディの使用を拡大することができる。

OECD は AOP を開発するための指針を公表しており、現在多くの AOP が開発中である。グルーピングをサポートするために AOP を適用することが期待されているが、IATA に AOP 情報を組み込む方法を引き続き示す必要がある。OECD 化学物質グルーピングガイドライン (OECD, 2014) の AOP に基づく仮説構築の記述は、限定的かつ概念的である。これらは将来、詳述される必要がある。

[アナログ/カテゴリー領域の定義]

査読者は、すべてのケーススタディが構造領域および物理化学的性質の定義に関する、より詳細な記述を有するべきであると示唆した。明確なカテゴリー境界を記述する方法は、すべてのエンドポイントで共通の問題である。

特に、ほとんどのケーススタディでは、類似物質の化学構造の類似性については議論されているが、化学構造の相違については議論が不足していることが確認された。OECD QSAR Toolbox のようないくつかの有用なツールがあり、毒性学的影響の変化を引き起こす部分構造を特定することができる。しかしながら、類似体に対する許容される構造的相違は、多くの場合、専門家の判断によって定義される。専門家の判断を適用する際に考慮すべき事項を文書化しなければならない。

ソース物質の選択は、グルーピングによるデータギャップ補完における最も重要な問題の 1 つであり、結論に直接影響を及ぼすため、構造的特徴の“類似性”に関するガ

イダンスは重要なトピックである。

[データギャップ補完の正当化]

従来の化学物質カテゴリーは、主に *in vivo* 試験データに基づいて（例えば CoCAM において）開発されてきた。IATA の概念をグルーピング手法に組み込む最も重要な目的の 1 つは、QSAR データやオミックスデータなど利用可能なすべてのデータを使用して化学物質のグループを強化または拡張することであるため、さまざまな種類の化学物質のグループを正当化するためのガイダンスの開発が必要である。4 つのケーススタディのレビュー結果から、以下の問題がこの分野で特定された。

- ・異なる情報が物質に利用可能である場合、標的エンドポイントの観察される影響の類似性/傾向を記述する方法。より複雑な反復投与毒性エンドポイントを検討する際のケーススタディ 2 と 3 において特に強調された。

- ・新しいタイプの *in vitro* データの組み込む方法：この分野では、ToxCast や SEURAT-1 など広範な取り組みが進行中である。このレビューサイクルでは、ハイスループットスクリーニング（HTS）データが 1 つの化学物質に対してのみ使用されたが（ケーススタディ 2）、査読者および著者は、さらなる *in vitro* データが利用可能になると、将来は複雑なエンドポイントのカテゴリーを強化するために用いることができると期待している。HTS データの統合を調査するためには、さらなるケーススタディが必要である。

- ・QSAR 予測結果の報告方法：モデル化された化学物質が QSAR モデルの適用可能範囲内にあるかどうかを文書化することの重要性が強調された。これを行う 1 つの方法

は、QSAR モデルのトレーニングセットで使用されるフラグメントのカバレッジを表示することである。QSAR 予測の不一致は、そうすることで説明することができる（ケーススタディ 4）。予測された物質が、使用されたモデルの適用可能範囲内/外にあるかどうかを評価するためのツールがある。査読者によって特定された不確実性の最も頻繁な原因の 1 つは、QSAR 結果の信頼性であった。

- ・異なる方法またはモデルから得られたデータを統合する方法（例えば、様々な QSAR の結論、実験データを統合する場合）。

OECD 化学物質グルーピングガイダンス（OECD 2014）におけるデータギャップ補完に関する一般的なガイダンスは、将来のケーススタディに基づいて IATA コンセプトを組み込むことによって詳述される必要がある。

[不確実性分析とレポート]

科学的に理想的な IATA の例を提供することを目的としたものではなく、目的に合ったアプローチで科学的に健全な IATA の規制上の事例を実証することが、ケーススタディの意図するところである。したがって、各ケーススタディには、ケーススタディに使用されるデータまたはリソースが各規制上の状況によって異なるため、異なる不確実性が含まれている。OECD 化学物質グルーピングガイダンス（OECD 2014）では不確実性の文書化に関するガイダンスはないが、ケーススタディに使用されたテンプレートに不確実性分析のセクションを用意した。

以下のタイプの主要な不確実性は、著者または査読者によって同定された。

- ◆ リードアクロスに関する仮説の信頼

度：

- メカニズムベースの知識
- 構造的特徴と代謝並びに観察された毒性影響の相関
- 仮説を支持するために利用可能なデータの量
- 特に QSAR 予測をサポートするためのデータの信頼性
- 仮説を支持するための観察された影響の類似度

◆ 仮説とヒト関連性との関係

査読による修正前の元のケーススタディで特定された不確実性のいくつかは、サブカテゴリーの組み込み、より詳細な議論の提供、QSAR 予測のサポートなど、さまざまな方法で低減された。これは、ケーススタディを改善するのに不確実性を考慮することが有用であることを示しているが、他方で不確実性は残っており、この場合、不確実性の分析は、査読者が不確実性の影響とケーススタディの使用目的に関する不確実性の許容度を考慮するのに役立った。不確実性の記述とコミュニケーションの重要性は、IATA のさらなる経験を得るための重要な分野として特定された (OECD, 2016)。

E. 結論

グルーピングに関する 4 つの IATA ケーススタディは、実際の使用に基づいており、規制当局におけるグルーピング方法の利用方法の具体的な例が示されていた。この経験により、各規制の状況で使用される特定の目的のための実用的なアプローチと完璧なリードアクロスの間の相違を考慮することが重要であることが明らかとなった。ケーススタディを提出した国の規制の枠組みと目的の背景を理解することは、査読者が

グルーピング手法を実際に使用する際の問題を整理するのに役立った。異なる目的と標的エンドポイントのケーススタディを比較することにより、グルーピング手法の共通の課題を特定するのに有用であった。

本研究において最初に提出したケーススタディの文書については、メンバー国の専門家より、カテゴリーメンバーとその代謝、毒性、作用機序などのデータの収集の方法の詳述、リードアクロスをを行うときの類似物質の選択の適切性、構造的な差異が別の毒性を引き起こす可能性についての説明、カテゴリーの構造領域の明確化 (特にサブカテゴリー2)、リードアクロスに用いる試験データの信頼性を評価すること、ヒト関連性について情報を追加し補強すること、不確実性の半定量化などが求められ、修正版文書でこれらを反映させ、対面会議で了承を得た。いずれもカテゴリーアプローチの透明性、再現性、信頼性を確保するために重要であり、今後、本手法を別のカテゴリーに適用するときにも有用である。

これらの 4 つのケーススタディを通じて共有された経験は、OECD 加盟国におけるカテゴリーアプローチを含む IATA の使用を拡大するための方法として有望であり、ケーススタディを通じた国際的な共同作業することの価値を示している。しかし、一般的な IATA ガイダンスを作成するためには、より多くのケーススタディが必要であることも認識された。

次年度以降のケーススタディラウンドでは、グルーピングとリードアクロスだけでなく、多様な IATA のアプローチの使用を検討するケーススタディにも取り組むことが想定されている。

## 参考文献

Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamada, J., Kamata, E., Ono, A., Hirose, A., Yamazoe, Y., Mekenyan, O. and Hayashi, M. A category approach to predicting the repeated-dose hepato-toxicity of allyl esters, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 65, 189-195, 2013.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Guidance on Grouping of Chemicals, second edition Series on Testing and Assessment No. 194, 2014.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Report on considerations from case studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA), First review cycle (2015); Case studies on grouping methods as a part of IATA, Series on Testing and Assessment No. 250, 2016.

## F. 研究発表

### 論文発表

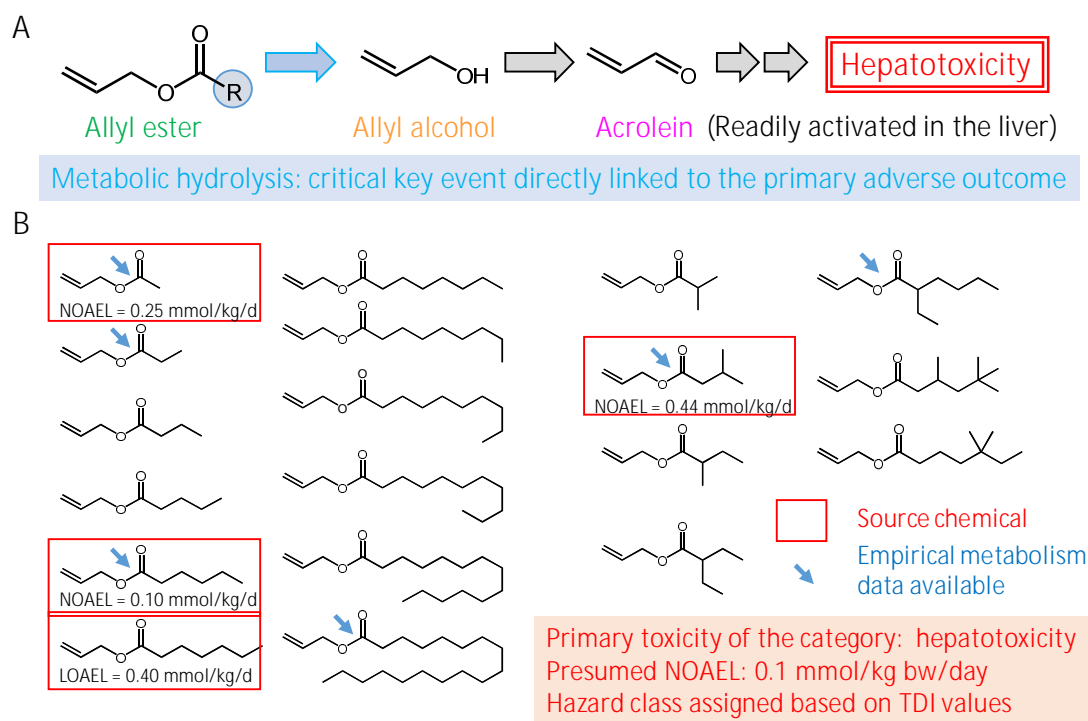
1. 大内淳子、山田隆志、化粧品安全性評価のためのコンピュータ予測モデルの活用 *Cosmetic Stage*, 10(4), 1-8, 2016.
2. Takahashi, M., Matsumoto, M., Yamada, T., Ono, A., and Hirose, A. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances, *Bull. Natl Inst. Health Sci.*, 134, 79-83, 2016.

3. Yamada, T and Hirose, A. Case study on the use of an integrated approach to testing and assessment for hepato-toxicity of allyl esters, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Series on Testing & Assessment No. 253. 1-33, 2016.

### 学会発表

1. Yamada, T., Honma, M. and Hayahshi, M. Recent advances in Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) and read-across for chemical safety assessment, ICCA-LRI and NIHS Workshop, June 15-16, 2016, Awaji, Japan.
2. 山添康、山田隆志、三森国敏、メトキシ酢酸とその関連物質の胎児毒性と精巢毒性 メチル基転移とヒストン修飾の役割、第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月29日～7月1日、名古屋。
3. 五十嵐智女、小林克己、川村智子、松本真理子、長瀬孝彦、勝亦芳裕、小野敦、山田隆志、広瀬明彦、1,4-ジクロロブタンの反復投与毒性及び生殖発生毒性のスクリーニング評価、第43回日本毒性学会学術年会、2016年6月29日～7月1日、名古屋。
4. Cronin, M.T., Yang, C., Arvidson, K., Boyer, I., Fioravanzo, E., Heldreth, B., Kim, J.H., Madden, J.C., Rathman, J., Schwab, C., Yamada, T. and Worth, A.P. Increasing the availability of high quality regulatory and toxicity

- data through the COSMOS DB DataShare Point, 52<sup>nd</sup> European Congress of the European Societies of Toxicology, September 4-7, 2016, Seville, Spain.
5. Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Sakuratani, Y., Yamada, J., Kamata, E., Ono, A., Yamazoe, Y., Mekenyan, O., Hayashi, A., and Hirose, A. Development of a case study on the read-across assessment of hepatotoxicity of allyl esters for OECD IATA case study project in 2015, 52<sup>nd</sup> European Congress of the European Societies of Toxicology, September 2016, Seville, Spain.
  6. Yamada, T., Hayashi, M., and Hirose, A. Development of read-across for chemical safety assessment, Asian Congress 2016 on Alternatives and Animal Use in the Life Science, November 14, 2016, Karatsu, Japan.
  7. 山田隆志、福島隆、林真、我が国における化学物質の in silico 評価の現状と活用推進のための方策日本動物実験代替法学会第 29 回大会、2016 年 11 月 15 日、福岡。
  8. 山田隆志、OECD IATA ケーススタディプロジェクトの概要、日本化学工業協会、化学品管理のための QSAR/in silico セミナー、2017 年 1 月 30 日、東京。
  9. Igarashi, T., Kobayashi, K., Serizawa, H., Kawamura, T., Matsumoto, M., Yamada, T., Hirose, A. Initial risk assessment of 4-benzylphenol: In vitro genotoxicity tests and a 28-day repeated-dose toxicity study, 56<sup>th</sup> Annual meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore, Maryland, USA.
  10. Hirose, A., Takahashi, M., Matsumoto, M., Kawamura, T., Yamada, T., and Ishige-Watabe, A. Toxicity Evaluation of Chemical Impurities as potential leachables from apparatuses used for parenteral products, 56<sup>th</sup> Annual meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore, Maryland, USA.
  11. Rathman, J.F., Benfenati, E., Honma, M., Kitazawa, A. Raitano, G., Yamada, T., and Yang, C. Models Combined by Decision Theory to Enhance Outcomes in DGM/NIHS Ames/QSAR International Collaborative Study, 56<sup>th</sup> Annual meeting of Society of Toxicology, March 12-16, 2017, Baltimore, Maryland, USA.
  12. Yamada, T., Our recent experiences for development of read-across for chemical safety assessment, Regulatory acceptance of read-across, A Society of Toxicology Satellite Meeting, March 17, 2017, Baltimore, Maryland, USA.
- G. 知的財産権の出願・登録状況**  
特になし



**図 1 日本から提出したカテゴリーアプローチのケーススタディの概要 - アリルエステルカテゴリーの肝毒性 -** A. カテゴリーの仮説：生体中で加水分解される（と予測される）飽和脂肪酸とアリルアルコールのモノエステルは、アリルアルコールが生成したのち、肝臓においてアリルアルコールが反応性の高いアクロレインに速やかに代謝されて肝毒性を示す。本カテゴリーは肝臓が主要な標的臓器であり、代謝による加水分解反応は毒性発現と直接的にリンクするキーイベントである。B. カテゴリーメンバー：化審法インベントリーには 19 のカテゴリーメンバーがあり、そのうち試験データがあるのは赤枠で示した 4 物質（source chemical）であった。残りの 15 物質について、直鎖状アルキル鎖（左側）と分岐状アルキル鎖（右側）の 2 つのサブカテゴリーにわけ、安全サイドに立ちワーストケースアナログ（allyl hexanoate）をもとに肝毒性を予測した。さらにサブカテゴリーごとに不確実性分析を行った。推定 NOAEL 値から TDI 値を算出し、化審法の有害性クラスを付与した。





## 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
Manganelli S, Benfenati E, Manganaro A, Kulkarni S, Balistreri G, Barton-Maclaren TS, Honma M	New quantitative structure-activity relationship models improve predictability of Ames mutagenicity for aromatic azo compounds.	Toxicol Sci.	153	316-326	2016
Petkov PI, Schultz TW, Donner EM, Honma M, Morita T, Hamada S, Wakata A, Mishima M, Maniwa J, Todorov M, Kaloyanova E, Kotov S, Mekenyan OG	Integrated approach to testing and assessment for predicting rodent genotoxic carcinogenicity.	Journal of Applied Toxicology	36	1536-1550	2016
Benfenati E, Belli M, Borges T, Casimiro E, Cester J, Fernandez A, Gini G, Honma M, Kinzl M, Knauf R, Manganaro A, Mombelli E, Petoumenou MI, Paparella M, Paris P, Raitano G	Results of a round-robin exercise on read-across.	SAR and QSAR in Environmental Research	27	371-384	2016
Morita T, Hamada S, Masumura K, Wakata A, Maniwa J, Takasawa H, Yasunaga K, Hashizume T, Honma M	Evaluation of the sensitivity and specificity of in vivo erythrocytemicronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens.	Mutat. Res.	802	1-29	2016

Ahlberg E, Amberg A, Beilke LD, Bower D, Cross KP, Custer L, Ford KA, Van Gompel J, Harvey J, Honma M, Jolly R, Joossens E, Kemper RA, Kenyon M, Kruhlak N, Kuhnke L, Leavitt P, Neilsen R, Neilan C, Quigley DP, Shuey D, Spirkl HP, Stavitskaya L, Teasdale A, White A, Wichard J, Zwickl C, Myatt GJ	Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: A case study using aromatic amine mutagenicity.	Regul Toxicol Pharmacol.	77	1-12	2016
Amberg A, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cross KP, Custer L, Dobo K, Dowdy E, Ford KA, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Nicolette J, Plaper A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Spirkl HP, Stavitskaya L, Teasdale A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Myatt GJ	Principles and procedures for implementation of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses.	Regul Toxicol Pharmacol.	77	13-24	2016
大内 淳子, 山田 隆志	化粧品安全性評価のためのコンピューター予測モデルの活用.	Cosmetic Stage	10	1-8	2016
Takahashi M, Matsumoto M, Yamada T, Ono A, and Hirose A	Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances	<i>Bull. Natl Inst. Health Sci.</i>	134	79-83	2016