

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 9 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成 3 0 (2 0 1 8) 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 4
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 5
森田 健	

QSAR を用いた新たな変異原性予測ストラテジーの開発に関する研究_____	4 6
杉山圭一	

構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究_____	5 0
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_____	6 0
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_____	7 8
山田 隆志	

III.研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）_____	9 4
-------------------------------	-----

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の多くは安全性評価未実施のまま流通している。さらに年間生産量が 10 トン以下の低生産、1 トン以下の少量新規化学物質に至ってはヒト健康影響評価が求められていない。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 QSAR の改良に関しては、新規 4,409 化合物を用いて、19 の QSAR ツールについて予測精度の評価を行った（Phase III）。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平均 76%であった。しかしながら、これまでより全体の予測率は低下した。その理由として Specificity の低下が考えられた。Phase III の化合物の 5%は分子量 800 以上のエームス陰性化合物で有り、そのほとんどがエームス陰性であるが、これらを正しく陰性と予測できなかったことが原因と考えられた。

In vitro 染色体異常（CA）予測モデルの現状を把握し、*in vivo* を含めた染色体損傷性を予測する QSAR の開発に資するために、拡張版 CGX データベースを用いて 3 つの *in silico* モデルの予測性を比較検証した。*In vitro* CA 結果に対する各モデルの感受性/特異性は、Derek で 56.0%/86.9%、AWorks で 67.7%/61.5%、MCASE で 91.0%/64.9%であった。MCASE の感受性は、他のモデルよりも高かった。

インシリコを用いた新たな変異原性予測ストラテジーの開発に関しては、作用機序に関する QSAR、専門家知識とリードアクロス解析の組み合わせることにより重要性に基づく十分な評価が可能で有り、最終的な判断予測に関してユーザーが、妥当性が担保された判断を下すことを支援できることが示された。

反復投与毒性については、化学構造の類似する化学物質で得られている無毒性量からの評価対象物質の無毒性量評価の可能性について検討を行うため、データベースに含まれる毒性情報既知の化学物質との構造類似度と無毒性量の近似についての解析、化学構造記述子や部分構造をもとに無毒性量を判定する統計的予測評価モデルにおけるモデル構築に用いた化学物質に含まれる評価対象物質との構造類似物質の数と評価精度との関係について

検証を行った。

肝毒性に関しては、前年度までに改良してきた肝毒性に関連するプロファイラーを基にして作成した KNIME ワークフローに、ヒトの薬物性肝障害予測システムの確立を目標としたコンソーシアム (MIP-DILI) プロジェクトの成果 (Lhasa が収集) を基に構築した肝毒性エンドポイントに関連する MIE/KE のモデル化アプローチを統合した KNIME ワークフローの作成を行った。

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。今回は、ベンゾトリアゾールの肝毒性を対象に 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

杉山 圭一

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部
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

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。本年度は最後の Phase III トライアルを実施した。4,409 化合物リストを世界 6 カ国、11 の QSAR ベンダーに提供し、19 の QSAR ツールが最後のチャレンジを行った（本間）。

In vitro 染色体異常（CA）予測モデルの現状を把握しその精度を向上させ、さらに小核（MN）を含む *in vivo* 染色体損傷性を高精度に予測する QSAR の開発に資するために、3 種の *in silico* モデルの *in vitro* CA 予測性を検証比較した。（森田）

遺伝毒性評価にインシリコ手法を導入するために *in vitro* から *in vivo* までの遺伝毒性試験結果を総合的に評価するフロースキームをブルガス大学との共同研究により開発する（杉山）。

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。

本年度は、化学構造の類似する化学物質で得られている無毒性量からの評価対象物質の無毒性量評価の可能性について検討を行うため、データベースに含まれる毒性情報既知の化学物質との構造類似度と無毒性量の近似についての網羅的解析による検討を行った。（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關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。本年度は、前年度までに改良してきたプロファイラーを基にした KNIME ワークフローの作成と、その結果を表示できる可視化ツールの構築を試みた。また、今年度は、ヒトの薬物性肝障害予測システムの確立を目標としたコンソーシアム（MIP-DILI）プロジェクトの成果を MIE および KE のプロファイラーに追加統合して、KNIME ワークフローの作成を行った（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。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や将来のリスク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 化学物質のエームス試験結果を精査し、QSAR

の開発に有用である 12,140 化学物質をデータベース化した。この内、Phase I、II で利用した使用した 7,731 物質を除く、4,409 物質のリストを QSAR ベンダー提供し、にエームス試験結果予測のコンペティションを実施した。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 (236 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 (393 物質)
- Class C: エームス試験における陰性判定物質 (3,780 物質)

Phase II 国際共同研究は世界 6 カ国、11 の QSAR ベンダーに提供し、19 の QSAR ツールが最後のチャレンジを行った。

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)

構築した拡張版 CGX データベースから抽出した 440 物質に対し、Derek、AWorks および MCase の各モデルを適用し、*in vitro* CA 結果に対する予測性を検証比較した。また、一部の *in silico* モデル (MCase MNT-mouse) については、337 物質に対し、*in vivo* MN 結果に対する予測性を検証した。

B.3. QSAR を用いた新たな変異原性予測ストラテジーの開発に関する研究 (杉山)

複数の QSAR 予測結果を総合的に判定するためのストラテジーの開発を試みた。知識ベース型 QSAR と統計ベース型 QSAR を組み合わせ、その結果と、メカニズム型 QSAR の結果を Decision Tree 型で最終評

価する手法について検討した。

B.4. 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)

化審法既存点検により 28 日間試験が実施済みの化学物質を対象として tanimoto 係数による構造類似度を総当たり計算し、反復投与毒性試験における無毒性量の近辺の関係について解析により、構造類似物質からの反復投与毒性試験における無毒性量の予測性の検討を行った。また、昨年度構築した構造記述子を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデルにおける判別結果の信頼性についてモデル構築に用いたデータセットに含まれる評価対象物質の構造類似物質の有無との関係について解析を行なった。

B.5. 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究 (広瀬)

MIP-DILI(ヒトの薬物性肝障害予測システムを目標としたコンソーシアム)プロジェクトと毒性試験データベースのデータを、1 つの SQLite データベースに統合した。このデータベースには、標準化した 18053 個の化学構造式と 67 のデータセットが集積され、38 種類のエンドポイントをカバーしている。本データ群は、リードアクロモデルおよび機械学習モデルのエントリポイントとした。また可視化ツールとしては、プロファイラーで得られた結果をユーザーに分かりやすく示すビューを Instant JChem を用いて設計した。

B.6. 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)

OECD IATA Case Studies Project にカテゴリーアプローチのケーススタディを提

出した。ケーススタディの対象としてベンゾトリアゾールを選択した。化審法インベントリーから構造検索し、次いで有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS) と追加の情報収集により、それらの代謝データ、毒性メカニズム、反復投与毒性試験データ、さらに一部の物質についてトキシコゲノムのデータを活用した。各カテゴリー物質についてデータの有無をマトリックスに整理し、肝毒性エンドポイントのデータギャップを類似物質の毒性データを用いてリードアクロスにより補完した。

C. 結果

C.1. エームス変異原性の予測精度の向上 (本間)

2017年6月までに12のQSARベンダーに3,780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。2017年10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。

19のモデルの内、Phase II まで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モデルの改善は困難である。一方、統計ベースモデルは簡単に組み入れることができる。特に高い A-sensitivity を示したのはブルガス大学に TIMES (85.7%) であったが、これは予測のドメイン構造が限られ、低い Applicability を持つためである (9.7%)。他に、高い A-sensitivity を示したのものとしてラーサ社の Sarah (83.1%) が挙げられる。Sarah は sensitivity も最も高かった (70.4%)。一方、Specificity に関しては MCASE 社の CASE Ultra-statistical が 92.8% と最も高く、FUJITU の ADMEWORKS (87.8%)、STSR の AZAMES (87.7%) が後に続いた。全体の一致率 (concordance) は Ultra-statistical (87.3%)、AZAMES (83.9%) が高かった。

Phase I, II, III での A-sensitivity、Sensitivity、Specificity、Applicability をまとめた。Phase I での Concordance は平均 75%、Phase II では 80%、Phase III では 76% であり、Phase III での全体的な予測性の改善は認められなかった。一方、Sensitivity に注目すると、Phase II から Phase III でわずかに改善が認められた (0.1%)。

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)

In vitro CA 結果に対する感受性/特異性は、Derek で 56.0%/86.9%、AWorks で 67.7%/61.5%、MCASE で 91.0%/64.9% であった。正確性/適用性は、Derek で 68.6%/89.1%、AWorks で 65.2%/99.3%、

MCase で 80.5%/97.7%であった。また、化学物質クラスに対する各 *in silico* モデルの予測結果は、わずかな相違は存在するもののモデル間でほぼ一致した。*In vivo* MN 結果に対する MCase の感受性/特異性は 91.1%/57.0% で、正確性/適用性は 72.4%/81.6%であった。

C.3. QSAR を用いた新たな変異原性予測ストラテジーの開発に関する研究 (杉山)

OASIS TIMES エームモデルと、OECD ツールボックス内の類似物質に基づくリードアクロス解析とが一致した予測を示す場合には、最終的な決定を下すために専門家の意見は必ずしも必要ではないと推測された。TIMES エームモデルとリードアクロスとの予測が一致しない場合には、最終的な効果の査定のために専門家の意見が不可欠となるが、陽性判断には作用機序による正当化が必要と考えられた。

C.4. 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)

構造類似度がおおよそ 70%を超える物質では、構造類似度の増加にともなう無毒性量の近似が認められた。一方、構造類似度 70%以上であっても個別の物質間の NOEL 比は対数軸で 1 以上の分布(10 倍以上)を示すことから、次に構造類似物質の無毒性量からの予測性について検討を行った結果、3 物質以上の類似物質について情報が得られていれば、構造類似物質からの無毒性量の予測評価の可能性が示された。構造記述子と部分構造を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデルの判別精度にモデル構築に用いたデータセットにおける構造類似物質数との関係は認められなかった。

C.5. 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究 (広瀬)

KNIME ワークフローは 2 種類のアプローチを利用した。1 つ目のアプローチでは、Derek Nexus のアラートを肝毒性に関連する MIE および KE でマッピングして用いている。2 つ目のアプローチは、リードアクロスであり、肝毒性に関する MIE および KE の公開データを収集し、種々の MIE、KE に関して陽性データを有する各化合物と毒性試験データセットから得たクエリー化合物を、Lhasa 社で開発したフラグメントに基づく類似度を算定するソフトウェアを用いて比較した。さらに、MIP-DILI プロジェクトの成果を統合した MIE および KE のプロファイラーに対して、Random Forest アルゴリズムと 2D RDKit 記述子を用いた機械学習モデルを構築した。

C.6. 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)

反復投与毒性プロファイルを詳細に比較し、ベンゾトリアゾールカテゴリーの主要な標的臓器として肝臓を同定した。同カテゴリー物質は核内受容体との相互作用や酸化ストレス誘導において違いが認められた。そこで遺伝子発現プロファイルと肝毒性強度に基づいてサブカテゴリーを構築して安全サイドに立って類似物質を選択し、それらの試験データから未試験のカテゴリー物質の肝毒性を推測できることが示された。本ケーススタディの修正版は対面会議で了承され、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#case>)

studies)。

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 4,409 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、74~87%の一致率 (Correspondence) を示した。しかしながら、しかしながら、Phase I から III までの全体の一致率を見てみると、Phase I での一致率は平均 75%、Phase II での一致率は平均 80%であったが、Phase III では 76%であり、Phase II からの予測率は低下した。その理由として Specificity の低下が考えられた。Phase III の化合物の 5%分子量 800 以上のエームス陰性化合物で有り、その 95%がエームス陰性であるが、これらを正しく陰性と予測できなかったことが原因と考えられる。事実、感度に関しては Phase II よりわずかな改善が認められた。3回のトライアルにより、本共同研究は成功裡に終了した。さらに、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。また、トレーニングデータのいくつかには間違っ、陰性、もしくは陽性とラベルされているものが確認された。これらデータは QSAR モ

デルに開発に大きな障害となる。正確な試験結果データのみからなるベンチマークデータセットを整備し、トレーニングデータとすることが精度の高い QSAR モデルの開発に重要である。

ほとんど全ての QSAR ツールの全てが陰性と間違っ判定した Class A 化学物質が 6 化合物存在した。これは偽陰性物質で有り、この割合が多いことに規制当局が QSAR の利用に対して最も懸念する部分である。Phase III では、これは Class A 物質の 2.5%に相当する。この割合は Phase I で 10%、Phase II では 3.6%に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、偽陰性は減少していることが示された。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。

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)

各モデル間の感受性/特異性に関する比較では、Derek が低/高、AWorks が中/中、MCase が高/中であった。これらの違いは、知識ベースと統計ベースによるアプローチの違いや、それらの構築に用いたデータベースの違いに起因するものと思われる。*In vitro* CA 結果自体が、用いる細胞や試験プロトコールによって異なっているため、どの知見を利用すべきか統一の評価を導き出すことが困難状況にある。さらに *in vivo* 知見を含め、生体にとって意味のある陽性を正しく陽性と予測するには、代謝の影響を考慮する必要があると考えられた。

D.3. QSAR を用いた新たな変異原性予測ストラテジーの開発に関する研究 (杉山)

作用機序に関する QSAR、専門家知識とリードアクロス解析の組み合わせは、重要性に基づく十分な評価を提供し、最終的な予測に関してユーザーが妥当性ある判断を下すことを支援できることが示唆された。

D.4. 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)

構造類似度がおよそ 70%以上の 3 物質以上について毒性情報が得られていれば、ある程度の評価は可能であることと考察された。ただし、3 物質以上の構造類似物質について情報が得られている場合であっても、情報が得られている物質間で無毒性量や毒性所見が大きく異なる場合には注意が必要であると考察される。一方、構造類似物質について情報が得られていないもしくは限られている場合には、記述子を用いた予測モデルによる判定結果のほうが信頼出来ると考察された。いずれも手法も適用範囲外となる化学物質については、従来どおり動物試験による評価が行われるべきであるが、反復投与毒性評価における構造活性相関手法の適用拡大のためには、データベースの拡充が重要である。本研究結果をもとに、評価対象の化学物質について化学構造から適用可能な評価手法を判定し、評価を行うことで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。

D.5. 反復投与毒性を指標にした構造活性相関モデルに関する研究 (広瀬)

今回 MIP-DILI の結果を統合した肝毒性プロファイラーはヒト細胞株 / タンパク質

を用いた *in vitro* データが用いられており、昨年度まで検証用に使用してきた毒性試験データセットに関する Cooper statistics の観点からの予測精度の解析は適さないが、これまで動物試験のデータを用いてきたものより広い化学空間をカバーできるものと考えられる。その代わりに、各化合物に関してモデル化法で得られるすべての情報をユーザーに分かりやすく表示するための可視化ツールをデザインした。各化合物について、反復投与毒性試験情報、各種アラート、リードアクロスモデル、機械学習モデルを含むすべての結果が 1 つのビューに表示され、予測対象とする化学物質の様々なプロファイルに関する情報を一覧することができ、専門家による毒性予測を手助けすることが可能なツールを作成することができたと考えられる。

D.6. 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)

本ケーススタディでは、カテゴリーの根拠説明としてはじめてトキシコゲノムのデータを活用したこと、予測の不確実性についての透明性のある記述がなされていることなどが評価された。一方、転写物の変動と *in vivo* の毒性との因果関係、肝毒性についてのみ着目した理由と根拠について、より詳細な説明が求められた。行政的にはスクリーニングレベルの評価に活用可能とのコメントが得られた。OECD IATA Case Studies Project では、統合的評価手法の国際的なガイダンスの作成を目指している。提出したケーススタディは、代謝やトキシコゲノム等新規手法のデータをどのようにカテゴリーの正当化のために用いるかについて留意すべき点を明示した。これらの経

験を国際的に共有することによって本手法の国際的な調和へ向けて貢献したものと考えられる。

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た。試験結果の予測率の向上には、新規データセットをトレーニングデータとして単純に組み入れるだけでなく、物質の特徴（分子量）や、既存のトレーニングデータを適切にレビューする必要がある。QSAR モデルのさらなる改良には、科学的且つ、信頼性の高いベンチマークデータセットの開発が重要と考えられる。

In vitro CA 予測に対する 3 つの *in silico* モデルはいずれも CA 予測に有用であると考えられたが、その予測性（特に感受性）は、初期の Ames 予測よりも低いものであった。その改善には、用いるデータの精緻化や *in vivo* における代謝への考慮が必要と考えられた。

インシリコ手法による遺伝毒性評価に関しては、作用機序に関する QSAR、専門家知識とリードアクロス解析の組み合わせは、重要性に基づく十分な評価を提供し、最終的な予測に関してユーザーが妥当性ある判断を下すことを支援できることが示唆された。

反復毒性については、類似構造の物質について毒性情報が得られていれば、化学構造から機械的に計算可能な構造類似度を指標とした無毒性量の近似評価が可能なが示された。

肝毒性に関しては、今回、開発した KNIME ワークフローと可視化ツールを用いることで、肝毒性の誘発性に関する判別

結果を単純に表示することはできないが、専門家が当該化合物の毒性予測を行うのに有用なツールを開発することができたと考えられる。

IATA Case Studies Project において我々が提案した反復投与毒性のケーススタディ並びに他のケーススタディも含めたレビューの経験と議論の共有により得られた、リードアクロスの信頼性と結果の受け入れ性の向上へ向けた教訓と課題は、化審法のスクリーニング評価や将来のリスク評価へカテゴリーアプローチ手法を適用するとき有用となると考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. Petkov, PI, Schultz TW, Honma M, Kirilov K, Kotov S, Mekenyan OG. Predicting *in vitro* genotoxicity by mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase mutation assay (MLA): Accounting for simulated metabolic activation of chemicals. *Computational Toxicology*. 4, 45-53, 2017.
Doi:10.1016/j-comtox.2017.10.002
2. Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E. Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 35,

- 239-257, 2017. doi: 10.1080/10590501.2017.1391521.
3. 本間正充、食品中に含まれる化学物質のリスクアセスメントと遺伝毒性評価、FFI ジャーナル、Vol.223 No.01、8-16、2018
 4. Horibe A, Odashima S, Hamasuna N, Morita T, Hayashi M, Weight of contribution of in vitro chromosomal aberration assay for evaluation of pesticides: Experience of risk assessment at the Food Safety Commission of Japan, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 95, 133-134, 2018.
 5. K. Saito, Y. Hasegawa-Baba, F. Sekiya, S. Hayashi, Y. Mirokuji, H. Okamura, S. Maruyama, A. Ono, M. Nakajima, M. Degawa, S. Ozawa, M. Shibusaki and T. Maitani ; Japan Flavour and Fragrance Materials Association's (JFFMA) safety assessment of food-flavouring substances uniquely used in Japan that belong to the class of aliphatic primary alcohols, aldehydes, carboxylic acids, acetals and esters containing additional oxygenated functional groups.; Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 34,(9) 1474–1484 (2017)
 6. Tanabe, S., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Serizawa, H., Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A. Toxicity of repeated 28-day oral administration of acenaphthylene in rats, (2017) *Fundam. Toxicol. Sci.*, 4, 247-259.
 7. Matsumoto, M., Iso, T., Yamaguchi, H., Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (III), *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 135, 39-44, 2017.
 8. Matsumoto, M., Furukawa, M., Kobayashi, K, Iso, T., Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A., A 28-day repeated oral-dose toxicity study of insecticide synergist N-(2-ethyl-hexyl)-1-isopropyl-4-methyl bicyclo [2.2.2] oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats, (2018) *Fundam. Toxicol. Sci.*, 5, 1-11.
 9. Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Igarashi, T., Hirose, A. Male-specific prolongation of prothrombin time by industrial chemicals, (2018) *Fundam. Toxicol. Sci.*, 5, 75-82.
- 学会発表
1. 本間正充、Ames/QSAR International Collaborative Study、口頭、第7回国際遺伝毒性試験国際ワークショップ、東京、2107/11/8
 2. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第12回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/15
 3. 本間正充、AOP-based Evaluation of

- Chemical Mutagenicity and Development of New Endpoints and Models 口頭、第 12 回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/14
4. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第 17 回中国環境変異原学会年次大会、中国、2017/12/7
 5. 本間正充、QSAR の最近の進歩について、第 2 回 ICH M7 関連ワークショップ、東京、2017/5/23
 6. R. E. Tennant, S. Canipa, W. Drewe, A. Cayley, S. Guesne, S. A. Stalford, R. V. Williams, K. Masumura, T. Morita, A. Hirose and M. Honma, Extrapolation of in vitro mutagenicity alerts to the in vivo endpoint in Derek Nexus, 10th World Congress on Alternatives and Animal use in the life sciences, 20-24 August 2017, Seattle, USA.
 7. 藤田侑里香、本田大士、松村奨士、川本泰輔、森田健、松田知成、伊藤勇一、山根雅之、森田修、データサイエンスに基づいた染色体異常誘発性の高精度予測と発がん性予測への展開、第 44 回日本毒性学会、2017 年 7 月 10 ~ 12 日、横浜
 8. Yurika Fujita, Hiroshi Honda, Shoji Matsumura, Taisuke Kawamoto, Takeshi Morita, Tomonari Matsuda, Yuichi Ito, Masayuki Yamane, Osamu Morita, Refinement of in silico cytogenicity evaluation and development of an integrated testing strategy for carcinogenicity based on data science, The 53rd Eurotox, Bratislava, Slovakia, 2017.9.10-13.
 9. 森田健、重田善之、川村智子、藤田侑里香、本田大士、本間正充、染色体異常誘発性の in silico 予測、日本環境変異原学会第 46 回大会、平成 29 年 11 月 6 ~ 7 日、東京
 10. Takeshi Morita, Yoshiyuki Shigeta, Tomoko Kawamura, Yurika Fujita, Hiroshi Honda, Masamitsu Honma, Comparison of Three QSAR Models for Prediction of Chromosome Damage, 12th ICEM, Inchon, Korea, 2017.11.12-16.
 11. Yurika Fujita, Hiroshi Honda, Shoji Matsumura, Takeshi Morita, Tomonari Matsuda, Masayuki Yamane, Osamu Morita, Development of new in silico cytogenicity evaluation tools and integrated testing strategy for carcinogenicity based on genotoxicity data and chemical space, 12th ICEM, Inchon, Korea, 2017.11.12-16.
 12. A. Ono, S. Watanabe, T. Sugawara, K. Wakabayashi, Y. Tahara, N. Horie, K. Fujimoto, K. Kusakari, Y. Kurokawa, T. Sozu, T. Nakayama, T. Kusao, T. Kawakami, K. Kojima, H. Kojima, J. Richmond, N. Kleinstreuer, K. Bae-Hwa, Y. Yamamoto, M. Fujita and T. Kasahara :A multi-centre validation study of Amino acid

- exposure of contaminants in drinking water. 53rd European Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2017, Bratislava, Slovak).
20. Yamada, T., Hirose, A., Yang, C., Rathman, J. Evaluation of Genotoxicity and Carcinogenicity Profile for the TTC Database Used to Develop Safety Thresholds of Industrial Chemicals. Society of Toxicology Society, 57th Annual Meeting and ToxExpo (March 2018, San Antonio, USA).
21. Hirose, A., Kawamura, T., Igarashi, T., Yamada, T., Inoue, K., Nishimura, T., Matsumoto, M. Expansion of the sub-acute reference doses for non-quality-standard chemicals in drinking water. Society of Toxicology Society, 57th Annual Meeting and ToxExpo (March 2018, San Antonio, USA).
22. 山田 隆志, 全身毒性の予測へ向けた毒性データベース - 透明性・データの共有・国際動向 - 、第 44 回日本毒性学会大会シンポジウムシンポジウム：インビトロ・インシリコ手法による全身毒性予測評価の現状と課題。(2017 年 7 月、横浜)。
23. Yamada, T., Hayahshi, M., Honma, M. Toxicity Databases of Chemical Substances in Japan to Improve *in Silico* Approaches for Regulatory Safety Assessment. 53rd European Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2017, Bratislava, Slovak).
24. Yamada, T. Toxicity Databases of Chemical Substances in Japan to Improve *in Silico* Approaches for Regulatory Safety Assessment. 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens, (November 2017, Incheon, Korea).

H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担報告書

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

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ツー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ツールの開発に有用と考えられる12,140化学物質をデータベース化した。平成29年度はこのうち4,409化合物を用いて、エームス試験結果の予測精度を競うPhase IIIトライアルを行った。世界6カ国から、11のQSARベンダーがAmes/QSAR国際競争のPhaseIIIトライアルに参画し、19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平均76%であった。しかしながら、Phase Iでの一致率は平均75%、Phase IIでの一致率は平均80%であり、PhaseIIからの予測率は低下した。その理由として特異性の低下が考えられた。PhaseIIIの化合物の5%分子量800以上のエームス陰性化合物で有り、その95%がエームス陰性であるが、これらを正しく陰性と予測できなかったことが原因と考えられる。事実、感度に関してはPhaseIIよりわずかな改善が認められた。3回のトライアルにより、本共同研究は成功裡に終了した。さらに、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。また、トレーニングデータのいくつかには間違っていて、陰性、もしくは陽性とラベルされているものが確認された。これらデータはQSARモデルの開発に大きな障害となる。正確な試験結果データのみからなるベンチマークデータセットを整備し、トレーニングデータとすることが精度の高いQSARモデルの開発に重要である。

キーワード：エームス試験、安衛法、化審法、QSAR、国際共同研究

A . 研究目的

現在、人によって新たに作り出された化学物質は登録されているものだけでも1億4千万種類を超え、これは1日約4000種類のペー ス で 増 え 続 け て い る

(<http://www.cas-japan.jp/>)。これまでの調査では新規化学物質の約5%は強い変異原性を有し、人間に対して発がん性を示すと推察されている。このような変異原性化学物質を効率的、且つ正確に検出し、規制の

対象とすることは公衆衛生上重要な取り組みである。近年、IT（情報技術）の進歩により、化学物質の変異原性をインシリコで評価することが可能となっている。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、改良目的として国際共同研究を実施した。

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12,140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、3,902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3,829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での予測率は、Phase Iよりも向上していた。

今回、最後のPhaseIIIトライアルを実施した。4,409化合物リストを世界6カ国、11のQSARベンダーに提供し、19のQSARモデルが最後のチャレンジを行った。

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、12,140を電子データ化し、QSARで計算できるように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。

今回のPhase IIIトライアルでは、上述の12,140物質のうち、Phase I、IIで利用した使用した7,731物質を除く、4,409物質のリストをQSARベンダー提供し、にエームス試験結果予測のコンペティションを実施した。Phase の4,409物質を含む、全12,140物質の内訳を表1に示す。これら物質のエームス試験結果は以下の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 (236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 (393物質)
- Class C: エームス試験における陰性判定物質 (3,780物質)

B-2 共同研究参加機関

Phase III 国際共同研究は世界6カ国、11のQASRベンダーが共同研究に参画した。PhaseIIまで参加したProus社 (スペイン) は都合により参加を辞退した。Phase IIIでは合計19のQSARツールが4,409物質のエームス試験結果を予測にチャレンジした (表2)。

B-3. 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 (Sensivity)、特異度 (Specificity)、全体の一致率 (Concordance) 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あり、さらに変異原性の強い物質を検出できる感度 (A-Sensivity) を別に計算した。

C. 結果

C-1. Phase III 4,409化合物のQSARによるエームス試験結果の予測

表3に11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。

17のモデルの内、Phase IIまで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モデルの改善は困難である。一方、統計ベースモデルは簡単に組み入れることができる。特に高いA-sensitivityを示したのはブルガス大学にTIMES(85.7%)であったが、これは予測のドメイン構造に限られ、低いApplicabilityを持つためである(9.7%)。他に、高いA-sensitivityを示したのとしてラーサ社のSarah(83.1%)が挙げられる。Sarahはsensitivityも最も高かった(70.4%)。一方、Specificityに関してはMCASE社のCASE Ultra-statisricalが92.8% と最も高く、FUJITUのADMEWORKS (87.8%)、STSRのAZAMES (87.7%) が後に続いた。全体の一致率(concordance)はUltra-statisrical (87.3%)、AZAMES(83.9%)が高かった。

表4にPhase I, II, IIIでのA-sensitivity、sensitivity、Specificity、Applicabilityをまとめた。Phase IでのConcordanceは平均75%、Phase IIでは80%、Phase IIIでは76%であり、Phase IIIでの全体的な予測性の改善は認められなかった。一方、Sensitivityに注目すると、Phase IIからPhase IIIでわずかに改善が認められた。

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4,409化学物質には236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6化合物については、全てのQSARツールで、10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1)。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4,409化学物質のうち3,780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13化合物については、全てのQSARツールで、別の10化合物については1つもしくは2つを除くほとんどQSARツールで陽性の判定がされた(図2)。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同然で有り、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4,409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、74~87%の一致率 (Correspondence) を示した。しかしながら、PhaseIからIIIまでの全体の一致率を見てみると、Phase Iでの一致率は平均75%、Phase IIでの一致率は平均80%であったが、PhaseIIIでは76%であり、PhaseIIからの予測率は低下した。その理由として特異性の低下が考えられた。PhaseIIIの化合物の5%分子量800以上のエームス陰性化合物で有り、その95%がエ

ームス陰性であるが、これらを正しく陰性と予測できなかったことが原因と考えられる (表2)。事実、感度に関してはPhaseIIよりわずかな改善が認められた。3回のトライアルにより、本共同研究は成功裡に終了した。さらに、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。また、トレーニングデータのいくつかには間違っ、陰性、もしくは陽性とラベルされているものが確認された。これらデータはQSARモデルに開発に大きな障害となる。正確な試験結果データのみからなるベンチマークデータセットを整備し、トレーニングデータとすることが精度の高いQSARモデルの開発に重要である。

ほとんど全てのQSARツールの全てが陰性と間違っ判定したClass A化学物質が6化合物存在した。これは偽陰性物質で有り、この割合が多いことに規制当局がQSARの利用に対して最も懸念する部分である。Phase IIIでは、これはClassA物質の2.5%に相当する。この割合はPhase Iで10%、PhaseIIでは3.6%に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、偽陰性は減少していることが示された。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。

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、12,140化学物質をデータベース化した。H29年度はこのうち4,409化合物について、エームス試験結果の予測精度を競うPhase IIIトライアルを行った。世界6カ国から、11のQSARベンダーがこの国際競争に参画し、19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プロジェクト開始前と比較して大幅向上されたが、PhaseIIからPhaseIIIの向上は顕著ではなかった。予測率の向上には、新規データセットをトレーニングデータとして単純に組み入るだけでなく、物質の特徴（分子量）や、既存のトレーニングデータを適切にレビューする必要がある。QSARモデルのさらなる改良には、科学的且つ、信頼性の高いベンチマークデータセットの開発が鍵である。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. Petkov, PI, Schultz TW, Honma M, Kirilov K, Kotov S, Mekenyan OG. Predicting in vitro genotoxicity by mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase mutation assay (MLA): Accounting for simulated metabolic activation of chemicals. *Computational Toxicology*. 4, 45-53, 2017.
Doi:10.1016/j-comtox.2017.10.002
2. Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G,

Honma M, Benfenati E. Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 35, 239-257, 2017. doi: 10.1080/10590501.2017.1391521.

3. 本間正充、食品中に含まれる化学物質のリスクアセスメントと遺伝毒性評価、FFIジャーナル、Vol.223 No.01、8-16、2018

学会発表

1. 本間正充、Ames/QSAR International Collaborative Study、口頭、第7回国際遺伝毒性試験国際ワークショップ、東京、2107/11/8
2. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第12回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/15
3. 本間正充、AOP-based Evaluation of Chemical Mutagenicity and Development of New Endpoints and Models 口頭、第12回国際環境変異原学会、韓国、2017/11/14
4. 本間正充、In Silico Approaches in Genetic Toxicology -Progress and Future- 口頭、第17回中国環境変異原学会年次大会、中国、2017/12/7
5. 本間正充、QSARの最近の進歩について、第2回ICH M7関連ワークショップ、東京、2017/5/23

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 : Participants in Ames/QSAR International Challenge Project

QSAR Vender	QSAR Tool	Methodology
1. Lhasa Limited (UK)	a. DEREK Nexus	Rule
	b. SARAH Nexus	Statistical
2. MultiCASE Inc (USA)	c. CASE Ultra statistical-based	Statistical
	d. CASE Ultra rule-based	Rule
3. Leadscope Inc (USA)	e. Leadscope statistical-based	Statistical
	f. Leadscope rule-based	Rule
4. (Italy) IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri	g. CAESAR	Statistical
	h. SARPY	Statistical
	i. KNN	Statistical
5. LMC - Bourgas University (Bulgaria)	j. OASIS/TIMES	Hybrid*
6. Istituto Superiore di Sanita (Italy)	k. Toxtree	Rule
7. Prous Institute (Spain)	l. Symmetry	Statistical
8. Swedish Toxicology Science Research Center (Sweden)	m. AZAMES	Statistical
9. FUJITSU KYUSHU SYSTEMS LIMITED (Japan)	n. ADMWORKS	Statistical
10. IdeaConsult Ltd. (Bulgaria)	o. AMBIT	Statistical
11. Molecular Networks GmbH and Altamira LLC (USA)	p. ChemiTunes and ToxGPS	Statistical
12. Simulation Plus (USA)	q. Mut_Risk-0	Statistical

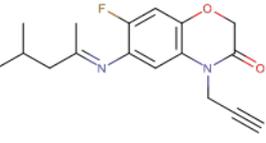
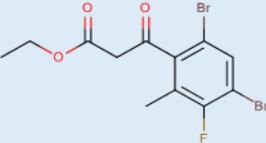
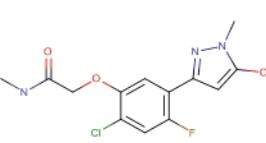
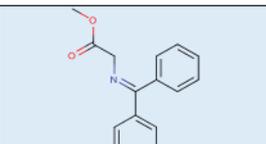
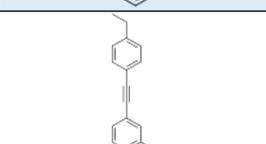
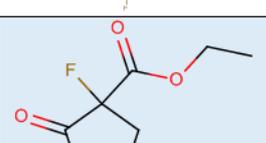
表3: Summary of the results of prediction by QSAR models in Phase III_4409

Builders	QSAR Models	QSAR_Results	Ames Strong positive A (++)	Ames Positive B (+)	Ames Negative C (-)	Ames data Total	Sensitivity [A] (%)	Sensitivity [A+B] (%)	Specificity (%)	Concordance (%)	Applicability (%)
Lhasa Limited (UK)	Derek Nexus v. 5.0.1	positive	107	177	833	977	70.8	54.7	83.3	79.2	100.0
		negative	89	216	3147	3432					
		total	236	393	3780	4409					
	Sarah Nexus v. 2.0.1 (model v.1.1.19)	positive	104	103	541	748	59.1	44.0	82.3	77.3	80.2
		negative	72	191	2524	2787					
		total	176	294	3065	3555					
	Sarah research prototype prediction	positive	147	169	649	965	83.1	70.4	74.4	73.8	67.7
		negative	30	103	1888	2021					
		total	177	272	2537	2966					
	Sarah Nexus v. 2.0.1 (model v.1.1.19)	positive	135	156	682	952	72.2	60.5	78.1	75.7	79.5
		negative	52	137	2383	2552					
		total	187	292	3025	3504					
MultiCASE Inc (USA)	Statistical approach: SALMIECOLI consensus RULE BASED (GT_EXPERT)	Positive	132	116	238	486	69.8	50.6	92.8	87.3	85.9
		Negative	97	185	3081	3303					
		total	189	301	3299	3789					
Leadscope Inc (USA)	Leadscope gene tox statistical QSAR (Salmonella v3(internal candidate) and E.coli/TA102 v1)	positive	139	174	547	860	69.8	59.6	83.6	80.3	87.3
		negative	60	152	2779	2991					
		total	199	326	3326	3851					
Leadscope Inc (USA)	Leadscope gene tox expert alerts suite (Bacterial mutagenicity v2)	positive	143	153	434	730	69.4	55.5	87.1	82.8	88.4
		negative	63	174	2931	3168					
		total	206	327	3365	3898					
Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (Italy)	CAESAR (training set based on Katus et al.)	positive	184	241	1246	1671	78.0	67.6	67.0	67.1	100.0
		negative	52	152	2534	2738					
		total	236	393	3780	4409					
	SARPY (training set based on Katus et al.)	positive	171	227	1484	1882	72.5	63.3	60.7	61.1	100.0
		negative	85	168	2298	2527					
		total	236	393	3780	4409					
	KNN (training set based on Hansen et al. + strong positive in the first phase)	positive	145	179	1139	1463	61.7	51.8	69.6	67.1	99.2
		negative	90	212	2609	2911					
		total	235	391	3748	4374					
Bourgas University (Bulgaria)	TIMES AMES mutagenicity v.14.14. (In domain)	positive	18	13	46	77	85.7	47.0	87.3	81.0	9.7
		negative	3	32	315	350					
		total	21	45	361	427					
Bourgas University (Bulgaria)	TIMES AMES mutagenicity v.14.14. (All)	positive	151	163	822	1136	64.0	50.0	78.2	74.2	99.9
		negative	85	229	2953	3267					
		total	236	392	3775	4403					
Istituto Superiore di Sanità (Italy)	ToxTree 2.6.6	positive	173	210	1165	1548	73.3	60.9	69.2	68.0	100.0
		negative	63	183	2815	2861					
		total	236	393	3780	4409					
Swedish Toxicology Science Research Center (Sweden)	SveboxZAMES v2	positive	168	174	427	769	77.1	61.0	87.7	83.9	91.2
		negative	50	169	3033	3252					
		total	218	343	3460	4021					
FUJITSU KYUSHU SYSTEMS (Japan)	ADMWORKS AMES ver7.1.0	positive	100	105	348	553	60.6	46.3	87.8	82.2	74.5
		negative	65	173	2495	2733					
		total	165	278	2843	3286					
IdeaConsult Ltd. (Bulgaria)	Ambit consensus model	positive	166	212	748	1126	70.3	60.1	80.0	77.1	99.1
		negative	70	181	2994	3245					
		total	236	393	3742	4371					
Molecular Networks GmbH and Altamira LLC	Altamira/MN prediction	positive	180	206	624	1010	78.6	65.2	82.7	80.3	95.4
		negative	49	157	2989	3195					
		total	229	363	3613	4205					
Simulation Plus (USA)	MUT_Risk@5	positive	174	205	1018	1397	76.0	61.5	72.0	70.5	96.4
		negative	55	182	2617	2854					
		total	229	387	3635	4251					
Average							72.1	57.7	78.9	75.9	86.4
Minimum							59.1	44.0	60.7	61.1	9.7
Maximum							85.7	70.4	92.8	87.3	100.0

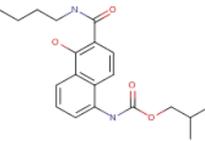
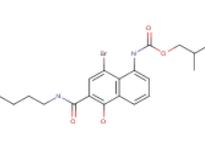
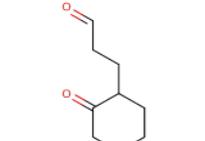
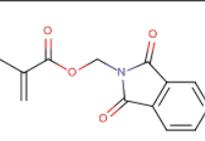
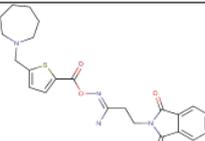
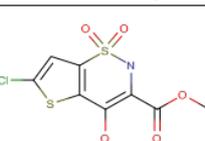
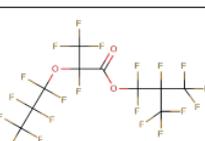
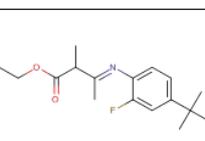
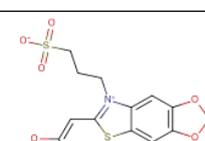
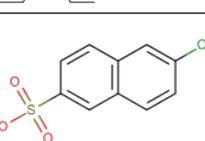
表4: Summary of the results of prediction by QSAR models in the Ames/QSAR challenge project_12,140

	Phase I	Phase II	Phase III
A-sensitivity	68.9 (51.4-82.8)	73.2 (58.5-89.5)	72.1 (59.1-85.7)
Sensitivity	55.8 (38.6-70.0)	57.6 (44.8-72.1)	57.7 (44.0-70.4)
Specificity	78.6 (62.5-91.5)	84.1 (64.9-93.5)	78.9 (60.7-92.8)
Concordance	75.3 (63.6-83.9)	80.2 (65.8-87.7)	75.9 (61.1-87.3)
Applicability	86.7 (14.5-100)	85.7 (18.0-100)	86.4 (9.7-100)

☒ 1: Class A chemicals, but all QSAR tools predicted “negative “ (false negatives)

Serial Id	ANEI No.	CAS#	Chemical_Name	Structure	Result	Mol Weight
6275	8-(7)-1104	NO_CAS	6-[[1,3-dimethylbutylidene)amino]-7-fluoro-4-(2-propenyl)-3,4-dihydro-2H-1,4-benzoxazine-3-one		A	302.349
7070	4-(7)-1776	NO_CAS	3-(4,6-dibromo-3-fluoro-2-methylphenyl)-3-oxopropionic acid ethyl ester		A	382.023
8218	8-(2)-1758	NO_CAS	2-[2-chloro-4-fluoro-5-(5-hydroxy-1-methyl-1H-pyrazol-3-yl)phenoxy]-N-methylacetamide		A	313.71
12639	7-(4)-1058	NO_CAS	2-[[diphenylmethylene)amino]acetic acid methyl ester		A	253.301
12798	7-(4)-1059	NO_CAS	4-[(4-ethylphenyl)ethynyl]-1,2-difluorobenzene		A	242.269
20043	3-(3)-170	NO_CAS	ethyl 1-fluoro-2-oxo-cyclopentane-1-carboxylate		A	174.171

☒2: Class A chemicals, but almost QSAR tools predicted “negative “ (false negatives)

Serial	JANEI No.	CAS#	Chemical_Name	Result	Mol Weight	Structure
3561	5-1118	NO_CAS	N-[6-(N-butyl carbamoyl)-5-hydroxy-1-naphthyl] carbamic acid isobutyl ester	A	358.4	
3565	5-1119	NO_CAS	N-[8-bromo-6-(N-butyl carbamoyl)-5-hydroxy-1-naphthyl] carbamic acid isobutyl ester	A	437.3	
7351	3-(4)-433	NO_CAS	3-(2-oxocyclohexyl) propanal	A	154.2	
7762	8-(1)-2411	NO_CAS	methacrylic acid 1,3-dioxo-2H-isoindole-2-ylmethyl ester	A	245.2	
10063	8-(1)-2688	NO_CAS	N-[2-[N2-[5-(hexahydro-1H-azepine-1-yl)methyl]-2-thienyl carbonyloxy]amido]ethyl phthalimide	A	454.6	
11025	8-(7)-1337	NO_CAS	6-chloro-4-hydroxy-1,1-dioxo-1-thia (VI)-2H-thieno[2,3-e]-1,2-thiazine-3-carboxylic acid methyl ester	A	295.7	
12457	2-(6)-1576	NO_CAS	2,3,3,3-tetrafluoro-2-(heptafluoropropoxy)propanoic acid 2-(trifluoromethyl)hexafluoropropyl ester	A	548.1	
13405	4-(7)-2114	NO_CAS	3-(4-tert-butyl-2-fluorophenylimino)-2-methylbutanoic acid ethyl ester	A	293.4	
15383	8-(7)-1520	NO_CAS	3-[[6-(2-ethoxy-1-butenyl)-1,3-dioxolo[4,5-f]benzothiazole-7-ium]-7-yl]propane-1-sulfonate	A	399.5	
15410	5-1372	NO_CAS	6-chloronaphthalene-2-sulfonic acid	A	242.7	

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担報告書

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

分担研究課題名：*In vivo* 遺伝毒性試験 QSAR の開発 -3 つの *in silico* モデルによる *in vitro*
染色体異常予測性の比較-

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 重田 善之 国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部第三室
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第一室
研究協力者 藤田侑里香 花王株式会社安全性科学研究所
研究協力者 本田 大士 花王株式会社安全性科学研究所

研究要旨

Ames 試験の結果予測のための *in silico* モデルが多く開発されている一方で、*in vitro* 染色体異常試験（CA）の予測モデルは、さほど開発が進んでいない。しかし、Derek Nexus（Derek）、ADMEWORKS（AWorks）あるいは CASE Ultra（MCASE）は、Ames 変異原性と同様に *in vitro* CA も予測することができる。そこで、*in vitro* CA 予測モデルの現状を把握し、*in vivo* を含めた染色体損傷性を予測する QSAR の開発に資するために、拡張版 CGX データベースを用いてそれらの予測性を比較検証した。発がん性および非発がん性の 440 物質について *in vitro* CA 結果に対する各モデルの感受性と特異性は、Derek ではそれぞれ 56.0%および 86.9%、AWorks では 67.7%および 61.5%、MCASE では 91.0%および 64.9%で、MCASE の感受性は、他のモデルよりも高かった。化学物質クラスに対する *in silico* モデルの予測性に、モデル間の大きな違いは認められなかった。発がん物質に対する各モデルの感受性は、非発がん物質よりもわずかに高かった。これらの結果は、検討した *in silico* モデルはいずれも CGX データベース物質における CA 予測に有用であると考えられた。CA 予測の改善には、用いるデータの精緻化（例えば、高細胞毒性状況下の陽性知見の排除、相反知見の確定、質の高い GLP 試験データの利用等）や生体影響、特に *in vivo* における代謝への考慮が必要と考えられた。

A. 研究目的

Ames 試験の結果予測のための *in silico* モデルが多く開発されている一方で、*in vitro* 染色体異常試験（CA）の予測モデルは、さほど開発が進んでいない

ようである。しかし、市販の *in silico* モデルには、Ames 変異原性と同様に *in vitro* CA も予測することができるものがある。そこで、*in vitro* CA 予測モデルの現状を把握しその精度を向上させ、さら

に *in vivo* 染色体損傷性 (小核(MN)を含む) を高精度に予測する QSAR の開発に資するために、拡張版 CGX データベース(DB) を用いて 3 種の *in silico* モデル (Derek Nexus [Derek]、ADMEWORKS [AWorks]、CASE Ultra [MCase]) の *in vitro* CA 予測性を検証比較した。

B. 研究方法

構築した拡張版 CGX DB に対し、Derek、AWorks および MCase の 3 種の *in silico* モデルを適用し、*in vitro* CA に対する各モデルの予測性を検証比較した。また、一部の *in silico* モデルについては、*in vivo* MN に対する予測性を検証した。

B.1. 使用データベース

拡張版 CGX DB (Morita et al, 2016) を用いた。本 DB は CGX DB (発がん物質 756、非発がん物質 183 の計 939 物質を収載; Kirkland et al, 2005) の Ames および *in vitro* CA データを更新し、新規に *in vivo* MN 試験およびげっ歯類トランスジェニック遺伝子突然変異 (TGR) 試験データを追加したものである。

B.2. 解析対象からの除外

B.2.1 評価困難物質

In vitro CA データに対する複数の *in silico* モデルの予測性の比較を実施するにあたり、構造に基づく評価の困難性のため、拡張版 CGX DB より以下の物質を解析対象から除外した:

- 構造不特定物質および重合物質
- 一部の混合物 (異性体混合物を含む)
- 塩の有無・塩違いの物質 (フリー体と

塩類では原則的にはフリー体を評価、あるいは遺伝毒性データ数が少ない物質を除外するなどして同一構造の重複を除外)

- ケイ素化合物・フッ素化合物
- 金属化合物
- 一部の Technical grade 物質

これらの除外により、発がん物質 (C) 713、非発がん物質 (NC) 167 が解析対象となった。

B.2.2 *In vitro* CA/*in vivo* MN データ欠如物質

上記解析対象物質から *in vitro* CA あるいは *in vivo* MN データのないものを除外した。*In vitro* CA あるいは *in vivo* MN で陰性 (-) あるいは陽性 (+) のものを選択し、E (equivocal, 不明確) あるいは TC (Technical compromise, 試験内容に問題) のものは削除した。その結果、上述の解析対象の発がん物質 713、非発がん物質 167 は、最終的に発がん物質 394、非発がん物質 130 となった (合計 524 物質)。すなわち、これらは、少なくとも *in vitro* CA あるいは *in vivo* MN のいずれかについて陽性 (+) あるいは陰性 (-) のデータが存在する物質である。

B.3. 使用 *in silico* モデル

知識ベースとして Derek Nexus (ver. 5.0.2, KB2015) [Derek]、統計ベースとして ADMEWORKS (ver. 7.9.1.0) [AWorks] および CASE Ultra (ver. 1.6.0.3; CA-CHL, CA-CHO, MNT-mouse) [MCase] を用いた。*In vitro* CA の予測には Derek、AWorks、

MCase CA-CHL および MCase CA-CHO の4つを適用し、さらに MCase の CA-CHL と CA-CHO の結果は統合させ、MCase CA-CHL/CHO として評価した。また、*in vivo* MN の予測には MCase MNT-mouse を適用した。

B.4. 予測性評価

各 *in silico* モデルによる解析結果の表記 (アウトプット) はそれぞれ異なっている。そこで、各モデル間の比較を可能とするために、アウトプットを以下のようにまとめた (表 1) : 抽出した発がん物質 394、非発がん物質 130 に対する各 *in silico* モデルの予測結果を、+、-、E (Equivocal)、NA (Not applicable) に集約し、感受性 (Sensitivity)、特異性 (Specificity)、正確性 (Accuracy) あるいは適用性 (Applicability) を評価した。それぞれの算出方法を表 2 に示す。なお、MCase の CA-CHL (MCase CA-CHL) および CA-CHO (MCase CA-CHO) の結果の統合 (MCase CA-CHL/CHO) においては、両モデルで異なる予測 (+/- など) は陽性予測に重みを置き+にするとともに、NA/E と -/+ の不一致においては、確定的予測に重みを置いて-あるいは+とした (表 3)。

B.5. 化学物質のクラス分類

各 *in silico* モデルの化学物質グループ/クラスに対する特性を評価するために、解析対象の 524 物質 (394 の発がん物質 (C) および 130 の非発がん物質 (NC)) について主に構造に基づくクラス分類を行った。2007 年版 CGX DB (CGX 2007、JRC/EURL ECVAM) に記載された

「Chemical Grouping」をもとに、類似構造を集約した。また、CGX 2007 で「Miscellaneous」とされた物質、ならびに集約しても発がん物質と非発がん物質で 2 物質以下のグループは、すべて「Others」とした。

C. 研究結果

解析対象の発がん物質 394、非発がん物質 130 に対する *in vitro* CA および *in vivo* MN の試験結果 (+あるいは-)、ならびに各 *in silico* モデルの予測結果 (+、-、E (Equivocal)、NA (Not applicable)) を Appendix 1 (発がん物質) および Appendix 2 (非発がん物質) にまとめた。

C.1. 評価対象物質

In vitro CA ではデータ (+あるいは-のみを対象) の認められた 440 物質 (発がん物質 C、n=325、非発がん物質 NC、n=115) を抽出し、それらを対象に 3 種の *in silico* モデルの予測性を評価した。また、*in vivo* MN ではデータ (+あるいは-のみを対象) の認められた 337 物質 (C、n=266 および NC、n=71) を抽出し、それらを対象に *in silico* モデル (MCase: MNT-mouse) の予測性を評価した。

C.2. 各 *in silico* モデルの *in vitro* CA に対する予測性

In vitro CA について、各モデルの全物質 (発がん物質および非発がん物質、C+NC) および発がん物質 (C) あるいは非発がん物質 (NC) に対する感受性、特異性、正確性等を表 4 および表 5 ならびに図 1 に示した。全物質 (C+NC) に対する感受性および特異性は、Derek で

56.0%および86.9%、AWorksで67.7%および61.5%、MCase CA-CHLで87.4%および57.5%、MCase CA-CHOで76.2%および93.5%、統合したMCase CA-CHL/CHOで91.0%および64.9%であった。MCaseが比較的高い感受性を示した。正確性は、Derekで68.6%、AWorksで65.2%、MCase CA-CHLで76.3%、MCase CA-CHOで83.5%、統合したMCase CA-CHL/CHOで80.5%を示し、MCaseの正確性が高かった。適用性は、Derekで89.1%、AWorksで99.3%、MCase CA-CHLで77.7%、MCase CA-CHOで90.9%、統合したMCase CA-CHL/CHOで97.7%を示し、AWorksおよびMCaseが高かった。各 *in silico* モデルの発がん物質 (C) と非発がん物質 (NC) に対する比較では、顕著な特徴は認められなかったが、感受性については、いずれのモデルも非発がん物質よりも発がん物質に対するものがわずかに高かった。

C.3. MCase (MNT-mouse)の *in vivo* MN に対する予測性

MCase には、*in vivo* MN の予測に特化した *in silico* モデルの「MNT-mouse」がある。*In vivo* MN について、MNT-mouse の全物質 (C+NC) ならびに C あるいは NC 別に対する感受性、特異性、正確性等を表 6 および表 7 ならびに図 2 に示した。MNT-mouse の C+NC に対する感受性および特異性は 91.1%および57.0%で、極めて高い感受性を示したものの特異性は高いものではなかった。また、正確性および適用性は 72.4%および81.6%を示し、これらの値

は *in vitro* CA に対する各 *in silico* モデルの予測性 (正確性 65.2~83.5%、適用性 77.7~99.3%) と同程度であった。C と NA の比較では顕著な特徴は認められなかったが、NC で小核を誘発した 20 物質すべてを *in silico* でも陽性と予測していた。

C.4. 化学物質のクラス分類

最終的に 524 の解析対象物質を 36 クラスに分類した (表 8、Appendix 1 および 2)。表 8 に示したように各クラスの物質数は Others を含めて 3~69 であり、中には該当物質数が 5 個前後と少ない化学物質クラスもいくつか認められた。さらにその中で *in silico* 評価で-あるいは+となったもの、ならびに *in vitro* CA の実データは限られることから、クラス別解析には *in vitro* CA データを有する物質が 5 つ以上のクラスを対象とした。これにより、クラス別の解析は 22 クラスとなった (表 9)。*In silico* モデルの比較において、MCase は CHL と CHO を統合した CA-CHL/CHO を用いた。各クラスに対する *in silico* モデルの評価結果は、わずかな相違は存在するもののモデル間でほぼ一致した。わずかな相違は、Aromatic amines or amides、Aromatic nitro compounds および Azo compounds における Derek の陽性予測の少なさであった。*In silico* モデルの特徴として Alkylating agents、Aromatic amines or amides、Aromatic nitro compounds、Epoxides、Halides、N-nitro or N-nitroso compounds の多くは、いずれのモデルにおいても陽性予測がなされ、Alcohols、Alkenes、Azo compounds、Carboxylic

acids および Polyhalogenated aromatic compounds の多くについては陰性予測とされていた。残りの 11 の化学物質クラス (Amines/Amides/Imines、Carbamates、Halogenated compounds、Hydrazines、Ketones 、 Phenols 、 Phosphorous compounds、Ureas および Others) は、予測結果に明確な傾向は認められなかった (表 9)。

D. 考 察

In vitro CA 予測における各モデル (Derak、AWorks、MCase CA-CHL、MCase CA-CHO) の感受性は 56.0 ~ 87.4%、特異性は 57.5 ~ 93.5% および正確性は 65.2 ~ 83.5% であった。MCase の CA-CHL と CA-CHO を統合評価 (両モデル間での+と-の不一致は、+と評価) した MCase CA-CHL/CHO では感受性 91.0%、特異性 64.9% および正確性 80.5% であった。正確性に関するこれらの値は、Derak、AWorks、MCase の各 *in silico* モデルの CGX DB 物質に対する初期の Ames 予測における値 (正確性 65.6 ~ 92.7%; Hayashi et al, Mutation Res, 588, 129-135, 2005) と比較すると、若干低かった。また、各モデル間の感受性/特異性に関する比較では、Derek が低/高、AWorks が中/中、MCase CA-CHL が高/低、MCase CA-CHO が高/高の傾向を示し、MCase CA-CHL/CHO は高/中であった。これらの違いは、知識ベースと統計ベースによるアプローチの違いや、それらの構築に用いたデータベースの違いに起因するものと思われる。MCase CA-CHO の高い正確性 (83.5%) は、CGX DB の知見を CA-CHO モデルに適用しているためと

推察される。すなわち、CGX DB の *in vitro* CA 知見の多くは NTP の CHO 細胞を用いた染色体異常試験結果を引用しているためであろう。

拡張版 CGX DB では、*in vitro* CA において 10 mM を超える濃度でのみ陽性を示した物質は、陰性 (-) と評価している。このような物質は全部で 12 (発がん物質 7、非発がん物質 5) あり、それらの *in silico* 評価を表 10 にまとめた。*In silico* 評価における一般的な特徴は特段認められなかったが、CHL あるいは CHO 細胞を用いた試験に特化した MCase の *in silico* モデルにおいて、陽性評価が多い傾向がうかがわれた。当該物質の有する染色体異常誘発性は、直接的には処理濃度とは関連せず、また代謝などが関与した標的組織移行性 (曝露) のため *in vitro* と *in vivo* 知見の相違も認められる。さらに、*in vitro* CA の結果自体も、現行ガイドラインには適合しない高細胞毒性状況や長時間処理に起因した陽性知見が含まれていると推察される。このように、*in vitro* CA の知見自体が、用いる細胞や試験プロトコール (処理濃度、処理時間、細胞毒性基準、陽性判定基準 [以前の CHL を用いた試験による 10%法や統計処理] など) によって異なっているため、統一的結果を導き出すことが困難状況にある。さらに *in vivo* 知見を含め、生体にとって意味のある陽性を正しく陽性と予測するには、代謝の影響を考慮する必要があり、*in vitro* CA 知見も単に陽性陰性ではなく、代謝活性化系存在化下および非存在下における結果など詳細な知見を利用が不可欠と考えられる。補足的に実施した MCase MNT-mouse を用いた *in vivo* MN の *in silico* 予測では、良好な感

受性 (91.1%) が得られている。拡張版 CGX DB の *in vivo* MN 知見は骨髄あるいは末梢血を用いたいわゆる血液系小核試験の結果である。重要な発がん物質には *in vitro* CA において代謝活性化系存在化下で陽性を示しながら、*in vivo* 血液系小核試験では陰性を示すものが多く知られている。例えば、Aromatic amines or amides、N-nitro or N-nitroso compounds、Polycyclic aromatic hydrocarbons などであり、このような物質は肝臓を用いた小核試験では陽性知見を示す場合がある。CA の *in silico* 評価の開発は、代謝を考慮して進めていく必要がある。

発がん性物質の化学物質クラス毎の CA 誘発性に関する *in silico* 評価では、Amines/Amides/Imines、Carbamates、Halogenated compounds、Hydrazines、Ketones、Phenols、Phosphorous compounds および Ureas で、陰性陽性の予測がほぼ半分に分かれた。このようなクラスについては、使用データの精緻化が予測性の改善に効果があるかもしれない。

F. 結論

In vitro CA 予測に対する 3 つの *in silico* モデルの比較から、検討したモデルはいずれも CA 予測に有用であると考えられた。しかしながら、その予測性 (特に感受性) は、総体的に初期の Ames 予測よりも低いものであった。その改善には、用いるデータの精緻化 (例えば、高細胞毒性状況下の陽性知見の排除、相反知見の確定、質の高い GLP 試験データの利用等) や生体影響、特に *in vivo* における代謝への考慮が必要と考えられた。これらに対応することにより、さらなる予測精度の向上

が期待できる。

G. 研究発表

誌上発表

1. Horibe A, Odashima S, Hamasuna N, Morita T, Hayashi M, Weight of contribution of *in vitro* chromosomal aberration assay for evaluation of pesticides: Experience of risk assessment at the Food Safety Commission of Japan, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 95, 133-134, 2018.

学会発表

1. R. E. Tennant, S. Canipa, W. Drewe, A. Cayley, S. Guesne, S. A. Stalford, R. V. Williams, K. Masumura, T. Morita, Hirose and M. Honma., Extrapolation of *in vitro* mutagenicity alerts to the *in vivo* endpoint in Derek Nexus, 10th World Congress on Alternatives and Animal use in the life sciences, 20-24 August 2017, Seattle, USA.
2. 藤田侑里香、本田大士、松村奨士、川本泰輔、森田健、松田知成、伊藤勇一、山根雅之、森田修、データサイエンスに基づいた染色体異常誘発性の高精度予測と発がん性予測への展開、第 44 回日本毒性学会、2017 年 7 月 10 ~ 12 日、横浜
3. Yurika Fujita, Hiroshi Honda, Shoji Matsumura, Taisuke Kawamoto, Takeshi Morita, Tomonari Matsuda, Yuichi Ito, Masayuki Yamane, Osamu Morita, Refinement of *in*

silico cytogenicity evaluation and development of an integrated testing strategy for carcinogenicity based on data science, The 53rd Eurotox, Bratislava, Slovakia, 2017.9.10-13.

4. 森田健、重田善之、川村智子、藤田侑里香、本田大士、本間正充、染色体異常誘発性の in silico 予測、日本環境変異原学会第 46 回大会、平成 29 年 11 月 6~7 日、東京
5. Takeshi Morita, Yoshiyuki Shigeta, Tomoko Kawamura, Yurika Fujita, Hiroshi Honda, Masamitsu Honma, Comparison of Three QSAR Models for Prediction of Chromosome Damage, 12th ICEM, Inchon, Korea, 2017.11.12-16.

6. Yurika Fujita, Hiroshi Honda, Shoji Matsumura, Takeshi Morita, Tomonari Matsuda, Masayuki Yamane, Osamu Morita, Development of new in silico cytogenicity evaluation tools and integrated testing strategy for carcinogenicity based on genotoxicity data and chemical space, 12th ICEM, Inchon, Korea, 2017.11.12-16.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 解析対象除外物質一覧

In silico モデル ^o	結果のアウトプット ^o	最終表記 ^o
^o	Inactive ^o	- ^o
Derek ^o	Certain ^o	+ ^o
^o	Plausible ^o	+ ^o
^o	Equivocal ^o	E ^o
^o	- ^o	- ^o
AWorks ^o	+ ^o	+ ^o
^o	Not Applicable ^o	NA ^o
^o	Known negative ^o	- ^o
^o	Negative ^o	- ^o
^o	Known Positive ^o	+ ^o
MCase ^o	Positive ^o	+ ^o
^o	Known marginal ^o	+ ^o
^o	Inconclusive ^o	E ^o
^o	Out of Domain ^o	NA ^o

- , Negative; + , Positive; E, Equivocal; NA, Not Applicable^o

表 2 予測性の計算方法

+	In vitro or In vivo result			
	+	+	-	Total
In silico results	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

No. of all chemicals evaluated (all) ↓

= (a+b+c+d) + E (equivocal result) + NA (Not applicable)

感受性 (Sensitivity, %) = a / (a+c)

特異性 (Specificity, %) = d / (b+d)

正確性 (Accuracy, %) = (a+d) / (a+b+c+d)

適用性 (Applicability, %) = (a+b+c+d) / all

表3 MCase の CA-CHL および CA-CHO 間の結果の統合

各結果	統合後
両者一致	一致結果
-と+での不一致	+
NA/E と -/+の不一致	該当する-/+のいずれか
E と NA の不一致	E

表4 各 in silico モデルの in vitro CA に対する予測性：全物質 (C+NC, n=440)

In silico model [No. of C/NC]	CA results	+	-	Total	E	NA	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Applica- bility (%)
Derek	+	130	21	151						
[287/105]	-	102	139	241	48	0	56.0	86.9	68.6	89.1
	Total	232	160	392						
AWorks	+	178	67	245						
[325/112]	-	85	107	192	0	3	67.7	61.5	65.2	99.3
	Total	263	174	437						
MCase	+	188	54	242						
(CA-CHL)	-	27	73	100	64	34	87.4	57.5	76.3	77.7
[263/79]	Total	215	127	342						
MCase	+	176	11	187						
(CA-CHO)	-	55	158	213	23	17	76.2	93.5	83.5	90.9
[293/107]	Total	231	169	400						
MCase	+	233	61	294						
(CA-CHL/CHO)*	-	23	113	136	4	6	91.0	64.9	80.5	97.7
[318/112]	Total	256	174	430						

C, Carcinogens; NC, Non-Carcinogens; E, Equivocal; NA, Not Applicable
 *: +/- or -/+ is considered as +, **: Accuracy (%) x Applicability (%)

表5 各 in silico モデルの in vitro CA に対する予測性：C (n=325)、NC (n=115)別

In silico model	CA results	+	-	Total	E	NA	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Applicability (%)
Carcinogens (n=325)										
Derek	+	107	16	123						
	-	77	87	164	38	0	58.2	84.5	67.6	88.3
	Total	184	103	287						
AWorks	+	145	43	188						
	-	68	69	137	0	0	68.1	61.6	65.8	100
	Total	213	112	325						
MCase (CA-CHL)	+	161	34	195						
	-	17	51	68	44	18	90.4	60.0	80.6	80.9
	Total	178	85	263						
MCase (CA-CHO)	+	145	7	152						
	-	39	102	141	19	13	78.8	93.6	98.8	90.2
	Total	184	109	293						
MCase (CA-CHL/CHO)*	+	194	39	233						
	-	13	72	85	3	4	93.7	64.9	83.7	97.8
	Total	207	111	318						
Non-Carcinogens (n=115)										
Derek	+	23	5	28						
	-	25	52	77	10	0	47.9	91.2	71.4	91.3
	Total	48	57	105						
AWorks	+	33	24	57						
	-	17	38	55	0	3	66.0	61.3	63.4	97.4
	Total	50	62	112						
MCase (CA-CHL)	+	27	20	47						
	-	10	22	32	20	16	73.0	52.4	62.0	68.7
	Total	37	42	79						
MCase (CA-CHO)	+	31	4	35						
	-	16	56	72	4	4	66.0	93.3	81.3	93.0
	Total	47	60	107						
MCase (CA-CHL/CHO)*	+	39	22	61						
	-	10	41	51	1	2	79.6	65.1	71.4	97.4
	Total	49	63	112						

*: +/- or -/+ is considered as +.

表6 MCase (MNT-mouse)の in vivo MN に対する予測性：全物質 (C+NC, n=337)

In silico model [No. of C/NC]	MN results	+	-	Total	E	NA	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Applicability (%)
MCase (MNT-mouse) [275/52]	+	113	65	178						
	-	11	86	97	39	23	91.1	57.0	72.4	81.6
	Total	124	151	275						

C, Carcinogens; NC, Non-Carcinogens; E, Equivocal; NA, Not Applicable

表7 MCase (MNT-mouse)の in vivo MN に対する予測性：C (n=266)、NC (n=71)別

In silico model	in vivo MN results	+	-	Total	E	NA	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Applicability (%)
Carcinogens (n=266)										
MCase (MNT-mouse)	+	93	52	145						
	-	11	67	78	27	16	89.4	56.3	71.7	83.8
	Total	104	119	223						
Non-Carcinogens (n=71)										
MCase (MNT-mouse)	+	20	13	33						
	-	0	19	19	12	7	100	59.4	75.0	73.2
	Total	20	32	52						

C, Carcinogens; NC, Non-Carcinogens; E, Equivocal; NA, Not Applicable

表 8 化学物質クラス一覧

#	Chemical Class	Carcinogens	Non-carcinogens	Total
1	Alcohols	5	2	7
2	Aldehydes	8	4	12
3	Alkalis, metal salts	0	3	3
4	Alkenes	8	2	10
5	Alkylating agents	20	6	26
6	Amines/Amides/Imines	15	10	25
7	Anthraquinones or quinones	3	0	3
8	Aromatic amines or amides	57	12	69
9	Aromatic nitro compounds	31	8	39
10	Azirines or aziridines	4	0	4
11	Azo compounds	21	5	26
12	Benzenes	13	2	15
13	Carbamates	7	7	14
14	Carboxylic acids	7	6	13
15	Catechols	4	2	6
16	Epoxides	11	2	13
17	Esters	2	1	3
18	Halides	18	3	21
19	Halogenated compounds	23	6	29
20	Hormones	4	0	4
21	Hydrazines	11	3	14
22	Isocyanates	3	0	3
23	Ketones	5	4	9
24	Nitriles	2	3	5
25	Nitro compounds or nitrites	4	0	4
26	N-nitro or N-nitroso compounds	24	0	24
27	Others	40	15	55
28	Phenyl compounds	3	0	3
29	Phenols	8	2	10
30	Phosphorous compounds	6	10	16
31	Phthalates	1	2	3
32	Polycyclic aromatic hydrocarbons	5	0	5
33	Polyhalogenated aromatic compounds	10	4	14
34	Quinolines	2	1	3
35	Resorcinols	1	3	4
36	Ureas	8	2	10
	Total	394	130	524

表 9 化学物質クラスとその in silico モデルによる予測性

Chemical class ^a	No. of chemicals	In vitro CA test	Positive prediction			Negative prediction			Tendency of in silico predictions
			+ / - / NTD	Derek	AWorks	MCase ^b	Derek	AWorks	
Alcohols	7	3 / 2 / 2	0	1	0	4	2	3	-
Aldehydes	12	7 / 5 / 0	5	4	3	3	2	5	ND
Alkenes	10	3 / 4 / 3	1	2	0	4	2	3	-
Alkylating agents	26	16 / 6 / 4	14	7	15	1	4	3	+
Amines/Amides/Imines	25	10 / 12 / 3	4	9	6	12	5	9	ND
Aromatic amines or amides	69	43 / 19 / 7	11	39	38	17	8	9	+
Aromatic nitro compounds	39	25 / 12 / 2	3	19	21	2	8	2	+
Azo compounds	26	7 / 12 / 7	1	5	4	12	8	2	-
Benzenes	15	6 / 7 / 2	2	4	3	6	5	6	ND
Carbamates	14	6 / 4 / 4	6	2	3	2	4	4	ND
Carboxylic acids	13	4 / 7 / 2	0	2	1	6	6	5	-
Epoxides	13	10 / 2 / 1	10	12	11	0	0	0	+
Halides	21	15 / 6 / 0	9	10	10	4	5	5	+
Halogenated compounds	29	12 / 12 / 5	7	8	5	9	7	11	ND
Hydrazines	14	4 / 4 / 6	2	2	2	2	3	2	ND
Ketones	9	6 / 3 / 0	0	2	1	3	3	3	ND
N-nitro or N-nitroso compounds	24	14 / 2 / 8	14	12	14	0	1	0	+
Phenols	10	7 / 3 / 0	3	1	3	3	3	3	ND
Phosphorous compounds	16	7 / 8 / 1	3	5	5	6	3	2	ND
Polyhalogenated aromatic compounds	14	5 / 7 / 2	1	1	1	6	2	6	-
Ureas	10	4 / 5 / 1	0	1	2	3	1	1	ND
Others	55	25 / 18 / 12	14	17	16	11	12	16	ND

+ , Positive; - , Negative; NTD, No test data; ND, Not determined;
a: Chemical classes with equal or more than 5 chemicals with in vitro CA test data
b: MCase CA-CHL/CHO

表 10 10 mM 以上で in vitro CA 陽性を示す物質の in silico 評価結果

ID	Chemical	In vitro CA	In vivo MN	In vitro CA Derek	In vitro CA Aworks	In vitro CA MCCase: CA-CHL	In vitro CA MCCase: CA-CHO	In vivo MN MCCase: MNT-mouse
C392	Hexanamide	-	-	-	-	-	+	E
C509	Nitrite, sodium	-	-	+	+	NA	+	+
C514	Nitrobenzene	-	-	-	-	+	-	-
C551	N-Nitrosodiethylamine	-	-	+	-	+	+	+
C664	Saccharin, sodium	-	-	-	+	-	-	E
C734	Trimethylphosphate	-	+	-	+	-	+	+
C744	Urethane	-	+	+	-	-	-	+
NC12	o-Anthranilic acid	-	-	-	-	+	E	-
NC20	Benzyl alcohol	-	-	-	-	-	+	-
NC124	4-Nitroanthranilic acid	-	-	E	+	+	+	-
NC144	1-Phenyl-2-thiourea	-	-	-	-	-	+	+
NC152	Resorcinol	-	+	-	-	+	+	+
No. of in silico-positive				3	4	5	8	6

図 1 各 in silico モデルの in vitro CA に対する予測性

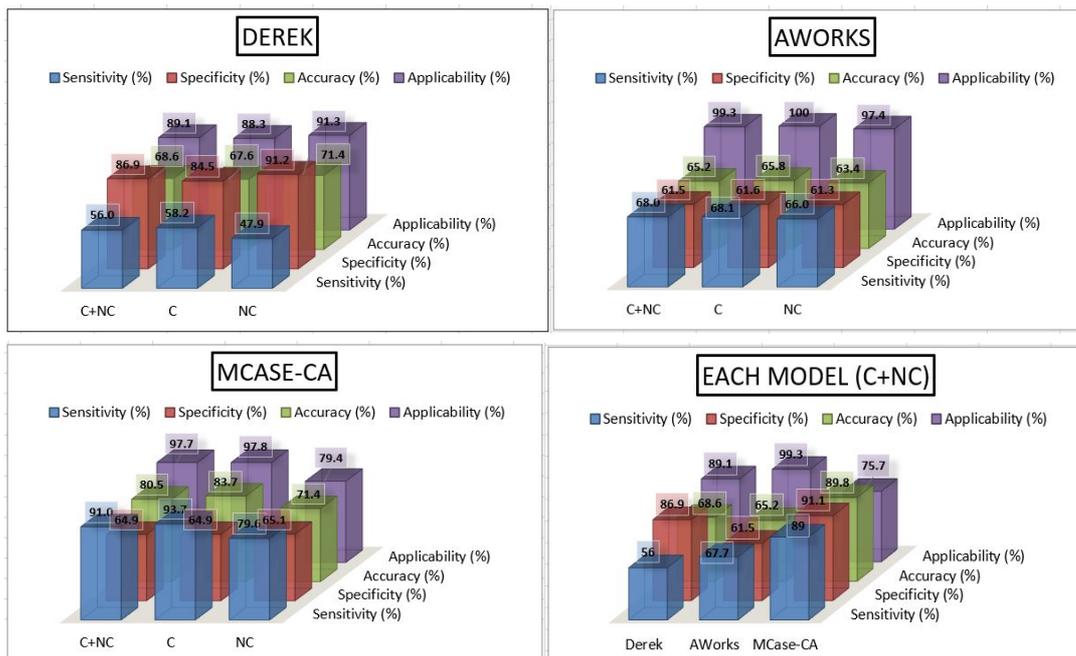
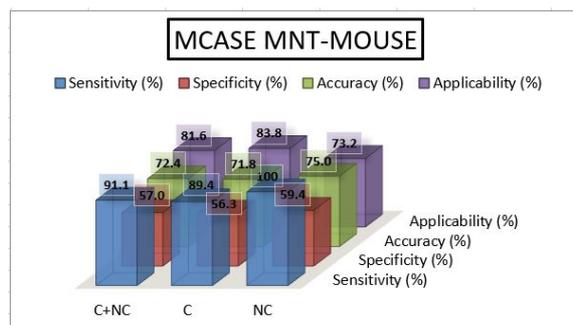


図2 MCCase (MNT-mouse)の in vivo MN に対する予測性



Appendix 1 Results of analysis from 3 in silico models for in vitro chromosomal aberrations (CA) to carcinogens

#	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (GCG 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vitro E-MN*	In vitro CA Derak	In vitro CA Averta	In vitro CA MCass: CA-CHL	In vitro CA MCass: CA-CHO	In vitro MN MCass: MNT-mouse
1	C1	Acetaldehyde	75-07-0	Aldehyde or precursor	Aldehydes	+	+	-	+	+	+	+
2	C3	Acetamide	60-35-6	Aliphatic amide	Amines/Amides/imin es	+	-	-	-	-	NA	+
3	C4	Acetaminophen	103-90-2	Phenol or precursor	Phenols	+	-	-	+	+	+	-
4	C7	N-Acetyl-2-acetylaminofluorene	6096-44-8	Aromatic hydroxylamine or ester derivative	Aromatic amines or amides	+	+	+	+	E	+	E
5	C10	2-Acetylaminofluorene	53-96-3	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	-	+	+	+	+
6	C16	Acrylamide	79-06-1	Alpha-, beta-unsaturated amide or thioamide	Amines/Amides/imin es	+	+	+	+	+	+	+
7	C17	Acrylonitrile	107-13-1	Alpha-, beta-unsaturated nitrile	Nitriles	+	-	-	+	+	+	-
8	C18	Adchomycin D	50-76-0	Alpha-, beta-unsaturated imine	Amines/Amides/imin es	+	+	-	+	+	E	+
9	C20	Aflatoxin B1	1162-85-8	Bifuranoid mycotoxin or analogue	Others	+	+	+	-	+	NA	+
10	C22	Adm	309-00-2	Alkyl halide	Halides	+	-	-	+	-	-	-
11	C23	Allyl glycidyl ether	105-60-3	Glycidyl ether, amine, ester or derivative	Epoxydes	+	+	+	+	+	+	-
12	C24	Allyl isocyanate	57-06-7	Isocyanate or both isocyanate	Isocyanates	+	-	-	-	NA	+	NA
13	C25	Allyl isocyanate	2035-39-4	Alkene	Alkenes	+	+	-	-	+	+	-
14	C30	4-Aminobenzene	60-09-3	Aromatic amine compound	Azo compounds	+	+	-	+	+	+	+
15	C31	4-Aminobiphenyl	92-67-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	-	+	+	+	+
16	C33	1-Amino-2,4-dibromanthraquinone	81-49-2	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	+	-	+
17	C34	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ)	77094-11-2	Quinoline	Quinolines	+	-	-	+	+	+	-
18	C35	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQx)	77500-04-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	-	+	+	+	E
19	C36	3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrro[4,3-b]indole sulfate (Trp-P-1 sulfate)	68908-54-8	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	+	+	E	+	NA
20	C38	2-Aminopyrido[1,2-a:3'7'-d]imidazole (Glu-P-2)	67730-10-3	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	+	+	+	E	NA
21	C39	3-Amino-4-ethoxycarbonyl	17026-81-2	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	+	-	E
22	C40	3-Amino-9-ethylcarbazole HCl	6106-87-3	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	+	-	+
23	C43	2-Amino-6-methylpyrido[1,2-a:3'7'-d]imidazole (Glu-P-1)	67730-11-4	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	+	+	+	E	NA
24	C44	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ)	76180-96-6	Quinoline	Quinolines	+	-	-	+	+	+	-
25	C46	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-f]pyridine hydrochloride (PhIP HCl)	-	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	-	+	+	E	+
26	C47	3-Amino-1-methyl-5H-pyrro[4,3-b]indole sulfate (Trp-P-2 sulfate)	72264-88-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	+	+	+	-	NA
27	C52	2-Amino-4-nitrophenol	99-67-0	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	-
28	C53	2-Amino-5-nitrophenol	121-85-0	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	+
29	C54	4-Amino-2-nitrophenol	119-34-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	+
30	C56	2-Amino-6-nitrothiazole	121-66-4	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	+
31	C57	2-Amino-9H-pyrro[2,3-b]indole (A-alpha-C)	26148-88-8	Secondary amine	Amines/Amides/imin es	+	+	+	+	+	E	NA
32	C58	3-Amino-1,2,4-triazole (Amitrole)	61-42-6	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	+	NA	NA
33	C59	11-Aminoundecanoic acid	2432-99-7	Short chain aliphatic carboxylic acid	Carboxylic acids	-	-	-	-	-	-	-
34	C60	1-Amyl-1-nitrosourea	10589-74-9	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	+	+	+	+	+
35	C62	Aniline HCl	142-04-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	E	+	+	E	+
36	C63	o-Anilidine HCl	134-29-2	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	-
37	C65	Ancoline HCl	61-94-9	Alpha-, beta-unsaturated ester or thioester (class II or III)	Esters	+	+	+	+	-	+	+
38	C66	Anthracic acid	313-67-7	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	-	+	+	+
39	C70	Atrazine	1912-24-9	Potentially labile halogen	Halogenated compounds	+	+	-	-	-	-	NA
40	C71	Auramine O	2485-27-2	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	-	E	+	E
41	C72	5-Azacytidine	302-67-2	Nucleic acid derivative	Others	+	+	+	+	E	+	+
42	C73	Azaserine	115-02-6	Azo or azoxy compound	Azo compounds	+	+	-	-	E	E	NA
43	C74	Azathioprine	448-85-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	+	+	+	E	+	+
44	C75	Azobenzene	103-33-3	Aromatic azo compound	Azo compounds	+	+	-	+	+	E	E
45	C79	Barbitol, sodium	144-02-6	(Thio)urea	Ureas	+	-	-	+	E	+	NA
46	C81	Benzal	17824-28-2	Benzothiazole	Others	+	+	-	+	+	E	+
47	C82	Benzaldehyde	100-52-7	Aldehyde or precursor	Aldehydes	+	+	-	+	+	-	+
48	C83	Benz[a]anthracene	56-85-3	Bay-region polycyclic aromatic hydrocarbon	Polycyclic aromatic hydrocarbons	+	+	-	+	+	-	+
49	C84	Benzene	71-43-2	Benzene	Benzenes	+	+	-	-	-	-	+
50	C85	Benzidine	92-67-6	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	-	+	+	+	+
51	C87	Benzo[<i>a</i>]uran	271-69-6	Benzene	Benzenes	-	-	-	+	+	-	+
52	C88	Benzo[<i>a</i>]pyrene	50-32-6	Bay-region polycyclic aromatic hydrocarbon	Polycyclic aromatic hydrocarbons	+	+	-	+	+	-	+
53	C89	1,4-Benzquinone	105-61-4	Quinone	Anthraquinones or quinones	+	+	+	+	-	-	-
54	C92	Benzyl acetate	142-11-4	Benzene	Benzenes	-	-	-	-	-	-	E
55	C93	Benzyl chloride	100-44-7	Alkylating agent	Alkylating agents	+	-	+	-	+	+	-
56	C94	o-Benzyl-p-chlorophenol	120-32-1	Phenol or precursor	Phenols	-	-	-	-	E	-	-
57	C96	2-Biphenylamine HCl	2185-82-4	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	-	+	+	-
58	C97	2,2-Dibromomethyl-1,3-propanediol, technical grade	3296-90-0	Halocalkane	Halogenated compounds	+	+	+	+	+	+	-
59	C98	Di(2-chloro-1-methyl)ether, technical grade	103-60-1	Alkylating agent	Alkylating agents	+	+	-	+	+	+	-
60	C103	Di(2,3-dibromopropyl)phosphate, magnesium salt	36711-31-6	vic-Dihalide	Halides	+	+	+	+	+	E	E
61	C107	Bromate, potassium	7756-01-2	Bromate	Others	+	+	+	+	NA	NA	NA

#	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (CGT 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vivo E-MN*	In vitro CA Derek	In vitro CA Auroto	In vitro CA MCase: CA-GHL	In vitro CA MCase: CA-CHO	In vitro MN MCase: MNT-mouse
62	C106	Bromocriptine mesylate	22260-81-1	Halogenated silone	Halogenated compounds	*	-	-	-	*	E	E
63	C109	Bromodichloromethane	75-27-4	Halogenated methane	Halogenated compounds	*	-	*	*	*	-	-
64	C110	Bromoethane	74-96-4	Alkylating agent	Alkylating agents	-	-	*	*	*	-	NA
65	C114	1,3-Substane	105-99-0	Alkene	Alkenes	-	*	-	-	-	-	*
66	C115	tert-Butyl alcohol	75-65-0	Alcohol	Alcohols	-	-	-	-	-	-	-
67	C116	Butylated hydroxytoluene	25013-16-5	4-Alkylphenol	Phenols	*	-	-	-	-	*	*
68	C117	Butylated hydroxytoluene	125-37-0	Benzene	Benzenes	-	-	-	-	-	-	*
69	C118	Butylparaldehyde	85-69-7	Phthalate	Phthalates	-	-	-	-	-	-	*
70	C122	N-o-Butyl-N-nitrosourea	869-01-2	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	*	-	*	*	*	*	*
71	C123	beta-Butyrolactone	3095-90-0	Beta-lactone	Others	-	*	-	-	NA	E	NA
72	C126	Caffeic acid	331-39-6	Catechol or precursor	Catechols	*	-	-	-	-	-	*
73	C130	Caprocin	404-05-1	Catechol or precursor	Catechols	-	-	-	-	-	-	*
74	C131	Captafol	2425-06-1	Potentially labile halogen	Halogenated compounds	*	-	*	*	*	E	E
75	C132	Capten	133-06-2	Potentially labile halogen	Halogenated compounds	*	*	*	*	*	*	*
76	C133	Carbamyl hydrazine HCl	563-41-7	Hydrazine or monoacyl- or monoalkylhydrazine	Hydrazines	-	-	*	-	E	NA	*
77	C136	Carbamyl	63-26-2	(Thio)acetamide	Carbamates	*	*	*	*	*	*	*
78	C137	Carbon tetrachloride	56-23-6	Halogenated methane	Halogenated compounds	-	-	E	-	-	-	*
79	C138	Carbonylmethylnitrosourea	60391-60-6	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	*	-	*	*	*	*	*
80	C140	Catechol	120-80-9	Catechol or precursor	Catechols	*	*	*	*	*	-	-
81	C141	Cetonal hydrate	302-17-0	Aldehyde or precursor	Aldehydes	*	*	-	-	NA	-	*
82	C142	Chloramben	133-90-4	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	*	-	*	*	*	*	*
83	C143	Chlorobutyl	305-03-3	Alkylating agent	Alkylating agents	*	*	*	-	*	*	*
84	C145	Chloride, analytical grade	57-74-9	Allyl halide	Halides	-	-	-	-	-	-	*
85	C146	Chloric acid	115-28-6	Allyl halide	Halides	*	-	-	-	-	-	*
86	C147	Chlorinated paraffin, C12	108171-26-2	Wax	Others	*	*	-	-	*	E	NA
87	C149	Chlorophazine	494-03-1	Alkylating agent	Alkylating agents	*	*	*	*	*	*	*
88	C152	p-Chloroaniline HCl	20265-96-7	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	*	-	*	*	*	*
89	C153	Chlorobenzene	108-90-7	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	*	-	-	-	-	-	*
90	C154	Chlorobenzofate	510-15-6	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	-	-	*	*	E	-	*
91	C155	Chlorobromomethane	124-45-1	Halogenated methane	Halogenated compounds	*	-	*	*	*	-	-
92	C157	Chloroethane	75-00-3	Alkylating agent	Alkylating agents	-	-	*	-	-	E	NA
93	C160	Chloroform	67-66-3	Halogenated methane	Halogenated compounds	-	-	E	-	E	-	*
94	C162	3-Chloro-2-methylpropene, technical grade	563-47-3	Allyl halide	Halides	*	-	*	*	*	*	-
95	C163	3-Chloromethylpyridine HCl	6959-66-4	Alkylating agent	Alkylating agents	*	*	*	*	*	*	*
96	C165	1-Chloro-4-nitrobenzene	100-00-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	*	*	E	*	*	*	E
97	C166	3-(p-Chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (AKA monuron)	150-65-6	(Thio)urea	Ureas	*	*	*	*	*	*	*
98	C167	4-Chloro-N-phenylacetamide	5131-60-2	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	*	-	-	*	*	*	E
99	C168	4-Chloro-N-phenylacetamide	95-63-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	*	*	-	*	*	*	*
100	C172	Chloroethanol	1097-65-6	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	*	-	-	-	-	*	-
101	C173	5-Chloro-o-toluidine	95-79-4	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	*	*	*	-	-
102	C179	Chlorpromazine hydrochloride	69-09-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	*	*	-	-	-	-
103	C180	Chrysozin	81-85-0	Hydroxylated anthraquinone or precursor	Anthraquinones or quinones	*	*	-	*	*	*	-
104	C181	C.I. Acid orange 3	6373-74-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	*	-	E	-	*	*	E
105	C183	C.I. Acid red 114	6459-94-5	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	*	*	*
106	C184	C.I. Basic red 9 (pararosaniline HCl)	569-61-9	Alpha-, beta-unsaturated imine	Amines/Amines/imines	-	-	-	*	*	*	*
107	C185	C.I. Direct black 38	1937-37-7	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	*	-	-	*	-	*
108	C186	C.I. Direct blue 6	2602-66-2	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	E	-	E
109	C187	C.I. Direct blue 14 (Thyran blue)	72-67-1	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	-	-	E
110	C188	C.I. Direct blue 15	2429-74-5	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	*	-	*
111	C189	C.I. Direct blue 216	26437-37-6	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	*	-	*
112	C190	C.I. Direct brown 95	16071-86-6	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	*	-	E
113	C191	C.I. Disperse blue 1	2475-65-8	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	*	-	-	*	*	*	E
114	C192	C.I. Disperse orange 2 (1-amino-3-methyl-anthraquinone)	62-28-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	*	-	*	*	*	*	E
115	C193	C.I. Disperse yellow 3	2832-60-8	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	*	*	*	*
116	C194	Dimethyl anthranilate	67-29-6	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	-	-	-	*
117	C195	C.I. Pigment red 3	2425-85-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	-	*	-	*
118	C196	Diprotionol	52214-04-3	Gem-dihalide	Halides	*	-	-	*	*	NA	NA
119	C197	C.I. Solvent yellow 3 (p-Aminocarbonylurea)	97-56-3	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	*	-	*	*	*	*
120	C198	C.I. Solvent yellow 14	642-07-9	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	*	-	*	*	*	*
121	C200	C.I. Vat yellow 4	128-65-6	(Diary) ketone	Ketones	-	-	-	-	E	-	E
122	C202	Disulfone	637-07-0	Fluorene	Others	*	-	-	*	*	*	E
123	C206	Coumarin	91-64-6	Coumarin	Others	*	-	-	*	*	*	E
124	C207	m-Cresidine	102-60-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	*	-	-	*	*	*	*
125	C208	p-Cresidine	120-71-6	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	*	*	-	*
126	C210	Cupferon	135-20-6	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	*	-	*	-	*	*	*
127	C214	Cyclophosphamide monophosphate	6055-19-2	Alkylating agent	Alkylating agents	*	*	*	*	*	*	*
128	C215	Cylocosin A	56895-13-3	Macrolactone	Others	-	-	-	-	E	-	*
129	C216	Cyrombers	21739-91-3	Halogenated silone	Halogenated compounds	*	-	E	-	NA	*	*
130	C217	D&G Red 9	5182-02-1	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	*	-	*	*	-	*
131	C218	D&G Yellow 11 (AKA C.I. Solvent Yellow 33)	8003-22-3	Substituted vinyl ketone	Ketones	*	-	-	*	*	*	*
132	C220	p,p'-DDE	72-85-9	Halogenated silone	Halogenated compounds	*	-	-	-	-	-	*
133	C222	Dicarbazine	4342-03-4	Aryldialylhydrazine	Others	-	*	-	-	*	*	E
134	C223	Dibromozinc	1596-54-5	Mono- or di-alkylhydrazine	Hydrazines	-	-	*	-	-	-	*

#	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (DGX 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vivo E-AM*	In vitro CA Deriv.	In vitro CA Aestria	In vitro CA MCase: CA-CHL	In vitro CA MCase: CA-CHO	In vitro MN MCase: MNT-mouse
135	C234	Danthron	117-10-2	Hydroxylated anthraquinone or precursor	Anthraquinones or quinones	+	-	+	-	E	+	-
136	C235	Deabromodiphenyl oxide	1163-19-8	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	-	+	-	+	-	-	-
137	C236	2,4-Diaminotoluene sulphate	39156-41-7	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	E
138	C237	2,4-Diaminophenol 2HCl	137-09-7	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	+	+	E
139	C238	2,4-Diaminotoluene	96-60-7	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	-
140	C240	Dacapan	439-148	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	+	-	-	E	-	+
141	C242	DBerzo(a)anthracene	53-70-3	Bay-region polycyclic aromatic hydrocarbon	Polycyclic aromatic hydrocarbons	-	+	+	+	+	-	+
142	C244	1,2-Dibromo-3-chlorobenzene	96-12-8	vic-Dihalide	Halides	+	+	+	+	+	+	-
143	C246	1,2-Dibromobenzene	106-93-4	vic-Dihalide	Halides	+	-	+	+	+	+	+
144	C247	Dibromomethyl	469-41-8	Alkylating agent	Alkylating agents	+	+	+	-	+	+	+
145	C250	1,3-Dibutyl-N-nitrosourea	56954-82-8	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	+	+	+	+	+
146	C251	Dichloroacetic acid	79-43-6	Gem-Dihalide	Halides	+	-	-	-	-	-	-
147	C253	1,4-Dichlorobenzene	106-46-7	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	-	-	-	-	-	-	-
148	C257	1,2-Dichloroethane	107-06-2	vic-Dihalide	Halides	+	-	-	-	+	+	-
149	C258	Dichloromethane	75-09-2	Halogenated methane	Halogenated compounds	+	-	E	+	+	+	-
150	C259	2,6-Dichloro-p-phenylenediamine	609-20-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	E
151	C260	1,2-Dichlorobenzene	78-47-6	vic-Dihalide	Halides	+	-	+	-	+	+	NA
152	C261	1,3-Dichloropropene (AKA Telone II)	542-75-6	Allyl halide	Halides	-	-	+	+	+	+	+
153	C262	Dichlorvos	62-73-7	Allyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorus compounds	+	-	+	+	+	+	-
154	C263	Diochol	115-32-2	Di- to poly-halogenated alkane or cycloalkane	Halogenated compounds	-	-	-	-	-	-	-
155	C264	Dieldrin	60-87-1	Epoxyde	Epoxydes	+	+	-	+	-	-	+
156	C265	Dihexamidine	111-40-2	Secondary amine	Amines/Amides/imin es	-	-	-	-	-	-	-
157	C266	Di(2-ethylhexyl)adipate	103-23-1	2-Alkylalkane carboxylic acid or precursor	Carboxylic acids	-	-	-	-	-	-	-
158	C269	Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-61-7	2-Alkylalkane carboxylic acid or precursor	Carboxylic acids	-	-	-	-	-	-	+
159	C271	Dihydrodibenzof	56-63-1	4,4'-Dihydroxydiphenyl- ethane or -ethane	Phenyl compounds	+	-	-	-	+	+	+
160	C272	Dihydrodibenzof diisopropylate	132-82-3	Phenyl ester	Phenyl compounds	-	-	-	-	E	-	E
161	C273	N,N-Dimethyl-2-thiourea	105-85-6	(Thio)urea	Ureas	-	-	-	-	-	-	+
162	C275	Diglycidyl neocinol ether, technical grade	101-95-6	Glycidyl ether, amine, ester or acide	Epoxydes	+	-	-	-	-	-	+
163	C277	3,4-Dihydrocumarin	119-64-6	Phenyl ester	Phenyl compounds	-	+	-	-	E	-	-
164	C281	1,2-Dihydro-2,2,4,4-tetramethylquinoline	147-47-7	Secondary amine	Amines/Amides/imin es	-	-	-	+	NA	-	NA
165	C282	Dimethoxane	825-00-2	Aldehyde or precursor	Aldehydes	+	-	+	-	-	-	E
166	C284	3,7-Dimethoxyberzidine-4,4-dioxyante	91-40-0	Isocyanate or isothiocyanate	Isocyanates	+	+	+	+	+	+	+
167	C285	3,7-Dimethoxyberzidine 2HCl	20325-40-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	+	E	+
168	C287	N,N-Dimethyl-4-aminoazobenzene	60-11-7	Aromatic azo compound	Azo compounds	+	-	-	+	E	+	+
169	C291	N,N-Dimethylcitra	121-69-7	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	+
170	C292	7,12-Dimethylberzj)anthracene	57-97-6	Bay-region polycyclic aromatic hydrocarbon	Polycyclic aromatic hydrocarbons	+	+	+	-	+	+	+
171	C293	3,7-Dimethylberzidine	119-93-7	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	E
172	C295	Dimethylacetamid chloride	79-44-7	Carbonylic acid halide	Carboxylic acids	+	-	-	+	E	+	+
173	C296	1,1-Dimethylhydrazine	57-14-7	Mono- or di-alkylhydrazine	Hydrazines	+	+	-	+	+	+	NA
174	C297	1,2-Dimethylhydrazine 2HCl	308-37-6	Mono- or di-alkylhydrazine	Hydrazines	+	+	+	+	+	+	NA
175	C299	Dimethyl hydrogen phosphite	869-85-9	Phosphorus compound	Phosphorus compounds	+	+	-	+	NA	+	+
176	C305	Dimethylvinyl chloride	513-37-1	Halogenated alkene	Halogenated compounds	-	+	-	+	-	-	+
177	C309	2,4-Dinitrotoluene	121-14-2	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	-	+	-	-
178	C310	2,6-Dinitrotoluene	805-20-2	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	-	E	-	-
179	C312	1,4-Dioxane	123-91-1	Dioxane	Others	-	-	-	+	-	-	+
180	C314	5,5-Dibenzobicyclohexan	57-41-0	Macellaneous	Others	-	-	-	+	-	-	E
181	C316	Doylemine succinate	562-10-7	Short chain aliphatic carboxylic acid	Carboxylic acids	-	-	-	+	E	-	-
182	C319	Enchlorbacin	105-89-8	Epoxyde	Epoxydes	+	-	+	+	+	+	+
183	C320	1,2-Epoxybutane	105-85-7	Epoxyde	Epoxydes	+	-	-	+	+	+	+
184	C321	17-B-Estradiol	50-28-2	Hormones	Hormones	-	-	-	-	-	-	+
185	C323	Estrone	140-67-0	Allylbenzene, propargyl- benzene or 1'-hydroxy derivatives	Benzenes	-	-	-	+	-	E	-
186	C324	Ethyl estradiol	57-43-6	Estradiol or analogue	Hormones	-	-	-	-	-	-	-
187	C325	Ethionamide	535-33-4	Thioamide	Amines/Amides/imin es	+	-	+	+	+	+	+
188	C327	DL-Ethionine	67-21-0	Amino acid or derivative	Others	-	-	-	-	NA	-	+
189	C328	o-Ethoxybenzamide	935-73-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	-	+
190	C329	Ethyl acrylate	140-85-6	Alpha-, beta-unsaturated ester or thioester (class I or II)	Esters	+	-	+	+	+	+	+
191	C330	Ethyl alcohol	66-17-6	Alcohol	Alcohols	-	-	-	-	NA	NA	NA
192	C333	Ethylbenzene	100-61-4	Benzene	Benzenes	-	-	-	-	-	-	-
193	C334	Ethylene glycol monobutyl ether	111-15-2	Alcohol	Alcohols	-	-	-	-	-	-	-
194	C336	Ethylene oxide	75-21-8	Epoxyde	Epoxydes	-	+	+	+	+	+	E
195	C337	N,N-Ethylethiourea	96-46-7	(Thio)urea	Ureas	-	-	-	-	+	+	+
196	C340	Ethyl methaneulphate	63-80-0	Alkylating agent	Alkylating agents	+	+	+	+	+	+	+
197	C341	N-Ethyl-N-nitro-N-nitrosourea	63985-23-4	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	+	+	+	+	+
198	C345	1-Ethyl-N-nitrosourea	759-73-9	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	+	+	+	+	+
199	C349	FD&C Red 1 (Pontauk 3R)	3954-29-8	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	+	-	E
200	C359	5-Fluorouracil	51-21-6	Substituted pyrimidine or purine nucleoside	Others	+	+	+	+	+	+	+
201	C360	Fluvestin	93267-64-1	Alkene	Alkenes	-	-	-	-	+	E	E
202	C361	Formaldehyde	50-00-0	Aldehyde or precursor	Aldehydes	+	-	-	+	+	+	+
203	C366	Fumonisin B1	116395-83-0	Short chain aliphatic carboxylic acid	Carboxylic acids	+	+	-	-	-	-	+
204	C367	Furan	110-00-9	Furan	Others	+	+	+	+	NA	+	-
205	C368	Furfural	98-01-1	Aldehyde or precursor	Aldehydes	+	+	+	+	+	+	-

#	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (CIGX 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vitro E-ANN*	In vitro CA Derek	In vitro CA Avertis	In vitro CA MCase: CA-CHL	In vitro CA MCase: CA-CHO	In vitro MN MCase: MNT-mouse
206	C369	Furfuryl Alcohol	96-00-0	Alcohol	Alcohols	+	-	+	+	+	+	NA
207	C370	Furosemide	54-31-9	Aryl sulfonamide	Amines/Amides/Amides	+	-	-	+	+	+	NA
208	C371	Furylfuramide (AF-2)	3690-53-7	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	+	E	+	+	+	+
209	C373	Gentian violet (AKA Hexamethyl-p-rosaniline chloride)	548-63-9	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	+	-	E	-	E
210	C378	Glycidol	585-53-5	Epoxyde	Epoxydes	+	+	+	+	+	+	+
211	C377	Glyoxal	128-07-0	Substituted vinyl ketone	Ketones	+	-	E	+	+	-	+
212	C378	Haloperidol	52-06-0	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	+	+	-	-	E	-	+
213	C379	HC Blue 1 (Impure and purified)	2794-94-3	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	NA
214	C382	Heptachlor	76-44-8	Allyl halide	Halides	+	-	+	+	+	NA	+
215	C384	Hexachlorobutadiene	87-66-3	Halogenated alkene	Halogenated compounds	-	-	-	-	-	-	-
216	C388	gamma-1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane (AKA Lindane)	50-09-9	Alkylating agent	Alkylating agents	-	-	-	-	-	-	-
217	C389	Hexachlorobutene	87-72-1	Di- to poly-halogenated alkene or cycloalkene	Halogenated compounds	-	-	-	-	-	-	-
218	C392	Hexanamide	628-02-4	Aliphatic amide	Amines/Amides/Amides	-	-	-	-	-	+	E
219	C396	Hydrazine sulphate	10034-93-2	Hydrazine or monoacyl- or monoalkylphosphoryl-hydrazine	Hydrazines	+	+	+	+	+	-	-
220	C400	Hydroquinone	123-65-7	Hydrazine or precursor	Hydrazines	+	-	-	-	NA	+	NA
221	C401	Hydrogen Peroxide	7722-84-1	Hydroperoxide	Others	+	-	-	-	-	-	-
222	C402	Hydroquinone	123-65-7	Phenol or precursor	Phenols	+	+	+	-	+	+	+
223	C403	N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene	53-95-2	Aromatic hydroxylamine or ester derivative	Aromatic amines or amides	+	+	+	+	E	+	NA
224	C416	ICRF 159	21416-67-5	Piperazine	Others	-	+	-	-	E	-	+
225	C418	Isobutyl alcohol	5034-32-9	Aliphatic alcohol	Aliphatic alcohols	-	-	-	-	NA	NA	E
226	C419	Isobutyl nitrite	542-66-3	Allyl nitrite, nitrous acid or nitrite salt	Nitro compounds or nitrites	+	+	-	-	NA	+	+
227	C421	Isonic acid	54-85-3	Hydrazine or monoacyl- or monoalkylphosphoryl-hydrazine	Hydrazines	+	+	+	+	E	E	+
228	C423	Isoflurone	76-69-1	Substituted vinyl ketone	Ketones	-	-	E	-	-	-	E
229	C426	Isonone	76-72-6	Alkene	Alkenes	-	+	-	-	E	-	+
230	C428	Isonone (AKA Chlorozone)	143-60-0	Gem-dihalide	Halides	-	-	-	-	NA	-	NA
231	C427	Isocarbazine	303-34-4	Pyroline ester, pyrroline N-oxide ester, pyrrole ester or pyrrole alcohol	Others	+	+	+	-	E	+	+
232	C431	O-Isonone	5989-27-5	Alkene	Alkenes	-	-	-	-	E	-	E
233	C433	Malonaldhyde sodium salt	24362-04-5	Alpha-, beta-unsaturated aldehyde	Aldehydes	-	-	+	+	-	-	-
234	C434	Manganese ethylenebis(carbamate)	12427-38-2	Thiourea disulphide or thiocarbamate	Carbamates	+	+	-	-	NA	NA	+
235	C436	Melanine	105-75-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	-	+	-	-
236	C437	Melphalan	146-02-3	Aliphatic amide	Aliphatic amides	+	+	+	+	+	+	+
237	C438	2-Mercapto-1,2,4-benzothiazole	146-30-4	Aromatic azo compound	Azo compounds	+	-	-	-	+	+	-
238	C441	Melphal	57-39-6	Adizine or adizidine	Adizines or adizidines	-	+	+	+	NA	NA	+
239	C442	Methapyline hydrochloride	135-23-9	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	-	E	+	-
240	C443	Methadethion	990-37-8	Allyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	-	-	-	+	+	+	+
241	C444	Methicillin	60-56-0	(Thio)lactam	Lactams	+	-	-	+	E	NA	+
242	C448	4-Methylphenol (AKA Hydroquinone monomethyl ether)	150-76-6	Phenol or precursor	Phenols	+	+	-	-	E	-	-
243	C449	2-Methylsuccinonitrile	295-61-7	Piperidine	Others	+	+	+	+	+	+	+
244	C451	Methylazobenzene	592-62-1	Azo or azoxy compound	Azo compounds	+	-	-	-	+	NA	E
245	C452	alpha-Methylbenzyl alcohol	96-05-1	Alcohol	Alcohols	+	-	-	-	-	+	-
246	C454	Methyl tert-butyl ether	1634-04-1	Ether	Others	-	-	-	-	-	-	-
247	C455	Methyl carbamate	593-85-0	(Thio)carbamate	Carbamates	-	-	-	-	+	-	-
248	C456	4-Methylcatechol	482-85-6	Catechol or precursor	Catechols	+	+	+	+	+	-	+
249	C457	3-Methylcholanthrene	56-49-5	Bay-region polycyclic aromatic hydrocarbon	Polycyclic aromatic hydrocarbons	+	+	+	-	+	-	+
250	C458	Methyl clenbutate	21340-68-1	Fibrate	Others	-	-	-	-	+	-	E
251	C460	3-Methyl-4-dimethylaminocyclohexane	66-20-1	Aromatic azo compound	Azo compounds	+	-	-	-	+	E	+
252	C462	4,4-Methylenebis(2-chloroaniline)	101-14-4	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	+
253	C464	4,4-Methylenebis(N,N-dimethylaniline)	101-61-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	+	+	E	-	-
254	C466	4,4-Methylene dianiline 2HCl	13562-44-8	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	E	+	+	+	+
255	C467	Methylugenol	93-15-2	Allylbenzene, propargyl- benzene or 1-hydroxy derivatives	Benzenes	-	-	E	+	E	-	E
256	C472	Methyl methanesulphonate	66-77-3	Aliphatic amide	Aliphatic amides	+	+	+	+	+	+	NA
257	C474	2-Methyl-1-nitroanthraquinone	129-15-7	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	E
258	C476	N-Methyl-N-nitro-N-nitrosourea	70-25-7	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	+	+	+	+	+
259	C478	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-pyrazole (NNC)	64061-91-4	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	-	-	-	+	+	+
260	C484	Methylnitrosocyanamide	33968-17-6	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	+	+	+	+	+
261	C487	N-Methylglycyamide	924-62-5	N-methylol derivative	Others	+	-	-	-	+	+	+
262	C488	Methylphenolate HCl	295-59-9	Secondary amine	Amines/Amides/Amides	+	-	-	+	+	+	-
263	C489	Metronidazole	443-45-1	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	E	NA	+
264	C492	Mitomycin C	50-07-7	Adizine or adizidine	Adizines or adizidines	+	+	+	+	+	+	+
265	C494	Monoacetyl hydrazine	1056-57-1	Hydrazine or monoacyl- or monoalkylphosphoryl-hydrazine	Hydrazines	+	+	+	-	E	NA	+
266	C496	Monocrotaline	315-22-0	Pyroline ester, pyrroline N-oxide ester, pyrrole ester or pyrrole alcohol	Others	+	+	E	+	E	+	+
267	C496	Naloxoph	3771-19-5	Benzene	Benzenes	-	-	-	-	+	E	-
268	C499	Nalidixic acid	309-05-2	Quinolone-3-carboxylic acid or naphthyridine analogue	Carboxylic acids	+	-	-	-	+	-	-
269	C500	Naphthalene	91-20-3	Benzene	Benzenes	+	-	-	+	+	+	+
270	C501	1,5-Naphthalenediamine	2243-82-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	-
271	C502	2-Naphthylamine	91-69-8	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	-	+	+	+

#	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (DQX 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vivo E-MN*	In vitro CA Derek	In vitro CA Astorla	In vitro CA MCase: CA-CHL	In vitro CA MCase: CA-CHO	In vitro MN MCase: MNT-mouse
272	C505	Nitrazide	139-94-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	+	E	-	+
273	C506	Nitrotrifluoroacetic acid	139-13-9	Nitrite	Nitrites	-	-	-	-	-	-	-
274	C509	Nitric acidum	7632-00-0	Alkyl nitrite, nitrous acid or nitrite salt	Nitro compounds or nitrites	-	-	+	+	NA	+	+
275	C510	5-Nitroacenaphthene	602-67-9	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	-	+	E	-
276	C512	5-Nitro-o-enolidine	99-89-2	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	+	+	-	-
277	C513	o-Nitroaniline	91-23-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	-	+	-	-
278	C514	Nitrobenzene	98-96-3	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	-	-	+	-	-
279	C515	6-Nitrobenzimidazole	94-82-0	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	-
280	C516	p-Nitrobenzoic acid	62-23-7	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	+	+	+	+	E
281	C518	Nitrofen	1636-75-5	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	-	+	-	E
282	C519	5-Nitro-2-furandehyde semicarbazone (AKA Nitrofurazone)	59-87-0	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	+
283	C520	1-(5-Nitrofururylidene)amino)hydantoin (AKA Nitrofurantoin)	67-30-9	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	+
284	C530	Nitrogen mustard	51-75-2	Alkylating agent	Alkylating agents	+	+	-	-	+	+	+
285	C533	Nitromethane	75-52-6	Aliphatic nitro	Nitro compounds or nitrites	+	-	-	-	E	-	-
286	C534	2-Nitro-p-phenylenediamine	5307-14-2	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	E
287	C535	1-Nitropyrene	5522-43-0	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	+	+	+	+	-	+
288	C537	4-Nitroquinoline-N-oxide	56-87-6	Aromatic N-oxide or N-hydroxy butomer	Others	+	+	E	+	+	+	+
289	C549	Nitroacetylbutylamine	924-16-3	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	-	-	+	+	+
290	C550	N-Nitrosodiphenylamine	1116-54-7	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	+	-	+	+	+
291	C551	N-Nitrosodiphenylamine (diethylnitrosamine)	55-18-6	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	+	-	+	+	+
292	C556	N-Nitrosodimethylamine (dimethylnitrosamine)	62-75-9	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	-	-	+	+	+
293	C558	N-Nitrosodiphenylamine	86-30-6	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	+	+	+	+	+
294	C559	p-Nitrosodiphenylamine	156-10-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	+	E	+	+	+
295	C560	N-Nitrosodipropylamine	621-64-7	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	+	+	+	+	+
296	C563	Nitrosodimethylamine	10596-96-6	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	+	+	+	+	+
297	C567	N-Nitroso-N-methylurea	66493-5	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	+	+	+	+	+
298	C568	N-Nitrosomorpholine	59-89-2	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	+	+	+	+	+
299	C563	N-Nitrosopiperidine	105-75-4	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	+	-	+	+	+
300	C564	N-Nitrosopyrrolidine	905-65-2	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	+	-	+	+	+
301	C602	5-Nitro-o-toluidine	99-85-8	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	+	-	E	+	+	+	-
302	C604	Oxazolin A	303-47-9	Macrolactone	Others	-	-	-	-	-	-	-
303	C605	Oxazepam	604-75-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	-	NA	-	-
304	C606	4,4'-Oxydianiline	101-80-4	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	-	+	+	+	+
305	C609	N-Oxydethylene bis(carbamyl-N-oxydethylene sulphamide)	13752-61-7	Thiol or thiol exchange agent	Others	+	-	+	+	NA	+	+
306	C610	Oxymetholone	434-07-1	Alpha-, beta-unsaturated aldehyde	Aldehydes	-	-	+	-	NA	-	NA
307	C611	Ozone	10028-15-6	Macrolactone	Others	+	-	-	+	NA	NA	NA
308	C612	Pentachloroantone	1625-21-4	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	-	-	-	+	-	-	-
309	C613	Pentachloroethane	78-01-7	Gem-dihalide	Halides	+	-	-	-	+	-	-
310	C614	Pentachloronitrobenzene	62-46-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	+	E	-	-
311	C617	Pentaerlenne	60102-37-6	Epoxide	Epoxides	+	-	E	+	+	+	+
312	C618	Phenacetin	62-44-2	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	-	+	+	-	+
313	C620	Phenazopyridine HCl	136-40-3	Aromatic azo compound	Azo compounds	+	+	-	-	+	+	+
314	C622	Phenobarbital	50-06-6	(Thio)urea	Ureas	+	+	-	-	+	+	+
315	C624	Phenolphthalein	77-49-6	Phenol or precursor	Phenols	+	+	-	-	+	+	+
316	C625	Phenocycbenzamine HCl	63-60-3	Alkylating agent	Alkylating agents	+	-	-	+	+	+	-
317	C626	Phenylbutazone	50-33-9	Hydrazine or precursor	Hydrazines	+	-	-	+	+	+	+
318	C627	1-Phenyl-3,3-dimethylbutane	7227-91-0	Antidiabetic agent	Others	+	+	-	-	+	+	+
319	C630	Phenylglycidyl ether	122-60-1	Glycidyl ether, amine, ester or amide	Epoxides	-	+	+	+	+	-	+
320	C631	Phenylhydrazine HCl	59-86-1	Arylhydrazine or N-oxide heterocycle	Hydrazines	+	+	+	+	+	NA	+
321	C633	o-Phenyphenol	90-43-7	Phenol or precursor	Phenols	+	-	-	-	+	-	+
322	C636	Piperonal butoxide	91-20-9	Benzodioxole	Others	-	-	-	-	E	-	+
323	C636	Piperonyl sulfoxide	120-62-7	Benzodioxole	Others	-	-	-	-	E	-	E
324	C638	Polybrominated biphenyl mixture	67774-32-7	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	-	-	-	+	E	-	E
325	C642	Pitracicline (primidone)	125-33-7	Formaldehyde donor	Others	-	-	-	+	E	-	-
326	C643	Probenecid	57-96-9	Benzene	Benzenes	-	-	-	-	-	-	E
327	C646	Progesterone HCl (Nabufen)	365-10-1	Monic or di-alkylhydroxone	Hydroxones	-	+	+	-	NA	NA	+
328	C646	Progesterone	87-63-0	Hormones	Hormones	-	-	-	-	-	-	-
329	C647	Propene sulfone	1120-71-4	Alkylating agent	Alkylating agents	+	+	-	+	+	+	NA
330	C648	beta-Propranololone	87-57-8	Beta-lactone	Others	+	-	-	-	+	+	+
331	C649	1,2-Propylene oxide	75-66-9	Epoxide	Epoxides	+	+	+	+	+	+	+
332	C652	N-Propyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	13010-07-6	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	-	-	-	-	-	-
333	C653	N-Propyl-N-nitrosourea	816-67-9	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	+	+	+	+	+	+	+
334	C656	Pertidine	110-95-1	Pertidine	Others	-	-	-	-	-	-	-
335	C656	Pyrimine maleate	59-33-6	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	-	E	-	-
336	C657	Pyrimethamine	58-14-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	+	+	+	+	E

#	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (CGX 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vivo E-MN*	In vitro CA Derek	In vitro CA Aroclor	In vitro CA MCase: CA-CHL	In vitro CA MCase: CA-CHO	In vitro MN MCase: MNT-mouse
337	C856	Quercetin	117-39-6	Flavonol	Others	+	-	+	+	+	+	-
338	C859	p-Gulonic dioxime	105-11-3	Oxime	Others	+	-	-	+	+	+	-
339	C860	Resorcinol	90-98-6	Phenol or precursor	Phenols	-	+	-	-	-	-	+
340	C861	Resorcinol acetate	127-67-9	Resorcinol or precursor	Others	+	-	-	-	-	E	+
341	C864	Saccharin, sodium	128-44-9	Aryl sulfonamide	Amines/Amides/Imine	-	-	-	+	-	-	E
342	C865	Safrole	94-69-7	Alylbenzene, propargyl- benzene or 1'-hydroxy derivatives	Benzenes	+	-	+	+	+	-	E
343	C874	Drepanolololol	18803-86-4	N-nitro or N-nitroso compound	N-nitro or N-nitroso compounds	-	+	+	+	+	+	+
344	C876	Styrene	100-42-6	Alkene	Alkenes	+	+	-	+	+	-	+
345	C877	Styrene oxide	96-09-3	Epoxyde	Epoxydes	+	-	+	+	+	+	+
346	C878	Succinic anhydride	108-30-6	Carboxylic acid anhydride	Others	-	-	-	-	-	-	-
347	C880	Sulfamerazine	57-66-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	+	-	+
348	C893	6X Purple	2611-60-7	Aromatic am compound	Azo compounds	-	-	-	-	-	-	+
349	C895	Tamoxifen citrate	54965-34-1	Macrolactone	Others	-	+	-	-	-	-	E
350	C897	Testosterone	58-22-0	Hormones	Hormones	-	-	-	-	-	E	-
351	C899	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin	1746-01-6	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	-	-	-	-	+	-	+
352	C890	1,1,1,2-Tetrachloroethane	630-30-6	Alkylating agent	Alkylating agents	+	+	-	-	-	-	+
353	C891	1,1,2,2-Tetrachloroethane	79-34-6	Gas-diluent	halides	-	+	-	-	E	-	+
354	C892	Tetrachloroethylene	127-18-4	Halogenated alkene	Halogenated compounds	-	-	-	-	-	-	-
355	C893	Tetrachlorovinphos	961-11-6	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorus compounds	-	-	-	+	+	-	+
356	C894	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate	16561-36-6	Substituted vinyl ketone	Ketones	+	-	-	-	-	E	+
357	C896	Tetrahydrofuran	109-99-9	Furan	Others	-	-	-	+	-	-	-
358	C896	Tetrahydrofuran	509-14-0	Aliphatic nitro	Nitro compounds or nitriles	+	-	-	-	E	+	NA
359	C899	Thioacetamide	62-55-6	Thioamide	Amines/Amides/Imine	-	+	-	-	-	NA	+
360	C700	4,4-Thiodianiline	134-65-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	+
361	C702	Thio-tpa	52-24-4	Azine or aziridine	Azines or aziridines	+	+	+	+	+	+	+
362	C704	Thiourea	62-56-6	(Thiourea)	Ureas	-	-	-	-	-	-	+
363	C706	Toluene	108-88-3	Benzene	Benzenes	-	+	-	-	-	-	-
364	C707	2,4-Toluene diisocyanate	50-40-0	Isocyanate or isothiocyanate	Isocyanates	-	-	-	-	-	-	E
365	C709	o-Toluene sulfonamide	80-19-7	Aryl sulfonamide	Amines/Amides/Imine	-	-	-	-	-	-	-
366	C711	o-Toluidine	95-63-4	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	E	+	+	-	-
367	C716	Trenimon	60-76-6	Azine or aziridine	Azines or aziridines	+	+	+	+	E	+	+
368	C718	Triacetene	395-01-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	+	+	+	-	E
369	C719	Tribromomethane	75-25-2	Halogenated methane	Halogenated compounds	+	-	+	+	+	-	-
370	C720	Trichloroacetic acid	76-03-9	Di- to poly-halogenated alkane or cycloalkane	Halogenated compounds	-	-	-	-	-	-	-
371	C722	1,1,2-Trichloroethane	79-00-6	Alkylating agent	Alkylating agents	+	-	-	-	+	+	NA
372	C723	Trichloroethylene (with and without epichlorohydrin)	79-01-6	Halogenated alkene	Halogenated compounds	-	-	-	-	-	-	E
373	C724	N-Trichloromethylthio-phthalimide	133-07-3	Potentially labile halogen	Halogenated compounds	+	+	+	+	E	-	E
374	C725	2,4,6-Trichlorophenol	88-06-2	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	-	+	+	+	-	-	E
375	C726	1,2,3-Trichloropropane	96-18-4	vic-Dihalide	halides	+	+	-	-	+	+	NA
376	C727	Triethanolamine	102-71-6	Ethanolamine	Amines/Amides/Imine	-	-	-	-	-	-	-
377	C729	Trifluorin, technical grade	1562-09-8	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	E	-	-	-	-
378	C730	2,4,5-Trimethyleniline	137-17-7	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	E	+	+	+	-
379	C733	1,2,4-Trimethylbenzene	95-63-6	Benzene	Benzenes	-	-	-	-	-	-	+
380	C734	Trimethylphosphate	513-56-1	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorus compounds	-	+	-	+	-	+	+
381	C736	Trimethylthiourea	2489-77-2	(Thiourea)	Ureas	-	-	-	+	E	-	+
382	C738	Tri(n)-chloromethylphosphate	115-96-6	Alkylating agent	Alkylating agents	-	+	+	+	+	-	E
383	C740	Tri(n)-3-dimethylaminopropylphosphate	126-73-7	vic-Dihalide	halides	+	+	+	+	+	+	+
384	C741	Tri(n)-ethylhexylphosphate	76-40-2	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorus compounds	-	-	-	-	-	-	-
385	C744	Urethane	51-79-6	Alkyl carbamate	Carbamates	-	+	+	-	-	-	+
386	C746	Vinyl acetate	108-05-4	Enol ether	Others	-	-	-	+	NA	NA	+
387	C747	Vinyl bromide	593-60-2	Halogenated alkene	Halogenated compounds	-	-	-	+	NA	NA	NA
388	C748	Vinyl carbamate	15905-73-9	Vinyl carbamate	Carbamates	-	+	+	-	NA	NA	+
389	C749	Vinyl chloride	75-01-4	Halogenated alkene	Halogenated compounds	-	+	-	+	NA	+	+
390	C750	4-Vinylcyclohexane	100-45-3	Alkene	Alkenes	-	-	-	+	-	-	-
391	C751	Vinylidene chloride (1,1-Dichloroethylene)	75-35-4	Alkene	Alkenes	-	-	-	+	+	-	-
392	C754	Zearalenone	17904-92-4	Beactinol or precursor	Beactinols	+	+	-	-	E	+	+
393	C755	Zinc dimethyldithiocarbamate (Zinc)	137-30-4	(Thio)carbamate	Carbamates	+	+	+	-	E	+	+
394	C756	Zinc ethylenebisthiocarbamate (Zinc)	12122-67-7	Thium disulphide or dithiocarbamate	Carbamates	-	+	-	-	NA	NA	+

*: Erythrocyte MN test with bone marrow or peripheral blood

Appendix 2 Results of analysis from 3 in silico models for in vitro chromosomal aberrations (CA) to non-carcinogens

#A	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (CGX 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vitro E-MN*	In vitro CA Deriv	In vitro CA Azo/ox	In vitro CA MCas: CA-CHL	In vitro CA MCas: CA-CHO	In vitro MN MCas: MNT-mouse
1	NC1	Acetohexamide	968-81-0	Aryl sulphonamide	Amines/Amides/Amides	+	-	-	+	-	-	E
2	NC2	Acetonitrile [AKA ethyl nitrile]	75-05-8	Nitrile	Nitriles	-	+	-	-	NA	-	+
3	NC3	Acrolein	107-02-8	Alpha, beta-unsaturated aldehyde	Aldehydes	-	-	-	+	E	-	NA
4	NC8	Aldicarb	116-06-3	(Thio)carbamate	Carbamates	-	-	-	-	NA	-	NA
5	NC8	d-Amphetamine sulfate	60-13-0	Amine	Amines/Amides/Amides	-	+	-	-	-	-	+
6	NC9	Anipollin trihydrate	7177-48-2	Ring-strained amide, ester thioamide or thioester	Amines/Amides/Amides	-	-	-	+	NA	-	-
7	NC10	Anisole	101-05-3	Potentially labile halogen	Halogenated compounds	-	-	-	+	E	-	-
8	NC12	o-Arthralic acid	118-62-3	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	-	+	E	-
9	NC13	Ascorbic acid	50-81-7	Carboxylic acid	Carboxylic acids	-	+	-	-	-	-	+
10	NC17	Benzoate, sodium	532-32-1	Benzene	Benzenes	+	-	-	-	-	E	+
11	NC18	Benzoin	119-52-9	(Diary) ketone	Ketones	+	-	-	-	+	+	E
12	NC19	1H-Benzothiazole	95-14-7	Benzene	Benzenes	+	-	-	-	+	+	+
13	NC20	Benzyl alcohol	100-51-6	Alcohol	Alcohols	-	+	-	-	-	-	+
14	NC23	Bromomethane	74-83-9	Alylating agent	Alylating agents	-	+	+	+	-	-	+
15	NC24	n-Butyl chloride	109-69-3	Alylating agent	Alylating agents	-	+	+	+	-	-	+
16	NC26	gamma-Butyrolactone	96-48-0	Miscellaneous	Others	-	-	-	-	-	+	-
17	NC27	Caffeine	58-08-2	Substituted pyrimidine or purine	Others	+	+	+	+	+	-	-
18	NC28	Carbolactam	105-60-2	Lactam	Others	-	-	-	-	-	-	-
19	NC29	Carbonyl	77-85-8	Halobutene	Halogenated compounds	+	-	-	+	+	E	+
20	NC31	4-(Chloroacetyl)-acetamide	140-49-8	Alylating agent	Alylating agents	+	+	+	+	+	+	E
21	NC32	p-Chloroaniline	106-47-8	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	+
22	NC33	o-Chlorobenzaldehyde [AKA malonitrile, o-chlorobenzylidene]	2696-41-1	Alpha, beta-unsaturated nitrile	Nitriles	+	-	+	-	E	+	NA
23	NC35	(2-Chloroethyl)trimethylammonium chloride	299-81-5	Alylating agent	Alylating agents	-	+	-	-	+	-	-
24	NC36	2-(Chloromethyl)pyridine HCl	6290-47-3	Alylating agent	Alylating agents	-	+	-	-	+	-	-
25	NC38	Chlorpheniramine maleate	113-22-8	Pyridine	Others	+	-	-	-	E	+	E
26	NC39	Chlorpropamide	94-20-2	Aryl sulphonamide	Amines/Amides/Amides	-	-	-	-	-	+	+
27	NC40	C.I. acid orange 10	1936-15-8	Aromatic azo compound	Azo compounds	+	-	-	-	E	-	+
28	NC41	C.I. food red 3 [AKA Acid red 14]	3567-80-9	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	+	-	E
29	NC42	C.I. pigment red 23 [AKA pigment red 23]	6471-40-4	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compounds	-	-	-	E	-	-	+
30	NC43	C.I. pigment yellow 12	6398-85-6	Azo or azoxy compound	Azo compounds	-	-	-	-	E	-	+
31	NC44	Codaine	76-67-3	Miscellaneous	Others	-	-	-	-	-	-	E
32	NC45	Coumaphos	56-72-4	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	-	-	-	-	+	+	+
33	NC46	Cyanamide, calcium	156-62-7	Cyanate, cyanamide or cyanogen halide	Others	-	-	-	+	NA	-	NA
34	NC47	Cyclohexanone	108-94-1	(Diary) ketone	Ketones	-	-	-	-	-	-	-
35	NC49	Deltamethrin	52919-83-5	Halogenated alkene	Halogenated compounds	-	+	-	-	NA	-	+
36	NC50	Diallyl phthalate	131-17-9	Phthalate	Phthalates	+	-	-	-	-	-	-
37	NC52	2,6-Diaminotoluene 2HCl	15481-70-6	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	+	+	+
38	NC53	2,5-Diaminotoluene sulfate	6380-80-1	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	+	+	+	+	E
39	NC54	Diazinon	333-41-5	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	+	+	-	-	+	-	+
40	NC56	1,2-Dichlorobenzene	95-60-1	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	-	-	-	-	E	-	-
41	NC59	1,1-Dichloroethane	75-34-3	Gem-dihalide	Halides	-	+	-	-	-	-	+
42	NC60	2,4-Dichlorophenol	120-83-2	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	+	-	+	-	+	-	E
43	NC61	N,N-Dicyclohexylthiourea	1212-28-9	Thiol or thiol exchange agent	Others	-	-	-	-	-	-	+
44	NC62	Dieldrin, photo-	13366-73-0	Epoxyde	Epoxydes	-	-	-	-	+	E	-
45	NC63	Dimethoate	60-61-8	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	+	+	+	+	+	+	+
46	NC64	Dimethoate, commercial grade [AKA acetic acid ester with 2,5-dimethyl-n-dioxan-4-ol]	625-00-2	Aldehyde or precursor	Aldehydes	+	+	-	-	-	+	E
47	NC65	2,4-Dimethoxyaniline HCl	54150-89-5	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	-	-	+	+	+	-
48	NC67	Dimethylformamide	68-12-2	Aldehyde or precursor	Aldehydes	-	-	-	+	NA	-	-
49	NC68	Dimethyl sebacate	120-51-6	Phthalate	Phthalates	-	-	-	-	-	-	E
50	NC69	Dioxathion [AKA phosphorothioic acid, 5,5-p-dioxane-2,3-diylo-0,0',0'-trisethyl ester]	78-34-2	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	-	-	-	-	+	-	-
51	NC70	Diphenhydramine HCl	147-24-0	Miscellaneous	Others	+	+	+	-	-	-	-
52	NC71	Diphenyl-p-phenylenediamine	74-31-7	Secondary amine	Amines/Amides/Amides	-	-	-	+	+	+	+
53	NC72	2,5-Dithioburea	142-46-1	Hydrazine or precursor	Hydrazines	-	-	-	-	NA	-	+
54	NC73	EDTA, sodium salt trihydrate	446-34-9 69501-25-0	Carboxylic acid	Carboxylic acids	-	-	-	-	-	-	-
55	NC74	Erdin	72-20-8	Epoxyde	Epoxydes	-	-	-	-	-	-	-
56	NC75	Ephedrine sulphate	134-72-5	Secondary amine	Amines/Amides/Amides	-	-	-	-	-	-	-
57	NC77	Erythromycin stearate	643-22-1	Aldehyde or precursor	Aldehydes	-	+	-	-	-	-	E
58	NC79	p,p'-Ethyl-DDD [AKA pethane]	72-66-0	Gem-dihalide	Halides	-	-	-	-	E	-	-
59	NC80	Ethyl telluride	20941-85-5	Thiazum disulphide or dithiocarbamate	Carbamates	+	+	+	NA	NA	E	+
60	NC81	Etholeic	41340-28-4	Carboxylic acid	Carboxylic acids	-	-	-	-	+	E	-
61	NC82	Eugenol	97-83-0	Catechol or precursor	Catechols	+	-	+	+	+	+	-

#A	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (COX 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vivo E-MN*	In vitro CA Derek	In vitro CA Aroclor	In vitro CA MCase: CA-CHL	In vitro CA MCase: CA-CHO	In vivo MN MNT-mouse
62	NC84	FD & C red no. 3 [AKA fluorescein, 2, 4, 5, 7-tetraiodo, disodium salt]	16423-68-0	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds	+	-	-	+	+	NA	E
63	NC85	FD & C yellow no. 5 [AKA tartrazine]	1934-21-0	Azo or azoxy compound	Azo compounds	+	-	-	+	+	-	+
64	NC86	FD & C yellow no. 6 [AKA Food yellow 3]	2783-94-0	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	+	+	-	+
65	NC87	Paraminoudf. formulated [AKA p-dimethylaminobenzenediazo sulphonic acid, sodium salt]	140-66-7	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	E	-	E
66	NC88	Parthion	55-38-9	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	+	-	-	+	+	-	+
67	NC89	Fenvalerate [AKA cyano-3-phenoxyphenylmethyl-4-chloro-alpha-1-methoxyhydrobenzoin acetate]	51630-58-1	Nitrile	Nitriles	+	+	-	-	NA	+	+
68	NC90	Fluometuron [AKA urea, 1,1-dimethyl-3-(alpha, alpha, alpha-trifluoro-methyl)-]	2164-17-2	(Thio)urea	Ureas	-	-	-	+	E	-	E
69	NC95	HC blue no. 2 [AKA ethanol, 2,2'-(4-(2-hydroxyethylamino)-3-nitrophenylimino)di-]	33229-34-4	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compound	-	-	E	-	+	-	-
70	NC96	HC yellow 4	58920-43-8	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compound	-	-	E	-	+	-	E
71	NC97	Hexachlorocyclopentadiene	77-47-4	Gem-dihalide	Halides	+	-	-	+	+	+	+
72	NC100	4-Hexylresorcinol	136-77-6	Resorcinol or precursor	Resorcinols	-	-	-	-	+	-	-
73	NC101	Hydrochlorothalide	58-03-6	Aryl sulphamide	Amines/Amides/Amides	-	-	-	+	+	-	NA
74	NC102	B-hydroxyquinoline [AKA B-quinolone]	146-24-3	Quinoline	Quinolines	+	-	-	+	+	+	+
75	NC103	Iodoform [AKA methane, triiodo-]	75-47-8	Halogenated methane	Halogenated compounds	-	-	E	+	NA	-	NA
76	NC104	Isopropyl-N-(3-chlorophenyl)carbamate	101-21-3	Alkyl carbamate	Carbamates	-	-	+	-	-	-	E
77	NC106	4,4'-isopropylidenediphenol	80-06-7	Biphenol or precursor	Others	+	-	-	-	E	-	-
78	NC106	Lead dimethylthiocarbamate	1901-68-3	(Thio)carbamate	Carbamates	-	-	+	+	E	+	+
79	NC108	Lithocholic acid	434-13-9	Short chain alpha,beta-carboxylic acid	Carboxylic acids	+	-	-	-	+	-	-
80	NC111	Malathion	7121-75-5	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	+	+	+	+	+	+	+
81	NC112	Malic hydrazide	123-33-1	Hydrazine or precursor	Hydrazines	-	-	-	+	NA	+	NA
82	NC114	3-Mercapto	80488-6	Miscellaneous	Others	-	-	-	-	-	-	E
83	NC115	Methoxycarbonyl	59-08-2	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	+	-	-	+	+
84	NC116	Methoxychlor	72-43-6	Di- to poly-halogenated alkane or cycloalkane	Halogenated compounds	-	-	-	-	-	-	-
85	NC118	Methyl methacrylate	80-02-6	Alpha-, beta-unsaturated ester or thioester (class II or III)	Esters	+	-	+	+	E	+	-
86	NC119	Methyl parathion [AKA phosphorothioic acid, O, O-dimethyl o-(p-nitrophenyl)water]	298-00-0	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	-	+	E	+	+	-	E
87	NC120	Monoethoxypropionic acid	70-11-6	Alkylating agent	Alkylating agents	-	+	+	-	-	-	+
88	NC121	N-(1-Naphthyl)ethylenediamine 2HCl [AKA PL-80776]	1485-25-4	Secondary amine	Amines/Amides/Amides	-	-	-	+	+	+	+
89	NC123	p-Nitroaniline	100-01-6	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compound	+	-	E	+	+	+	+
90	NC124	4-Nitrobenzoic acid	619-17-0	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compound	-	-	E	+	+	+	-
91	NC125	3-Nitro-4-hydroxyphenylacetic acid (AKA roxarsone)	121-19-7	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compound	-	-	-	NA	+	NA	NA
92	NC126	1-Nitronaphthalene	86-67-7	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compound	+	-	E	+	+	+	+
93	NC127	4-Nitro-o-phenylenediamine	99-56-0	Aromatic nitro compound	Aromatic nitro compound	+	-	E	+	+	-	+
94	NC133	Cyclotriazine HCl	2056-86-0	Substituted vinyl ketone	Nitriles	-	+	-	-	E	-	-
95	NC134	Parathion	56-38-2	Alkyl ester of phosphoric or phosphonic acid	Phosphorous compounds	-	-	E	+	+	-	E
96	NC135	Penicillin VK	132-98-9	6-aminocaprylic acid or precursor	Carboxylic acids	+	-	-	+	NA	-	-
97	NC136	Pentawortol inbenzate with 80% d-lactose monohydrate	78-11-6	Alcohol	Alcohols	-	-	-	+	E	-	NA
98	NC137	Phenformin HCl	834-25-6	Miscellaneous	Others	-	-	-	-	E	-	+
99	NC138	Phenol	108-96-2	Phenol or precursor	Phenols	+	+	-	-	-	+	+
100	NC139	p-Phenylenediamine 2HCl	624-18-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	+	+	-	+	+	+	+
101	NC140	Phenylephrine HCl	61-78-7	Secondary amine	Amines/Amides/Amides	-	-	-	+	NA	-	+
102	NC141	1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone	89-25-6	Hydrazine or precursor	Hydrazines	-	-	-	+	+	-	E
103	NC144	1-Phenyl-2-thiourea	103-85-5	Aromatic azo compound	Azo compounds	-	-	-	-	-	+	+
104	NC145	Phthalimide	88-06-0	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	-	-	+
106	NC146	Phthalic anhydride	88-44-9	Cyclic acid anhydride	Others	+	-	-	-	E	-	E
108	NC149	Promethazine HCl	58-33-3	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	-	-	-	-
107	NC150	Propylene [AKA propene]	115-07-1	Alkene	Alkenes	-	-	-	+	-	-	-
108	NC151	Propyl galate	121-79-9	Catechol or precursor	Catechols	+	+	+	+	+	+	+
109	NC152	Resorcinol	108-46-3	Resorcinol or precursor	Resorcinols	-	-	-	-	-	+	+
110	NC153	Rhodamine 6G [AKA basic red 1]	989-38-8	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	-	+	+	+
111	NC154	Selenone	83-78-4	Coumarin	Others	-	-	-	-	-	-	+
112	NC155	Sodium chloride	7782-18-2	Alkali, alkali earth, metal salt	Alkali, metal salts	+	+	+	+	NA	NA	NA
113	NC156	Sodium diethylthiocarbamate trihydrate [AKA carbamic acid, diethylthio, sodium salt]	146-35-5 20524-25-3	(Thio)carbamate	Carbamates	-	-	+	-	NA	-	+
114	NC157	Sodium hypochlorite	7681-52-9	Alkali, alkali earth, metal salt	Alkali, metal salts	-	-	+	-	-	-	-
115	NC158	Sorbic acid	110-44-1	Carboxylic acid	Carboxylic acids	-	-	-	+	-	-	+
116	NC160	Sulfisoxazole	127-69-5	Aromatic amine or amide	Aromatic amines or amides	-	-	-	+	-	-	-
117	NC161	S-Subtlene	77-79-2	Miscellaneous	Others	-	-	-	+	NA	-	-
118	NC164	Tetracycline HCl	54-75-8	Substituted vinyl ketone	Nitriles	+	-	-	-	E	-	+
119	NC165	Tetraethylthiuram disulfide [AKA disulfide, bis(dialkylthiocarbonyl)]	97-77-8	Thiuram disulfide or dithiocarbamate	Carbamates	+	+	-	-	-	+	+

[注] NC144 の 1-Phenyl-2-thiourea は、Azo compd とクラス分類しているが、Urea に変更

した。

#A	ID	Chemical	CAS No.	Chemical Grouping (CGX 2007)	Chemical Class	In vitro CA	In vivo E-MN*	In vitro CA Derek	In vitro CA Aroclor	In vitro CA MCas: CA-CHL	In vitro CA MCas: CA-CHO	In vivo MN MCas: MNT-mouse
120	NC166	1- <i>trans</i> - <i>cis</i> -8- <i>β</i> -Tetrahydrocannabinol	1972-08-3	Reacrolin or precursor	Reacrolins		+	-	-	+	-	+
121	NC167	Tetraakis(hydroxymethyl)phosphonium chloride	124-84-1	Phosphorus compound	Phosphorous compounds	+	-	-	-	NA	+	NA
122	NC169	Tetramethylthiuram disulfide	137-26-8	Thiuram disulphide or dithiocarbamate	Carbamates		+	+	+	+	+	+
123	NC170	4,4-Thiobis(5-tert-butyl-m-cresol) [AKA santrozol]	95-69-5	Phenol or precursor	Phenols	-		-	-	-	-	-
124	NC173	Tolbutamide	64-77-7	Aryl sulphonamide	Amines/Amides/Amides	-	+	-	-	-	-	+
125	NC174	1,1,1-Trichloroethane, technical grade	71-68-6	Di- to poly-halogenated alkane or cycloalkane	Halogenated compounds		-	-	-	-	+	-
126	NC176	2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	93-76-5	Polyhalogenated aromatic	Polyhalogenated aromatic compounds		-	-	-	+	+	+
127	NC177	Tricetyl phosphate	1330-78-5	Phosphoric acid ester	Phosphorous compounds	-		-	-	-	-	E
128	NC178	Triphenyltin hydroxide	76-87-0	Alkali, alkali earth, metal salt	Alkali, metal salts	-	+	-	NA	NA	NA	NA
129	NC180	L-Tryptophan	73-22-3	Amino acid or derivative	Others	-		-	-	-	-	-
130	NC183	Vinyl toluene (65-71% m- and 32-35% p-) [AKA benzene, ethenyl(methyl-)]	25013-15-4	Alkene	Alkenes	+	+	-	+	-	-	+

*: Erythrocyte MN test with bone marrow or peripheral blood

平成 29 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

分担研究課題名：QSAR を用いた新たな変異原性予測ストラテジーの開発に関する研究

研究分担者： 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

作用機序に関する QSAR(定量的構造活性相関)、リードアクロス(類推)と専門家知識の組合わせに基づくワークフローを用いて、ユーザーが透明性のある決定を下せるような 4 種類の異なるシナリオを検討した。その結果、OASIS TIMES(肝代謝シミュレーター)エームス(Ames 変異原性試験)モデルと、OECD(経済協力開発機構)ツールボックス内の厳選された類似物質に基づくリードアクロス解析とが一致した予測を示す場合には、最終的な判断を下すために専門家の意見は必ずしも必要とは言えないと考えられた。ただし、文献資料から類似物質のリードアクロスのセットを拡大してエビデンスに基づく重要性を加味し、類似物質と標的化学物質との間のエンドポイント特異的な類似性に関して合理的な説明を提供することなどの観点から、専門家の意見は有用ではある。TIMES エームスモデルとリードアクロスとの予測が一致しない場合には、最終的な判定の査定のために専門家の意見が不可欠と考えられた。実験データの正当性/妥当性の査定に加えて、それらの新規性、ガイドラインとなるプロトコールに準拠した S9 代謝活性化の有無、細胞毒性などの査定において専門家の評価は有益であり、専門家知識は評価において妥当性付与するものと思われる。

A. 研究目的

エームス試験（微生物復帰突然変異試験）は Bruce Ames と共同研究者らによって 1970 年代に開発されたこの試験法で、変異と発がん性との関連を解析する上で極めて重要な役割を果たしている。エームス試験は、迅速かつ安価であることに加えて、生体動物モデルでないため、3R の原理(代替、削減、改善)にも適合しているという利点も有する。

実試験データが得られない場合、一般的に *in silico* モデリングの結果が使用される。異なる QSAR モデルによる変異原性予測の能力を実証

する多くの試みがなされているが、これらは 2 種類のアプローチに大別される。化学構造と生物学的活性との関係を統計学的に記述するモデルが 1 つ、また別のモデルは作用機序に基づく。

本研究では、国立医薬品食品衛生研究所のスクリーニング演習に採用された全ての QSAR によりエームス試験偽陰性と判定された 21 種類の物質を被検物質として、作用機序に関する QSAR、リードアクロス(類推)と専門家知識の組合わせに基づくワークフローを用いた各種シナリオを検討した。

B. 研究方法

1. TIMES エームス変異原性モデル

OASIS TIMES エームス変異原性モデルは、同一のモデリング・プラットフォーム上に、代謝活性化のシミュレーターと親化学物質並びにそれらの代謝産物の反応性を査定するモデルが内包されている。したがって、本モデルは S9 による代謝活性化のある場合と無い場合の変異原性の予測に使用できる特徴を有する。

2. OECD QSAR ツールボックス

OECD QSAR ツールボックスは、有機化学物質の危険有害性の査定に必要とされる毒性データにおけるギャップを満たすために、政府、産業界等の関係者により利用されることを意図したソフトウェアアプリケーションである。OECD QSAR ツールボックスは、単独のソフトウェアアプリケーションの中に、リードアクリル解析と傾向解析の様なカテゴリーアプローチのアプリケーションに関する「包括的な」ツールを含む。ユーザーはサーチエンジンを使用し、構造情報が定義され、かつ条件指定されたエンドポイント情報を持つ化学物質を収集できる。

3. 異なる作用機序ツールを統合したワークフロー

本研究において提案されるワークフローは、OASIS TIMES エームス変異原性モデル、リードアクリル解析と専門家の意見を統合している。これらを標的化学物質に適用し、エームスエンドポイントに関連する作用機序情報を統合した。

4. スクリーニング演習

7790 種類の化学物質のエームス変異原性を予測するために (Q)SAR が適用された。当該化学物質中、エームス実測データが陽性の 21 種の物質は、スクリーニング演習に適用された全てのモデ

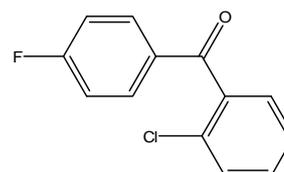
ルによって陰性と予測された。本研究において提案される作用機序ワークフローにより、これら 21 種の化学物質のエームス変異原性を検討した。提案するワークフローがエームス変異原性効果の予測について透明性のある合理的説明を提供する能力を有することを実証するために、偽陰性リストから 3 種類の物質(CAS: 1806-23-1、CAS: 609-60-9 と CAS: 765-63-9)を選択しモデルケースとして使用した。

C. 研究結果

1. TIMES エームスモデルとリードアクリルの予測が一致する調査事例

化学物質 ID :

- CAS 登録番号 : 1806-23-1
- 化学名 : 2-クロロ-4-フルオロベンゾフェノン(2-chloro-4-fluorobenzophenone)
- 2D 構造 :



OASIS TIMES エームスモデルによる予測 :

エームス変異原性を誘発させる構造アラートは親化学物質またはその代謝産物に関して検出されていない。従って、TIMES エームスモデルにより、2-クロロ-4-フルオロベンゾフェノンは S9 代謝活性化の存在下と非存在下において陰性と予測される。

リードアクリル解析による予測 :

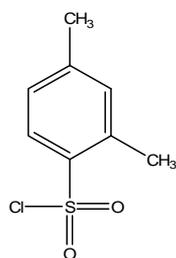
2-クロロ-4-フルオロベンゾフェノンの構造的類似物質は全てエームス陰性との予測であった。TIMES とリードアクリルによる一致した予測は、標的および 4 種類の類似物質について報告されているエームス実データとも一致しており、これらに基づき 2-クロロ-4-フルオロベンゾフェノンは

エームス試験において非変異原性であると判定される。

2. OASIS TIMES エームスモデルとリードアクロスの予測が一致するが専門家による正当化を必要とする調査事例

化学物質 ID :

- CAS 登録番号 : 609-60-9
- 化学名 : 2,4-ジメチルベンゼンスルホニルクロリド (2,4-dimethylbenzenesulfonyl chloride)
- 2D 構造 :



OASIS TIMES エームスモデルによる予測 :

2,4-ジメチルベンゼンスルホニルクロリドの陽性予測は S9 代謝活性化存在下で認められる。

リードアクロス解析による予測 :

選抜された類似物質の一つである塩化トシルは、エームス実データが陽性であることが検出される。ただし塩化トシルと他の 2 種類の類似物質に関して見出される実験データの間には矛盾が存在する。

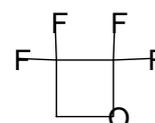
専門家による正当化 :

溶媒の DMSO により変異原性の付加体が形成される塩化トシルは、同条件下ではエームス試験において陽性である。これは、溶媒としてエタノールが使用されたエームス試験において塩化トシルは陰性であるとの事実によって支持される。すなわち、標準的な試験条件が使用される場合には、エームス試験において塩化トシルは陰性を示す。リードアクロス解析において、DMSO との相互作用により得られた陽性のエームスデータは棄却されるべきである。

3. TIMES エームスモデルとリードアクロスの予測が一致しない調査事例

化学物質 ID :

- CAS 登録番号 : 765-63-9
- 化学名 : 2,2,3,3-テトラフルオロオキシタン (2,2,3,3-tetrafluorooxetane)
- 2D 構造 :



OASIS TIMES エームスモデルによる予測 :

2,2,3,3-テトラフルオロオキシタンの変異原性を予測するために、S9 代謝活性化を伴う TIMES エームスモデルが適用された。反応性と代謝(に関する情報)を共有する TIMES とツールボックスにより作成される代謝物は存在しない。親化学物質において構造アラートが検出されないため、TIMES エームスモデルは陰性の予測を提供する。この結果は、*S. typhimurium* において観察された陰性のエームスデータと一致する。なお、TIMES エームスモデルは *S. typhimurium* の全ての系統における変異原性を予測するように構築されており、*E. coli* におけるエームス変異原性をシミュレートできないことは留意する必要がある。

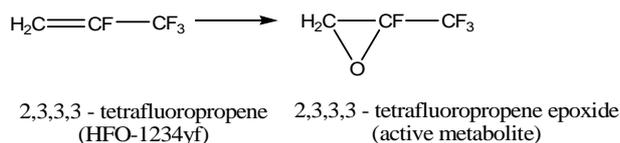
リードアクロス解析による予測 :

ツールボックス内にエームスデータが陽性である構造的類似物質の一つが検出される。この類似物質(2-クロロオキシラン)の陽性エームスデータに従って、2,2,3,3-テトラフルオロオキシタンは陽性と指定される。

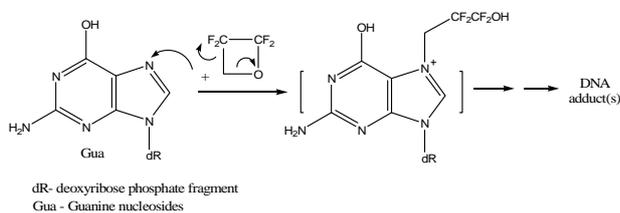
専門家による正当化 :

化学物質の 2,3,3,3-テトラフルオロプロペン (2,3,3,3-tetrafluoropropene) は S9 の存在下でのみ *Salmonella typhimurium* 系統 TA100 と *E.*

coli (WP2 *uvrA*)を用いた細菌変異原性試験において陽性であることが報告されている。この陽性反応には、同化学物質のエポキシドへの代謝活性化が指摘されている。



2,3,3,3-テトラフルオロプロペンと同様に、標的化学物質 2,2,3,3-テトラフルオロオキセタンでも求電子性と、CH₂-O 結合のヘテロシス開裂により部分的にフッ素化されたオキセタンとエポキシドの開環 DNA アルキル化能力が、電子求引性の環状炭素と結合したフッ素(または塩素)原子の導入により向上される可能性が存在する。



別の化学物質の 2-メチル-3,3,3-トリクロロメチルプロピレン(CAS: 16387-26-1)の酸化物も、標的化学物質と 2,3,3,3-テトラフルオロプロペンのエポキシドに構造的類似性を有し、S9 代謝活性化を伴わないエームス変異原性試験において陽性であることが報告されている。

以上、作用機序の面から正当化できる類似物質の陽性のエームス実験データに基づき、2,2,3,3-テトラフルオロオキセタンはエームス陽性と判定される。

D. 考 察

OASIS TIMES エームスモデルと、OECD ツールボックス内の類似物質に基づくリードアク

ロス解析とが一致した予測を示す場合には、最終的な決定を下すために専門家の意見は必ずしも必要でないと考えられた。しかし、文献資料から類似物質のリードアクロスのセットを拡大したり、類似物質と標的化学物質との間のエンドポイント特異的な類似性に関して合理的な説明を提供するなど、専門家の意見は有用と考えられる。

TIMES エームスモデルとリードアクロスとの予測が一致しない場合には、最終的な効果の査定のために専門家の意見が不可欠となる。標的エンドポイントに関して、専門家は新規性、S9 代謝活性化の有無、ガイドラインプロトコールへの準拠、細胞毒性などの判定に用いられた実験データの正当性/妥当性を評価する。収集された全ての作用機序に関する証拠を評価後に、専門家は最終的な判定についての結論を提供する。陽性の結論が出される場合には、最終的な効果をもたらす原因となるプロセスの正当化に、作用機序に関する知見は重要である。

E. 結 論

作用機序に関する QSAR、専門家知識とリードアクロス解析の組み合わせは、重要性に基づく十分な評価を提供し、最終的な予測に関してユーザーが妥当性ある判断を下すことを支援できることが示唆された。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 29 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担報告書

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

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、反復投与毒性による無毒性量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、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、化学構造の類似する化学物質で得られている無毒性量からの評価対象物質の無毒性量評価の可能性について検討を行うため、データベースに含まれる毒性情報既知の化学物質との構造類似度と無毒性量の近似についての解析、化学構造記述子や部分構造をもとに無毒性量を判定する統計的予測評価モデルにおけるモデル構築に用いた化学物質に含まれる評価対象物質との構造類似物質の数と評価精度との関係について検証を行った。化審法で 28 日間試験が実施された化学物質を対象として化学物質間との構造類似度と無毒性量の近似について総当たり解析を行った結果、構造類似度が高いほど無毒性量の近似が認められ、データベースに類似度が 70% を上回る物質の情報が 3 物質以上で得られていない物質では構造類似性からの無毒性量評価は困難であることが示された。一方、昨年度構築した記述子や部分構造をもとに無毒性量を 2 クラス分類する評価モデルにおける評価精度についてモデル構築に用いた物質に含まれる評価対象物質の構造類似物質数との関係について解析を行った結果、分類モデルの評価精度に構造類似物質数との関連は認められず、既存データセット中に構造類似物質の情報が得られていない物質であっても評価可能であることが明らかとなった。得られた結果より評価に用いるデータベース中に含まれる構造類似物質の情報の有無により評価に用いる手法やモデルを組合せて選択して用いることで、信頼性の高い無毒性量の評価が可能である可能性が示された。

A. 研究目的

現在、世の中には数万種に及ぶ既存化学物質が安全性評価未実施のまま流通してお

り、それら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ーアプローチによる安全性評価の検討も進められているが、カテゴリーアプローチによる化学物質の類似性評価には、合意された客観的な手法が存在するわけではなく、評価を行うエキスパートによりケースバイケースでカテゴリーの妥当性が判断されており、1つのカテゴリー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ー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ーアプ

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、基本的な化学構造の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、化学構造の類似する化学物質で得られている無毒性量からの評価対象物質の無毒性量評価の可能性について検討を行うため、データベースに含まれる毒性情報既知の化学物質との構造類似度と無毒性量の近似についての網羅的解析による検討を行った。またあわせて、昨年度までに構築した化学構造記述子や部分構造をもとに無毒性量を判定する統計的予測評価モデルにおけるモデル構築に用いた化学物質に含まれる評価対象物質との構造類似物質の数と評価精度との関係について検証を行った。

B. 研究方法

1. 構造類似度と反復投与毒性試験における無毒性量の近似度の総当たり解析による

構造類似物質からの反復投与毒性試験における無毒性量の予測性の検討

化審法既存点検により 28 日間試験が実施されて無毒性量 (NOEL) が得られており、化学構造が明らかな 234 物質を解析の対象とした。234 物質の 2D 化学構造を sdf ファイルで整理して、extended 型の fingerprint を生成し tanimoto 係数による構造類似度を総当たり計算した。構造類似度の計算には、R 3.0.2 の RCDK パッケージを用いた。

無毒性量の近似度評価のためには、構造類似度の総当たり計算に用いた 234 物質相互について反復投与毒性試験による無毒性量 (NOEL) の比 (NOEL) を総当たり計算し、各物質間相互の構造類似度と NOEL 比との関係について解析を行った。構造類似度と NOEL 比との関係から類似度 70% 未満の物質では NOEL 比が増大し無毒性量の近似が認められないことから、類似度 70% 以上の類似物質の NOEL 値からの評価対象物質の NOEL 値の予測性について、データベース中に含まれる構造類似物質数との関係について解析を行った。

2. 構造記述子を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデルにおける判別性能とモデル構築に用いたデータセットに含まれる構造類似物質数の関係

上記 2 の解析より化学構造全体の類似度からの無毒性量の予測性は、データが得られている構造類似物質の類似度と数に依存することが示されたため、昨年度、構築した構造記述子と部分構造を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデルにおける評価対象物質の判別性能とモデル構築に用いたデータセットに含まれる構造類似物質数の関係に

ついて解析を行った。判別モデル構築に用いた Munro ら (Munro IC et.al., (1996) Food and Chemical Toxicology, 34, 829-867) のデータセットと評価対象に用いた化審法既存点検物質の構造類似度を 1 . と同様に総当たり計算してモデル構築データセット中に含まれる構造類似物質数と判別結果との関係について解析を行った。

C. 研究結果

1. 構造類似度と反復投与毒性試験における無毒性量の近似度の総当たり解析による構造類似物質からの反復投与毒性試験における無毒性量の予測性の検討

図 1 に解析に用いた 234 物質×234 物質の構造類似度と NOEL 比 (対数) との関係を示す。構造類似度 (Similarity) が低くなると NOEL 比の分布が広くなり、構造類似度がおおよそ 70% 未満では無毒性量の近似は認められないことが明らかに示された。一方、構造類似度 70% 以上であっても個別の物質間の NOEL 比は対数軸で 1 以上の分布 (10 倍以上) を示すことから、次に複数の構造類似物質の無毒性量からの予測性について検討を行った。まず始めに 234 物質それぞれについての構造類似度 70% 以上の類似物質数について確認を行った。図 2 に類似物質数ごとの物質数の分布を示す。評価に用いた 234 物質のうち 96 物質については、対象とした物質セット中に構造類似度 70% 以上の類似物質が存在せず、一方、類似物質数が 3 物質を超える物質は、57 物質に留まった。同様に構造類似度 80% 以上を基準とした場合、140 物質については類似物質が存在せず、類似物質数が 3 物質を超える物質は、25 物質であった (data not

shown)。そこで、構造類似度 70%以上の類似物質が存在する物質について、類似物質の NOEL と評価対象物質との関係について更に検討を行った。図 3 に構造類似度 70%以上の物質の NOEL 平均値、対数平均値および中央値と評価対象物質の NOEL との比を構造類似物質数に対して示した。構造類似物質数が 2 物質以下の場合、NOEL 比の分布が非常に大きく、構造類似物質数 3 もしくは 4 物質を超える場合、構造類似物質の NOEL から計算される値と評価対象物質の NOEL が約 5 倍程度に収束することが示された。一方、構造類似物質数は最大で 17 物質であったが、4 物質以上では構造類似物質の NOEL から計算される値と評価対象物質の NOEL の比の分布に大きな違いは認められなかった。図 4 には、評価対象物質の NOEL に対する構造類似物質の NOEL から計算される値を示した。図中の直線はそれぞれの計算値の回帰直線である。回帰直線に大きな違いは認められないものの単純な平均値や中央値では、対数平均値に比べ、評価対象物質の NOEL より大きな値となる傾向が示された。

2. 構造記述子を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデルにおける判別性能とモデル構築に用いたデータセットに含まれる構造類似物質数の関係

図 5 , 6 に昨年度、構築した構造記述子と部分構造を用いた無毒性量の 2 クラス判別モデル 2 種 (NOEL 100 と 200 を評価基準としたモデル) における評価対象物質の判別結果とモデル構築に用いたデータセット中に含まれる評価対象物質の構造類似度 70%以上の類似物質数との関係を示した。

いずれのモデルにおいても、類似物質数と判別精度に明らかな関係は認められず、既知情報として得られている物質群に含まれる類似物質が無いもしくは限られている場合であっても 80%程度の判別精度が得られることが示された。

D. 考察

本研究では、化審法におけるヒト健康影響評価で要求されるスクリーニング毒性試験のうち、特に反復投与毒性試験により評価される *in vivo* 毒性について化学構造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、化学物質管理のための定量的リスク評価において、*in vivo* 反復毒性試験では、無毒性量を明らかにすることが求められている。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データベースに含まれる既知情報からの評価の可否を判定するスキームを構築し、判定結果に応じて、構造類似性等の観点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と判定される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、化学構造の類似する化学物質で得られている無毒性量からの評価対象物質の無毒性量評価の可能性について検討を行うため、データベースに含まれる毒性情報既知の化学物質との構造類似度と無毒性量の近似についての網羅的解析による検討を行った。その結果、化学物質全般の傾向として、類似度が高いほど無毒性量は近似し、類似度が70%より低い物質では無毒性量にほとんど近似が認められないことが明らかとなり、構造類似度が高い複数の物質について毒性試験情報が得られていれば、ある程度の評価は可能であると考察された。一方、構造類似物質が1つや2つでは、予測結果のばらつきが大きく、3つないしは4つ以上の構造類似物質について情報が得られている場合でないと予測信頼性は低く、また、3物質以上の構造類似物質について情報が得られている場合であっても、情報が得られている物質間で無毒性量や毒性所見が大きく異なる場合には注意が必要であると考察される。本研究では類似度の指標として一般によく用いられる指標である tanimoto 係数を用いたが、類似度の指標には様々な指標が開発されており、今後は他

の指標についても検討の余地があると考察される。他方、本年度の検討では、昨年度までに構築した化学構造記述子や部分構造をもとに無毒性量を判定する統計的予測評価モデルにおけるモデル構築に用いた化学物質に含まれる評価対象物質との構造類似物質の数と評価精度との関係についても検証を行った。検証の結果、統計予測モデルの評価結果について、モデル構築に用いたデータセット中の評価対象物質の類似物質の有無との明確な関係は認められず、構造類似物質について情報が得られていないもしくは限られている場合には、記述子等を用いた予測モデルによる判定結果のほうにむける信頼できると考察された。すなわち、データベース中に含まれる構造類似物質の類似度や物質数に応じて類似物質からの計算される無毒性量近似値と構造記述子を用いた統計予測モデルによる判定結果を比較することでそれぞれの予測結果の信頼性について検討を行い、既知情報から無毒性量判定の可否を判断することが重要であると考察される。構造類似物質からの予測もしくは毒性クラス判別モデルのいずれも手法も適用範囲外となる化学物質については、従来どおり動物試験による評価が行われるべきであるが、評価の基礎となるデータセットとして類似物質の情報が得られれば、適用範囲(適用可能な化学物質)を拡大可能であり、反復投与毒性評価における構造活性相関手法の適用拡大のためには、既知情報の追加によるデータベースの拡充が重要である。

E. 結論

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、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既知情報からの予測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、多くの化学物質について個別にカテゴリーアプローチを適用して評価を行うのは困難である。

本研究の結果から、類似構造の物質について毒性情報が得られていれば、化学構造から機械的に計算可能な構造類似度を指標とした無毒性量の近似評価が可能であることが示された。一方、構造類似物質についての情報が限られている場合には、昨年度までに構築した構造記述子等を用いた統計予測モデルによる評価のほうがむしろ信頼性が高いことが示された。いずれの手法による予測結果にも、ある程度の不確実性を含むものの、これらの手法を適用な化学物質については、スクリーニングレベルでの評価においては適用可能な予測が可能であると結論される。一方、いずれの手法も適用範囲外と判断される化学物質については、従来どおり動物試験による反復投与毒性の評価が要求されるものの、評価の基礎となるデータベースの拡充により適用範囲（適用可能な化学物質）を拡大可能であり、将来的には多くの化学物質について少なくともスクリーニングレベルの評価においては、既知情報からの予測評価が可能となると結論され

る。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Saito, Y. Hasegawa-Baba, F. Sekiya, S. Hayashi, Y. Mirokuji, H. Okamura, S. Maruyama, A. Ono, M. Nakajima, M. Degawa, S. Ozawa, M. Shibutani and T. Maitani ; Japan Flavour and Fragrance Materials Association's (JFFMA) safety assessment of food-flavouring substances uniquely used in Japan that belong to the class of aliphatic primary alcohols, aldehydes, carboxylic acids, acetals and esters containing additional oxygenated functional groups.; *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 34,(9) 1474–1484 (2017)

2. 学会発表

A. Ono, S. Watanabe, T. Sugawara, K. Wakabayashi, Y. Tahara, N. Horie, K. Fujimoto, K. Kusakari, Y. Kurokawa, T. Sozu, T. Nakayama, T. Kusao, T. Kawakami, K. Kojima, H. Kojima, J. Richmond, N. Kleinstreuer, K. Bae-Hwa, Y. Yamamoto, M. Fujita and T. Kasahara :A multi-centre validation study of Amino acid Derivative Reactivity Assay (ADRA) - a novel in chemico alternative test method for skin sensitization. *Society of*

Toxicology 55th Annual meeting
(2018.March, San Antonio, USA)

小野 敦, 渡辺 真一, 菅原 経継, 若林 晃
次, 田原 宥, 堀江 宣行, 藤本 恵一,
草苅 啓, 黒川 嘉彦, 寒水 孝司, 中山
拓人, 草生 武, 河上 強志, 小島 幸一,
小島 肇, J. Richmond, K. Nicole, K.
Bae-Hwa, 山本 裕介, 藤田 正晴, 笠
原 利彦 :新規*in chemico*皮膚感作性試
験ADRA法の多施設バリデーション試
験 : 第2報. *日本実験動物代替法学会*
第30回年会 (2017.11, Tokyo)

A. Ono, Y. Hiraoka, A. Hirose, and H.
Jinno :Comparative analysis of
respiratory, skin and eye irritation
potential of chemicals using
Japanese GHS classification.. *The*
53nd Eurotox2017 (2017.9,
Bratislava, Slovak)

A. Ono, S. Watanabe, T. Sugawara, K.
Wakabayashi, Y. Tahara, N. Horie,
K. Fujimoto, K. Kusakari, Y.
Kurokawa, T. Sozu, T. Nakayama, T.
Kusao, T. Kawakami, K. Kojima, H.
Kojima, J. Richmond, N.
Kleinstreuer, K. Bae-Hwa, Y.
Yamamoto, M. Fujita and T.
Kasahara :Phase-1 of the validation
study of Amino acid Derivative
Reactivity Assay (ADRA): a novel *in*
chemico alternative test method of
skin sensitization.. *Tenth World*
Congress Alternatives and Animal
Use in the Life Sciences (2017.8,
Washington State Convention
Center, Seattle, Washington)

小野 敦, 渡辺 真一, 菅原 経継, 若林 晃
次, 田原 宥, 堀江 宣行, 藤本 恵一,
草苅 啓, 黒川 嘉彦, 寒水 孝司, 中山
拓人, 草生 武, 河上 強志, 小島 幸一,
小島 肇, J. Richmond, K. Nicole, K.
Bae-Hwa, 山本 裕介, 藤田 正晴, 笠
原 利彦 :新規*in chemico*皮膚感作性試
験ADRA法の多施設バリデーション試
験 : 第1報. *第44回日本毒性学会*
(2017.7, Yokohama)

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

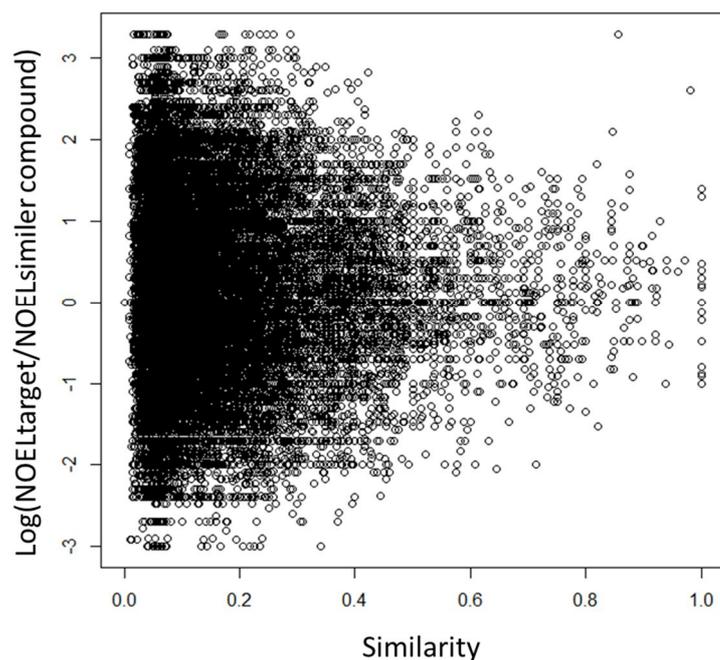


図 1 化学構造類似度 (similarity) と NOEL 比 (Log(NOELtarget/NOELsimiler compound))の関係

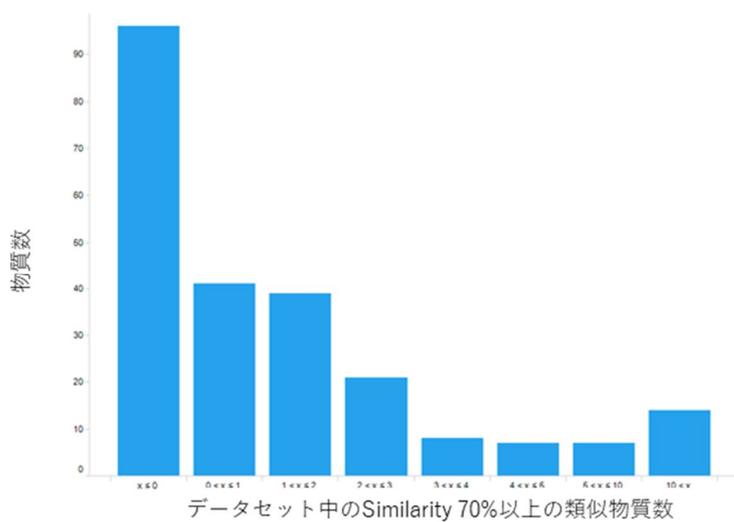


図 2 化審法 234 物質における類似度総当たり計算において similarity:70%以上の類似物質数の分布

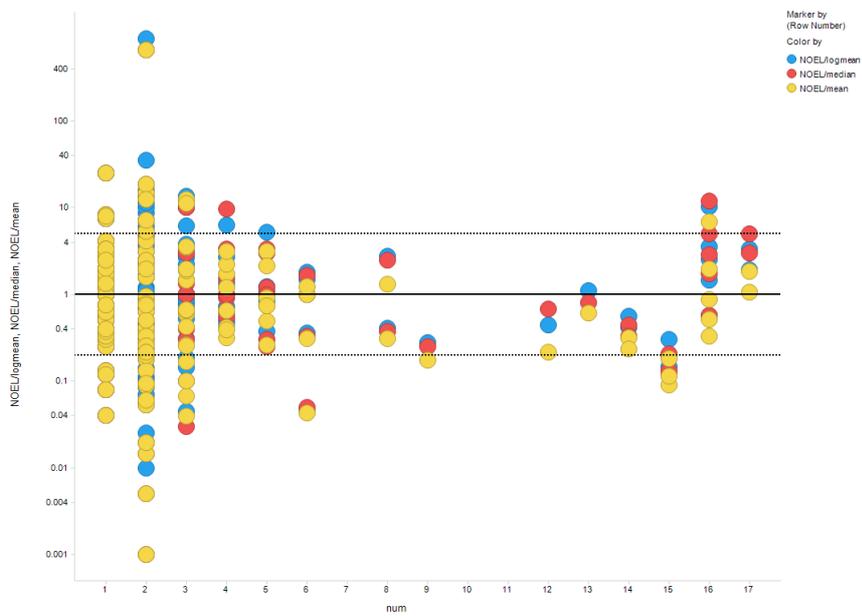


図3 評価対象物質のNOELと構造類似物質のNOEL 平均値(中央値)との関係(比)における構造類似物質数の影響

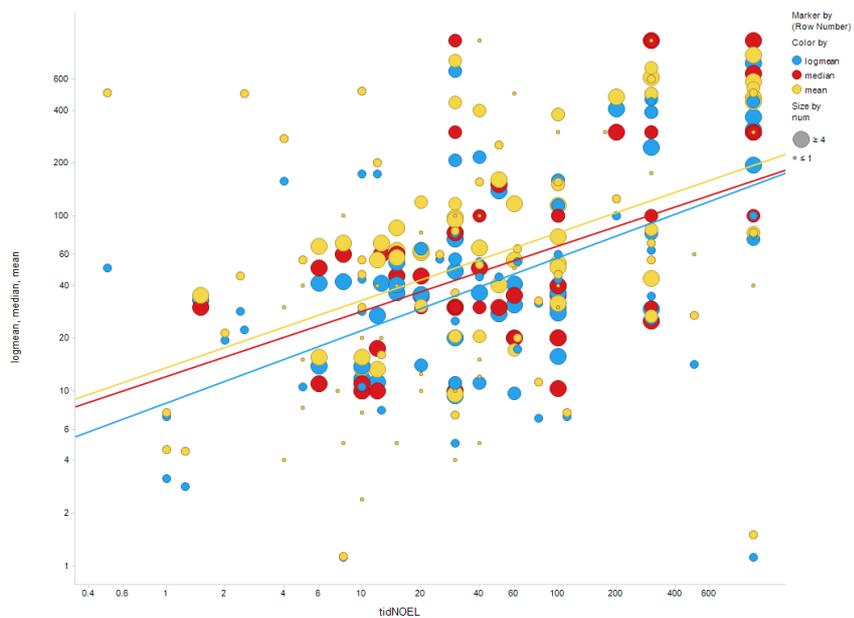


図4 評価対象物質のNOELと構造類似物質のNOEL 平均値(中央値)との関係(比)における構造類似物質数の影響

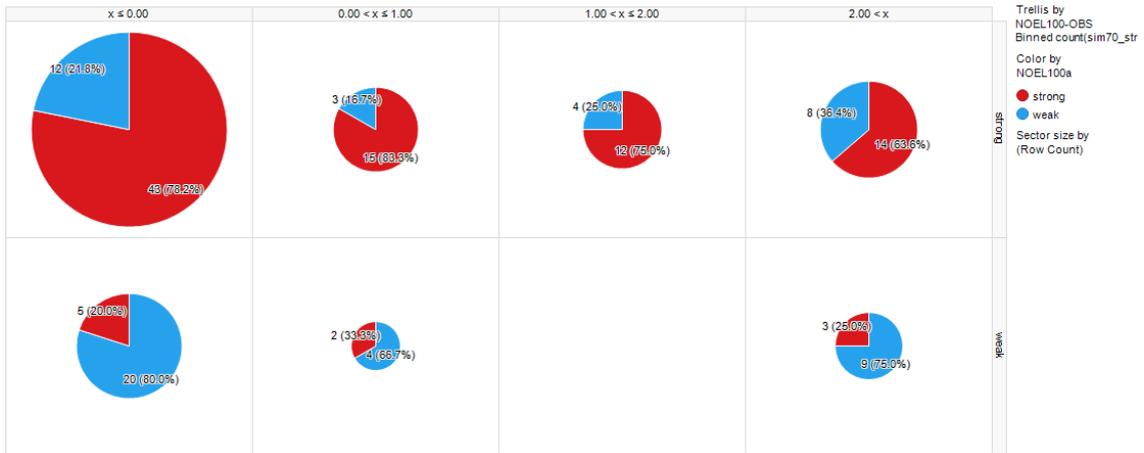


図5 構造記述子を用いた2クラス判別モデル (NOEL 100 基準) のトレーニング化合物における構造類似物質数と予測判別率の関係

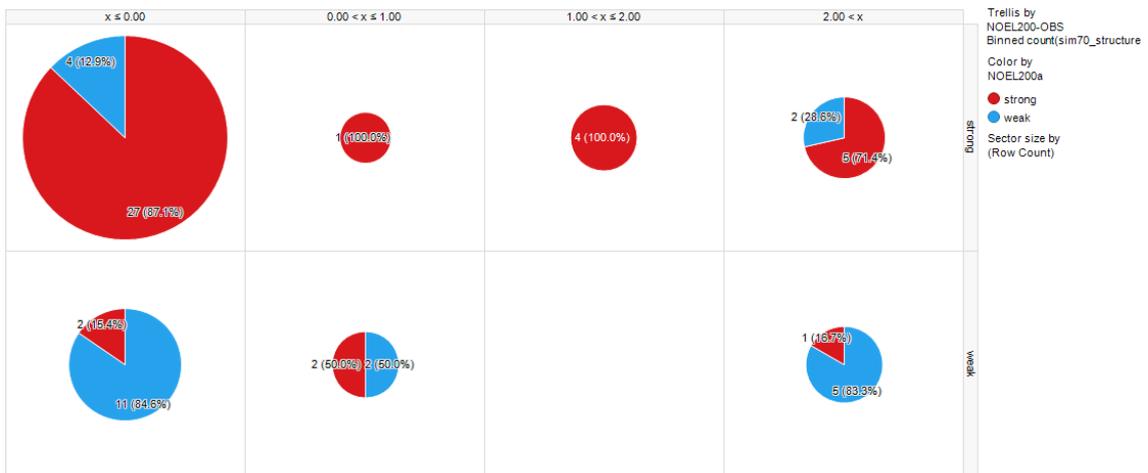


図6 構造記述子を用いた2クラス判別モデル (NOEL 200 基準) のトレーニング化合物における構造類似物質数と予測判別率の関係

平成 29 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

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 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 Lilia Fisk ラーサ研究所

研究要旨

H29 年度は、前年度までに改良してきた肝毒性に関連するプロファイラーを基にして作成した KNIME ワークフローに、ヒトの薬物性肝障害予測システムの確立を目標としたコンソーシアム（MIP-DILI）プロジェクトの成果（Lhasa が収集）を基に構築した肝毒性エンドポイントに関連する MIE/KE のモデル化アプローチを統合した KNIME ワークフローの作成を行った。このプロファイラーでは、関連するエンドポイントに MIE/KE をマッピングすることにより Derek Nexus の既存知識を活用し、リードアクロスモデルには陽性化合物との構造類似性に基づくアプローチを用いている。また Random Forest 機械学習法により予測を行うと共に、反応性代謝物を生成する可能性および CYP450 活性部位への結合性も示すものとなっている。このワークフローに予測対象とする化合物を適用した結果は、別途 Instant JChem を用いて、対象化学物質に関して参照可能なすべての情報が一覧できる可視化するツールも開発した。今回、開発した KNIME ワークフローと可視化ツールを用いることで、肝毒性の誘発性に関する判別結果を単純に表示することはできないが、ヒト細胞株/タンパク質を用いた in vitro データが統合されており、これまで動物試験のデータを用いてきたものより広い化学空間をカバーできるものと考えられる他、専門家が当該化合物の毒性予測を行うのに有用なツールを開発することができた考えられる。

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こられ、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、27年度より肝毒性エンドポイントに関連して予測した key event (KE) と、生体内経路の攪乱に關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。H27年度ではこの肝毒性 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%)。H28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、KE 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い、27年度に比べて、特異度を上昇(52%)させることで偽陽性を減少させることができた。しかし、低い感度は KE 不足を反映していると考えられた。さらに KNIME ワークフローを使って予測結果を示す可視化ツールのプロトタイプを作成した。そこで、H29年度は、前年度までに改良してきたプロファイラーを基にした KNIME ワークフローの作成と、その結果を表示できる可視化ツールの構築を試みた。また、今年度は、ヒトの薬物性肝障害予測システムの確立を目標としたコンソーシアム(MIP-DILI)プロジェクトの成果を MIE および KE のプロファイラーに追加統合して、KNIME ワークフローの作成を行った。

B. 研究方法

KNIME ワークフローとして、H26 およ

び H27 年度の成果と MIP-DILI プロジェクトの結果を統合した、肝毒性のエンドポイントに関連する Molecular Initiating Event (MIE) および KE のプロファイラーを作成する。また可視化ツールとしては、プロファイラーで得られた結果をユーザーに分かりやすく示すビューを Instant JChem を用いて設計した。

肝臓データベースの構築：MIP-DILI プロジェクトと毒性試験データベースのデータを、1つの SQLite データベースに統合した。このデータベースには、肝毒性のエンドポイントに関連する MIE および KE に加えて、ヒトでの肝毒性 AOP に関する in vivo データが含まれている。各データセットには、標準化した化学構造式および毒性データ、すなわちエンドポイントの名称(BSEP 阻害など)、2値の注釈(活性または不活性)、標準化を行う前のデータおよび構造式を抽出したデータセットの参考文献、動物種(ヒトまたはラットなど)が含まれる。このデータベースには、標準化した 18053 個の化学構造式と 67 のデータセットが集積され、38 種類のエンドポイントをカバーしている。データ抽出元の一覧を表 1 に、データベース内容の要約を表 2 に示した。本データ群は、リードアクロスモデルおよび機械学習モデルのエントリポイントとした。

C. 研究結果

KNIME ワークフローは 2 種類のアプローチを利用した。1つ目のアプローチでは、Derek Nexus のアラートを肝毒性に関連する MIE および KE でマッピングして用いている。これらのアラートにクエリー化合物がマッチすると、対応する MIE および /

または KE がユーザーに表示される。2 つ目のアプローチは、リードアクロスであり、肝毒性に関する MIE および KE の公開データを収集し、種々の MIE、KE に関して陽性データを有する各化合物と毒性試験データセットから得たクエリー化合物を、Lhasa 社で開発したフラグメントに基づく類似度 (Lhasa Limited 社の Sarah Nexus ソフトウェアにも採用) を計算するツールを用いて比較した。与えられた MIE/KE データセットの少なくとも 1 つの化合物に対して MIE/KE 固有の閾値を上回る類似性スコアを示した場合、そのクエリー化合物に当該 MIE/KE のフラグを付した。さらに、MIP-DILI プロジェクトの成果を統合した肝毒性のエンドポイントに関連する MIE および KE のプロファイラーは、Random Forest アルゴリズムと 2D RDKit 記述子を用いて、機械学習モデルを構築した。統計学習技術に依存し、Random Forest アルゴリズムを用い、各クエリー化合物の信頼性尺度を計算した。最終的に両方のアプローチを、1 つの KNIME ワークフローに統合した。

肝毒性プロファイラー：

肝毒性プロファイラーはモジュール方式で作成されており、次のモジュールを含む。

- 構造式標準化
- 適用可能範囲
- Derek Nexus のアラートにマッピングされた MIE および KE
- リードアクロスモデル
- 機械学習モデル (信頼性尺度を含む)
- 反応性代謝物に対するアラート (Kalgutkar アラート)

● WhichCyp 予測

これらのモジュールは、プロジェクトの一環として作成した肝毒性データベースより取得したデータを用いて、1 つの KNIME ワークフローに統合した。

● 構造式標準化

トレーニングセット内のすべての化合物およびクエリー化合物の構造表記については、各構造式のバリデーション、キュレーションおよび標準化を行った。図 1 に示す通り、構造式を確認、整理し、可能な場合には Lhasa Limited 社の一連の変換ルールを用いて正規化を行った。変換ルールには、芳香族性の認識、互変異性体および共鳴構造の変換、塩や金属の除去などを含む。

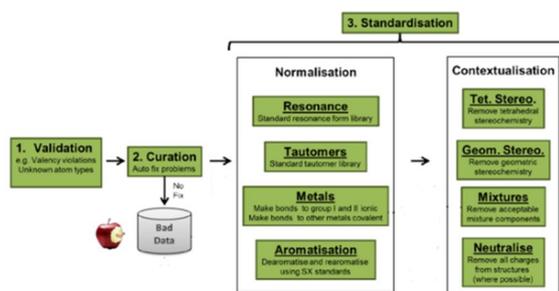


図 3. 化学構造式のバリデーション、キュレーションおよび標準化のプロセス

これらの段階を通過できなかった構造式については、肝毒性プロファイラーのモデル化方法にノイズを与えると考えられるため破棄した。

● 適用可能範囲

図 2 に示す通り、モデルに用いられたデータセットに対応する一連の RDKit 記述子の最大値と最小値を考慮し、各 MIE/KE モデルの適用可能範囲を定義した。KE 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

(トポロジカル)表面積、logP、原子数、水素結合供与体数、水素結合受容体数、環の数など 117 の記述子があり [RDKit] KE データセットの大きさを問わず、すべての記述子を使用した。

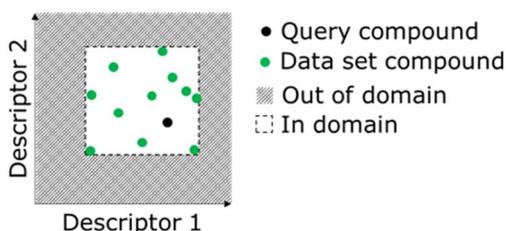


図 2. 適用可能範囲の定義

各 MIE/KE に関して、クエリー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た場合、当該クエリー化合物はモデルの適用可能範囲外と考え、それ以外は適用可能範囲内とした。

- Derek Nexus のアラートにマッピングされた MIE および KE

肝毒性に関連すると考えられるエンドポイントに対するアラートに KE および / または MIE をマッピングするために、Derek Nexus の知識ベースに既に存在する知識を活用した。肝障害に至るメカニズムとしては、ミトコンドリアの機能障害、トランスポーターの抑制、直接反応性を有する生体異物および反応性代謝物などがある [Roth and Lee, Gijbels and Vinken]。In vivo での肝毒性を記述した肝毒性エンドポイントに関するアラートには、KE および MIE の説明など障害の潜在的メカニズムに関する情報が含まれている。これらの KE および MIE の特定、ならびにアラートへのマッピングは、専門家による肝毒性アラートの分析に基づいて行った。同じ毒性を複数のメ

カニズムで発現しうる化合物クラスに対するアラートは、アラート説明において該当する key event とリンクさせた。また、肝毒性に関連する KE (ミトコンドリア機能障害など) を予測する Derek Nexus のエンドポイントを含めた。このエンドポイントは、分子起始反応 (MIE) ではなく、AOP のより下流の KE であるミトコンドリアへの影響 (ミトコンドリア機能障害) を評価するアッセイに基づいている。

一方、Derek Nexus には、化学物質の固有反応性および反応種への代謝活性化に関する広範な知識も収録されており、これらの知識は変異原性 (化学物質により引き起こされた核 DNA の損傷が原因となる) や皮膚感作 (皮膚タンパク質のハプテン化が特徴である) のエンドポイントに関するアラートで広くカバーされている。肝酵素による化学物質の代謝活性化に起因するハプテンの形成やミトコンドリア DNA の損傷は、肝毒性のメカニズムとしてよく知られている [Yuan and Kaplowitz]。したがって、変異原性および皮膚感作のエンドポイントに関するアラートを分析し、専門家が特定したメカニズムを踏まえて、関連する反応性に基づいた MIE エンドポイント (それぞれ、DNA 反応性求電子剤、タンパク質反応性求電子剤) にリンクさせた。代謝活性化の必要条件も考慮し、可能な場合には、カスタム知識ベースの 2 種のアラート、すなわち直接反応性を有する化合物に対するカスタマイズアラートと生体内活性化を要する化合物に対するカスタマイズアラートにアラートのパターンを分別した。

他の関連する key event に関する変異原性・皮膚感作アラートについても検討し、該

当する key event エンドポイント(酸化剤、核酸塩基模倣物など)を割り当てた。MIE/KE と各エンドポイントに対応するアラートの数の詳細な一覧を表 3 に示す。肝毒性プロファイラーにおいてクエリー化合物がこのようなアラートにマッチすると、肝毒性に至る潜在的メカニズムとして、対応する MIE および/または KE がユーザーに示される。

- リードアクロスモデル

肝毒性データベースから key event データを抽出し、複数のデータセットに存在する化合物に関しては保守的な判定を適用した。これにより key event ごとに 1 つのデータセットが得られ、次に不活性と標識された化合物を key event データセットから除外した。その後、構造フラグメントベースの fingerprint を利用して、各クエリー化合物を各 key event データセット中の化合物と比較した。これらの fingerprint を生成するアルゴリズムは Lhasa Limited 社で開発したもので、Sarah Nexus ソフトウェアで採用されている。2 つのフィンガープリントの類似性は Tanimoto 係数で評価した。Key event データセットの少なくとも 1 つの化合物に対して Tanimoto 係数が 0.7 以上である場合、そのクエリー化合物に当該 key event のフラグを付した。最も類似性の高い化合物(最大 3 個)を、それぞれ該当する Tanimoto 係数とともにアウトプットした。各 MIE/KE に関するリードアクロスモデルの予測に対し、3.2 項「適用可能範囲」に定義した適用可能範囲に関する情報を追加した。

- 機械学習モデル

肝毒性データベースの個々のデータセッ

トに基づき、Random Forest アルゴリズム [Breiman] と 2D RDKit 記述子を用いて、機械学習モデルを構築した。分散が 0 の記述子、およびピアソンの相関係数 $|R|$ が 0.95 を超える記述子は除外した。Random Forest アルゴリズムに用いた記述子の数はデータセットに依存したが、モデルの過学習を防ぐには記述子当たり 10 個以上の化合物が必要である。記述子の数がこの要件(トレーニング化合物 10 個に対して 1 個)を超過した場合には、活性に関する注釈(活性または不活性)との相関性が最も高い記述子を選択する方法をとった。Random Forest モデルのパラメータは次の通り: 1000 trees、equal size with replacement、split criterion - Gini index。

本モデルでクエリー化合物を処理すると、予測とその信頼性(注釈を予測した決定木の数をすべての決定木の数で除して求める)が得られる。各モデルから得られた信頼性は、個々の MIE/KE データセットに関して 5 層交差バリデーション法で求めた balanced accuracy (BA) 平均値により補正した。

1 つの MIE や KE に対して複数のデータセットが存在する場合、個々のモデルの信頼性の加重平均を計算することにより総合的な信頼性を求めた。総合的な信頼性の算出に用いたアルゴリズムと式は図 3 に示す。個々の信頼性は、不活性予測の場合にはマイナス、活性予測の場合にはプラスの値となる。

総合的な信頼性の符号によって、対応する予測(マイナスは不活性、プラスは活性)の注釈をつけた。最後に、総合的な信頼性の絶対値を計算する。総合的な信頼性の範囲は 0(信

信頼性が低い) ~ 1 (信頼性が高い) であり、可視化ツールではパーセンテージに変換した。

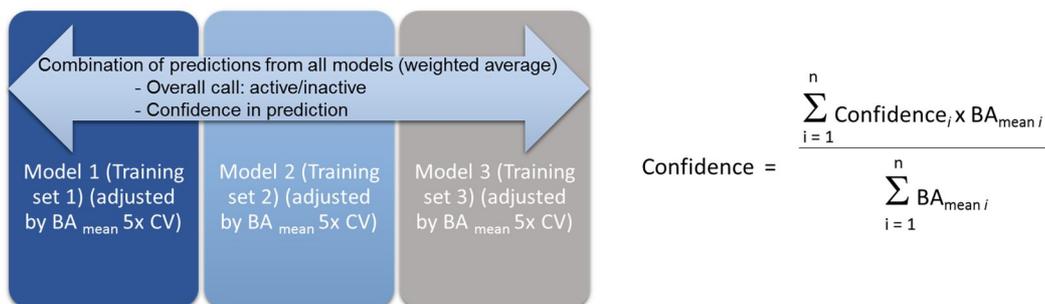


図 3. 交差バリデーション法

元のデータセットを 5 分割し、4 つをトレーニングセットとして用いて Random Forest モデルを作成、残りの 1 つをテストセットとして用いて balanced accuracy (BA) を導出し、5 つの BA の平均値を算出する。

適用可能範囲外 (「●適用可能範囲」の定義に従う) のクエリー化合物に関する予測は信頼性がないとみなし、信頼性スコアの計算対象から除外した。特定のエンドポイントに関するすべてのデータセットの適用可能範囲外にある化合物については、MIE に関する予測は得られなかった。

● 反応性代謝物に対するアラート (Kalgutkar アラート)

反応性代謝物に対するモデルは、文献で毒性作用への関与が報告されている既知の toxiphore に基づき、KNIME で作成した [Stepan et al.] 計 59 種類のアラートを作成し、反応種を生成する可能性があると思われる化学的特徴を SMARTS パターンとして収録した。これらのアラートは Kalgutkar アラートとし、SMARTS パターンとその名称の一覧を表 4 示した。各化合物に関して表示される結果には、反応性代謝物アラートの有無 (yes/no) およびヒットしたアラートの一覧が含まれる。

● WhichCyp 予測

反応性代謝物を生成しうる化学的特徴が存在したとしても、その化合物が必ずしも生体内活性化を受けるわけではないことは既知の通りである。したがって、主な CYP アイソフォーム 5 種 (1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) に対する結合を予測する KNIME の WhichCYP ノード [Rostkowski et al.] を用い、化合物の CYP 結合能に関する追加要件を導入した。

反応性代謝物を生成する可能性のある化学物質を確認するためのワークフローを、図 4 に要約する。

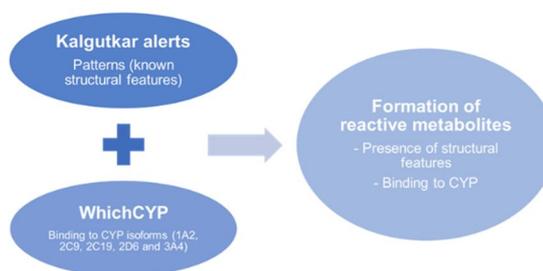


図 4. 反応性代謝物を生成する可能性の

ある化学物質を確認するワークフロー図

各クエリー化合物に関して WhichCYP ノードから得られる結果には、化学物質の CYP 活性部位への結合性の有無(yes/no)および結合する CYP アイソフォームの一覧が含まれる。

D. 考察

今回 MIP-DILI の結果を統合した肝毒性プロファイラーはヒト細胞株/タンパク質で得た *in vitro* データが用いられている。これは製薬会社 MIP-DILI のプロジェクトの目的としてのヒトでの医薬品による臨床毒性を予測することにあるため、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験系/モデルに重点が置かれているという現状がある。ヒト細胞株/タンパク質に関しては他の動物種よりも多くのデータが得られており、結果として、このようなデータを用いて作成したモデルでは、これまで動物試験のデータを用いてきたものより広い化学空間をカバーできるものと考えられる。

一方、昨年度まで予測検証用に使用してきた毒性試験データセットはげっ歯類反復投与毒性試験の結果を収集したもので、その肝毒性に関する注釈は同毒性について報告された最小作用量に基づいている。今回のモデルに使用された薬剤性肝障害のデータと齧歯類の肝毒性物質のデータの間に関係を示さないことが知られており、昨年度まで検証用に使用してきた毒性試験データセットに関して Cooper statistics の観点からプロファイラーの予測精度を分析することは適切ではないと考えられた。

その代わりに、各化合物に関してモデル化法で得られるすべての情報をユーザーに分

かりやすく表示するための可視化ツールをデザインした。例として、毒性試験データセットに含まれる化合物の1つを肝毒性プロファイラーで処理した際のアウトプットを図5に示す。各化合物について、固有のデータセット ID、構造情報、分子量、毒性試験データセットの反復投与試験に基づく注釈、そして Derek Nexus、リードアクロスモデル、機械学習モデルを含むすべてのアプローチをカバーした MIE/KE モデルから得られた結果が1つのビューに表示され、予測対象とする化学物質の様々なプロファイルに関する情報を一覧することができ、専門家による毒性予測を手助けすることが可能なツールを作成することができた。

参考文献

- Breiman, L. Random Forests. *Machine Learning*, 2001, 45, 5-32. doi: 10.1023/A:1010933404324
- Gijbels E, and Vinken M. An Update on adverse outcome pathways leading to liver injury. *Applied In Vitro Toxicology*, 2017, 3, 283-285. doi: 10.1089/aivt.2017.0027.
- Kalgutkar AS, Didiuk MT. Structural alerts, reactive metabolites, and protein covalent binding: how reliable are these attributes as predictors of drug toxicity? *Chem Biodivers*. 2009, 6, 2115-2137. doi: 10.1002/cbdv.200900055.
- Rostkowski, M., Spjuth, O. & Rydberg, P. WhichCyp: Prediction of cytochromes P450 inhibition.

Bioinformatics 29, 2051–2052 (2013).
doi: 10.1093/bioinformatics/btt325

RDKit: Open-Source Cheminformatics
Software. RDKit Nodes for KNIME
(trusted extension). Available at:
<https://tech.knime.org/community/rdkit>.
(Accessed: 25th January 2017)

Roth AD, and Lee M-Y. Idiosyncratic
drug-induced liver injury (IDILI):
potential mechanisms and predictive
assays. BioMed Research
International, 2017, Article ID
9176937. doi: 10.1155/2017/9176937.

Stepan AF, Walker DP, Bauman J, Price
DA, Baillie TA, Kalgutkar AS, and
Aleo MD. Structural alert/reactive
metabolite concept as applied in
medicinal chemistry to mitigate the
risk of idiosyncratic drug toxicity: a
perspective based on the critical
examination of trends in the top 200
drugs marketed in the United
States. Chemical Research in
Toxicology, 2011, 24, 1345-1410. doi:
10.1021/tx200168d.

Yuan L, Kaplowitz N. Mechanisms of
Drug Induced Liver Injury. Clinics in
Liver Disease, 2013, 17, 507–518.
doi: 10.1016/j.cld.2013.07.002.

E. 結論

H29年度は、前年度までに改良してきた
肝毒性に関連するプロファイラーを基にし
て作成した KNIME ワークフローに、ヒト
の薬物性肝障害予測システムの確立を目標
としたコンソーシアム (MIP-DILI) プロジ

エクトの成果 (Lhasa が収集) を基に構築
した肝毒性エンドポイントに関連する
MIE/KE のモデル化アプローチを統合した
KNIME ワークフローの作成を行った。こ
のプロファイラーでは、関連するエンドポ
イントに MIE/KE をマッピングすることに
より Derek Nexus の既存知識を活用し、リ
ードアクロスモデルには陽性化合物との構
造類似性に基づくアプローチを用いている。
また Random Forest 機械学習法により予
測を行うと共に、反応性代謝物を生成する
可能性および CYP450 活性部位への結合性
も示すものとなっている。このワークフ
ローに予測対象とする化合物を適用した結
果は、別途 Instant JChem を用いて、対象化
学物質に関して参照可能なすべての情報が
一覧できる可視化するツールも開発した。
今回、開発した KNIME ワークフローと可
視化ツールを用いることで、肝毒性の誘発
性に関する判別結果を単純に表示するこ
とはできないが、専門家が当該化合物の毒
性予測を行うのに有用なツールを開発す
ることができた考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tanabe, S., Kobayashi, K., Matsumoto, M.,
Serizawa, H., Igarashi, T., Yamada, T.,
Hirose, A. Toxicity of repeated 28-day
oral administration of acenaphthyl
lene in rats, (2017) *Fundam. Toxicol.*
Sci., 4, 247-259.

Matsumoto, M., Iso, T., Yamaguchi, H.,
Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A.
Summary information of human
health hazard assessment of existing

chemical substances (III), *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 135, 39-44, 2017.

Matsumoto, M., Furukawa, M., Kobayashi, K, Iso, T., Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A., A 28-day repeated oral-dose toxicity study of insecticide synergist N-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2.2.2] oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats, (2018) *Fundam. Toxicol. Sci.*, 5, 1-11.

Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Igarashi, T., Hirose, A. Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals, (2018) *Fundam. Toxicol. Sci.*, 5, 75-82.

2. 学会発表

Yamada, T., Hirose, A., Honma, M. Our recent experiences for development of read-across approach for chemical safety assessment, 10th World Congress of Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (August 2017, Seattle, Washington, USA).

Yamada, T., Hirose, A., Yang, C., Rathman, J. Development of a new database of non-cancer toxicity endpoints of industrial chemicals for improving TTC approach. 53rd European Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2017, Bratislava, Slovak).

Matsumoto, M., Miura, M., Kawamura, T., Yamada, T., Kobayashi, N., Suzuki, T., Nishimura, T., Hirose, A. Derivation

of health advisory values for sub-acute exposure of contaminants in drinking water. 53rd European Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2017, Bratislava, Slovak).

Yamada, T., Hirose, A., Yang, C., Rathman, J. Evaluation of Genotoxicity and Carcinogenicity Profile for the TTC Database Used to Develop Safety Thresholds of Industrial Chemicals. Society of Toxicology Society, 57th Annual Meeting and ToxExpo (March 2018, San Antonio, USA).

Hirose, A., Kawamura, T., Igarashi, T., Yamada, T., Inoue, K., Nishimura, T., Matsumoto, M. Expansion of the sub-acute reference doses for non-quality-standard chemicals in drinking water. Society of Toxicology Society, 57th Annual Meeting and ToxExpo (March 2018, San Antonio, USA).

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案特許
なし
3. その他
なし

図 5 可視化ツールのイメージ

The screenshot shows a web-based interface for chemical analysis. It includes several panels:

- STRUCTURE INFORMATION:** Displays the chemical structure of a molecule (9506001A) with its formula (C19H18ClN3O) and molecular weight (291.78).
- READ-ACROSS MODELS:** A table listing key event names and their applicability domains.

Key Event Name	In Applicability Domain
1 MitochondrialDysfunction_MMP_Disruption	yes
2 PXR_Agonist	yes
- Active examples:** A table showing similar structures with their similarity and distance scores.

Structure	Similarity Score (Tanimoto similarity based on Fingerprint)	Distance Score (Euclidian distance based on Lipinski's descriptors)
1	0.72	0.02
2	0.71	0.01
- MACHINE LEARNING MODELS: Random Forest:** A table showing predictions for key events.

Key Event Name	Prediction	Confidence (%)
1 BSEP_Inhibition	Inactive	57.3
2 PXR_Agonist	Inactive	51.7
3 NRP4_Inhibition	Inactive	95.0
- STRUCTURAL ALERT MODELS: Derek Nexus Alert Mapped to Key Event:** A table mapping alerts to key events.

Key Event Name	Bioactivation Required	Alert Number	Alert Name
1 Constitutive androstane receptor (CAR) binding	No	547	Phenylalkyltriazole or analog
2 CYP inhibition	No	547	Phenylalkyltriazole or analog
- REACTIVE METABOLITE:** A table showing potential reactive metabolites and their names.

Potential Reactive Metabolite	Alert Names
1 yes	Aryl-OH and Aryl-CO
2 yes	Chlorobenzene
- WhichCyp Prediction:** A table showing binding to CYP active sites and CYP450 isoforms.

Binding	CYP450 Isoform
1 yes	1A2
2 yes	2C19

Callouts provide additional context for these sections:

- List of the Read-across KE models:** Name of KE endpoints, Applicability domain (yes/no).
- Machine Learning Models:** Key Event name, Prediction, Confidence in prediction (%).
- Prediction for Reactive Metabolites:** Potential for formation of Reactive Metabolites, Name of (Kalgutkar) alert(s).
- WhichCyp Prediction:** Binding to CYP active site, CYP450 isoforms.
- List of KE names (mapped to Derek Nexus alerts):** Name of KE endpoints, Requirement for bioactivation (yes/no), Alert number (DX knowledgebase), Name of DX alert.
- Supporting Active examples for Read-across models:** Structure of example, Similarity Score (Tanimoto similarity on fingerprints), Distance score (Euclidian distance on Lipinski's descriptors).

表 1. 肝毒性データベースに含まれるデータソース

Dataset ID	Dataset description	Link
Aleo	Hepatology_2014_60_1015-1022	https://doi.org/10.1002/hep.27206
Aleo_2017	Chem Res Toxicol_2017_30_1219-1229	https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.7b00048
Broccatelli	J Med Chem_2011_54_1740-1751	https://doi.org/10.1021/jm101421d
ChEMBL_TargetId=CHEM BL1870	ChEMBL data on agonists of Retinoid X receptor beta	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL1870
ChEMBL_TargetId=CHEM BL2003	ChEMBL data on agonists of Retinoic acid receptor gamma	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL2003
ChEMBL_TargetId=CHEM BL2004	ChEMBL data on agonists of Retinoid X receptor gamma	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL2004
ChEMBL_TargetId=CHEM BL2008	ChEMBL data on agonists of Retinoic acid receptor beta	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL2008
ChEMBL_TargetId=CHEM BL2034	ChEMBL data on agonists of Glucocorticoid receptor	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL2034
ChEMBL_TargetId=CHEM BL2047	ChEMBL data on agonists of Bile acid receptor FXR	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL2047
ChEMBL_TargetId=CHEM BL2055	ChEMBL data on agonists of Retinoic acid receptor alpha	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL2055

Dataset ID	Dataset description	Link
ChEMBL_TargetId=CHEM BL206	ChEMBL data on agonists of Estrogen receptor alpha	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL206
ChEMBL_TargetId=CHEM BL2061	ChEMBL data on agonists of Retinoid X receptor alpha	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL2061
ChEMBL_TargetId=CHEM BL235	ChEMBL data on agonists of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL235
ChEMBL_TargetId=CHEM BL239	ChEMBL data on agonists of Peroxisome proliferator-activated receptor alpha	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL239
ChEMBL_TargetId=CHEM BL242	ChEMBL data on agonists of Estrogen receptor beta	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL242
ChEMBL_TargetId=CHEM BL2808	ChEMBL data on agonists of LXR-alpha	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL2808
ChEMBL_TargetId=CHEM BL3201	ChEMBL data on agonists of Aryl hydrocarbon receptor	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL3201
ChEMBL_TargetId=CHEM BL3401	ChEMBL data on agonists of Pregnane X receptor	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL3401
ChEMBL_TargetId=CHEM BL3979	ChEMBL data on agonists of Peroxisome proliferator-activated receptor delta	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL3979
ChEMBL_TargetId=CHEM BL4093	ChEMBL data on agonists of LXR-beta	https://www.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEM BL4093
Chen	Drug Discovery Today_2016_21_648-653	https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.015
De Bruyn	Mol Pharmacol_2013_83_1257-1267	https://doi.org/10.1124/mol.112.084152
Greene	Chem Res Toxicol_2010_23_1215-1222	https://doi.org/10.1021/tx1000865
Karlgren	J Med Chem_2012_55_4740-4763	https://doi.org/10.1021/jm300212s
Kock	Drug Metab Dispos_2014_42_665-674	https://doi.org/10.1124/dm.d.113.054304
Kruhlak	Toxicology_2014_321_62-72	https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.009
Matsson	J Pharmacol Exp Ther_2007_323_19-30	https://doi.org/10.1124/jpet.107.124768
Morgan	Toxicol Sci_2013_136_216-241	https://doi.org/10.1093/toxsci/kft176
Mulliner	Chem Res Toxicol_2016_29_757-767	https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00465
Pedersen	Toxicol Sci_2013_136_328-343	https://doi.org/10.1093/toxsci/kft197
PubChem_AID=1159531	qHTS assay to identify small molecule agonists of the RXR signaling	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1159531

Dataset ID	Dataset description	Link
	pathway: Summary	
PubChem_AID=1159553	qHTS assay to identify small molecule agonists of the retinoic acid receptor (RAR) signaling pathway	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1159553
PubChem_AID=1451	Single point confirmation for ABC transporter inhibitors: specifically ABCB1 screen, ABCG2 counter-screen	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1451
PubChem_AID=1453	Single point confirmation screening for ABC transporter inhibitors: specifically ABCG2 screen, ABCB1 counter-screen	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1453
PubChem_AID=1689	Dose Response for ABC transporter inhibitors: specifically ABCB1 screen, ABCG2 counter-screen	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1689
PubChem_AID=1690	Dose Response for ABC transporter inhibitors: specifically ABCG2 screen, ABCB1 counter-screen	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1690
PubChem_AID=651754	qHTS assay for small molecule disruptors of the mitochondrial membrane potential - 1 hr assay	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/651754
PubChem_AID=651755	qHTS assay for small molecule disruptors of the mitochondrial membrane potential - 5 hr assay	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/651755
PubChem_AID=720637	qHTS assay for small molecule disruptors of the mitochondrial membrane potential: Summary	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/720637
PubChem_AID=720659	qHTS assay for small molecule activators of the human pregnane X receptor (PXR) signaling pathway	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/720659
PubChem_AID=720719	qHTS assay to identify small molecule agonists of the glucocorticoid receptor (GR) signaling pathway: Summary	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/720719
PubChem_AID=743077	qHTS assay to identify small molecule agonists of the estrogen receptor alpha (ER-alpha) signaling pathway: Summary	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/743077
PubChem_AID=743122	qHTS assay to identify small molecule that activate the aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathway: Summary	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/743122

Dataset ID	Dataset description	Link
PubChem_AID=743140	qHTS assay to identify small molecule agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) signaling pathway: Summary	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/743140
PubChem_AID=743227	qHTS assay to identify small molecule agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ) signaling pathway: Summary	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/743227
PubChem_AID=743239	qHTS assay to identify small molecule agonists of the farnesoid-X-receptor (FXR) signaling pathway: Summary	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/743239
Sakatis	Chem Res Toxicol_2012_25_2067-2082	https://doi.org/10.1021/tx300075j
Schadt	Toxicology In Vitro_2015_30_429-437	https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.019
Warner	Drug Metab Dispos_2012_40_2332-2341	https://doi.org/10.1124/dmd.112.047068
Xu	Toxicol Sci_2008_105_97-105	https://doi.org/10.1093/toxicology/kfn109

表 2 肝毒性データベースの項目の概要

Endpoint Name	DatasetId	Species	Number of Active Compounds	Number of Inactive Compounds
agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL3201	Human	134	18
agonist	PubChem_AID=743122	Human	755	5709
Inhibition	Matsson	Human	42	77
Inhibition	PubChem_AID=1453	Human	16	255
Inhibition	PubChem_AID=1690	Human	16	24
Inhibition	Aleo_2017	Human	33	87
Inhibition	Morgan	Human	135	430
Inhibition	Pedersen	Human	81	150
Inhibition	Warner	Human	321	289
2_MechanismDependentInhibitor	Sakatis	Human	15	157
19_MechanismDependentInhibitor	Sakatis	Human	34	138
9_MechanismDependentInhibitor	Sakatis	Human	14	158
6_MechanismDependentInhibitor	Sakatis	Human	15	156
4-7BQ_MechanismDependentInhibitor	Sakatis	Human	21	151

Endpoint Name	DatasetId	Species	Number of Active Compounds	Number of Inactive Compounds
4-DEF_MechanismDependentInhibitor	Sakatis	Human	36	134
4_TimeDependentInhibitor	Schadt	Human	14	102
alpha_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL206	Human	395	506
alpha_Agonist	PubChem_AID=743077	Human	322	6570
alpha_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL242	Human	317	601
alpha_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL2047	Human	436	206
alpha_Agonist	PubChem_AID=743239	Human	88	6327
alpha_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL2034	Human	422	181
alpha_Agonist	PubChem_AID=720719	Human	147	6549
alpha_Agonist	Sakatis	Human	82	102
alpha_Agonist	Schadt	Human	35	84
alpha_Agonist	Chen	Human	420	228
alpha_Agonist	Greene	Human	303	132
alpha_Agonist	Kruhlak	Human	176	102
alpha_Agonist	Mulliner	Human	1140	452
alpha_Agonist	Sakatis	Human	109	103
alpha_Agonist	Schadt	Human	54	65
alpha_Agonist	Xu	Human	147	135
alpha_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL2808	Human	313	174
alpha_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL4093	Human	457	811
Inhibition	Aleo_2017	Human	59	61
Inhibition	Morgan	Human	23	502
Inhibition	Kock	Human	46	36
Inhibition	Morgan	Human	39	519
Inhibition	Kock	Human	48	35
Inhibition	Morgan	Human	93	463
Inhibition	Aleo	Rat	26	42
Inhibition	PubChem_AID=651754	Human	123	1020
Inhibition	PubChem_AID=651755	Human	110	1082
Inhibition	PubChem_AID=720637	Human	871	4916
Inhibition	De Bruyn	Human	186	1625
Inhibition	Karlgren	Human	76	145
Inhibition	De Bruyn	Human	120	1690
Inhibition	Karlgren	Human	45	177
Inhibition	Karlgren	Human	45	177
Inhibition	Broccatelli	Not specified	621	587
Inhibition	PubChem_AID=1451	Human	18	253
Inhibition	PubChem_AID=1689	Human	9	31
alpha_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL239	Human	1426	536

Endpoint Name	DatasetId	Species	Number of Active Compounds	Number of Inactive Compounds
delta_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL3979	Human	899	499
delta_Agonist	PubChem_AID=743227	Human	67	6077
gamma_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL235	Human	2037	584
gamma_Agonist	PubChem_AID=743140	Human	178	6256
gonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL3401	Human	137	271
gonist	PubChem_AID=720659	Human	207	1664
rho_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL2055	Human	47	91
rho_Agonist	PubChem_AID=1159553	Human	325	5471
tau_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL2008	Human	85	46
mu_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL2003	Human	57	42
rho_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL2061	Human	161	115
rho_Agonist	PubChem_AID=1159531	Human	150	5384
tau_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL1870	Human	40	62
mu_Agonist	ChEMBL_TargetId=ChEMBL2004	Human	40	59

表3 DEREK から活用したアラート一覧

Endpoint	Number of alerts
3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibition	1
Acetyl CoA depletion	3
Androgen receptor binder	3
Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor	1
Aryl hydrocarbon receptor binder	2
beta-Oxidation competitive substrate	2
beta-Oxidation inhibition	2
Bile transport competitive substrate (M)	1
Binding to tubulin	1
Carnitine depletion	1
Carnitine palmitoyltransferase I inhibition	1
Chelation of metal ions	1
Constitutive androstane receptor (CAR) binding	1
CYP inhibition (M)	2
CYP inhibition	1
DNA reactive electrophile	47
DNA reactive electrophile (M)	64
Electron Transport Chain Inhibition	2
Electron Transport Chain Inhibition - succinate-coenzyme Q reductase (SQR)	1
Estrogen receptor binder	17
Glutathione (GSH) depletion	1
Glutathione (GSH) depletion (M)	14
Inhibition of RNA polymerase (M)	1
Kreb cycle inhibition - alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex inhibition	1
Low density lipoprotein (Lys-adduct) reactive electrophile (M)	1
Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTTP) antagonist	2
Mitochondrial dysfunction	24
Nucleobase Mimic	4
Nucleophilic thiol exchange compound	1
Nucleophilic thiol exchange compound (M)	2
Oxidising agent	19
Oxidising agent (M)	20
PPAR binder	7
Protein reactive electrophile	56
Protein reactive electrophile (M)	63
Protein reactive nucleophile	1
Redox Cycler (Metal)	1
RNA reactive electrophile (M)	1
Uncoupler of oxidative phosphorylation	4

表 4 . Kalgutkar アラートの SMARTS パターン

SMARTS pattern	Pattern Name
	N-Substituted Piperidines
	Aryl-CH and Aryl-CX
	Mono- and di-alkyl sulfate or alkyl sulfonate
	Chlorobenzene
	1,3-Benzodioxole
	2-Alkylimidazole
	2-Alkylpyrrole
	2-Aminothiazole
	Alkylaldehyde
	Alkylhydrazine

SMARTS pattern	Pattern Name
	Alkylimidazole
	Alkylpyrrole
	Alkyne
	Anilide
	Aniline
	Arylacetic acid
	Arylhydrazine
	Benzodiazepine
	Benzothiophene
	Bromobenzene

SMARTS pattern	Pattern Name
	Catechol
	Cyclopropyl amine
	Dialkoxyaromatic
	Dialkyltriazine
	Dihaloalkane
	Electrophilic ester
	Epoxide
	Furan
	Heteroarylacetic acid
	Hydrazide

SMARTS pattern	Pattern Name
	o-Alkylphenol
	o-Hydroxyaniline
	p-Alkoxyaniline
	p-Alkylanilide
	p-Alkylaniline
	p-Alkylaromatic ether
	p-Alkylphenol
	p-Hydroxyanilide
	p-Hydroxyaniline

	SMARTS pattern	Pattern Name
41		Thiazolidinedione
42		Thioamide
43		Thioester
44		Thiophene
45		Thiourea
46		beta-Lactam
47		o-Alkoxyaniline
48		o-Alkylanilide
49		o-Alkylaniline
50		o-Alkylaromatic ether

	SMARTS pattern	Pattern Name
51		o-Alkylphenol
52		o-Hydroxyaniline
53		p-Alkoxyaniline
54		p-Alkylanilide
55		p-Alkylaniline
56		p-Alkylaromatic ether
57		p-Alkylphenol
58		p-Hydroxyanilide
59		p-Hydroxyaniline

平成 29 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

分担研究課題名：反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの開発

分担研究者 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 Integrated Approaches to Testing and Assessment (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、我々はベンゾトリアゾールの肝毒性を対象に 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。肝トランスクリプトーム情報をカテゴリーの評価のために統合したこと、予測の不確実性についての説明が透明性のある方法で提供されていることが評価された。同時にレビューされた他の反復投与毒性のケーススタディを合わせて得られた教訓として、リードアクロスの結果の受入れには、リードアクロスのデータの質と量、類似性の仮説に対する信頼性、*in vitro* 試験法のデータを含むサポート情報と証拠量などを考慮することが必要とされた。また、類似性やリードアクロスに関連する不確実性についての説明、トキシコキネティクスデータの不足が課題として挙げられた。

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や将来のリスク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

これまでに我々は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、本研究ではベンゾトリアゾール類の反復投与による肝毒性エンドポイントを対象に、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ゼーション、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、吸収・分布・代謝・排泄 (ADME)、Mode of Action (MOA) /Adverse Outcome Pathway (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、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、*in vitro* 試験によるプロファイリ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 や代替法等の適用範囲も論じる。

[データギャップ補完の戦略と結論] “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。“結論”では、不確実性を考慮しつつ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。

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？

オリジナルの 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、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

本ケーススタディは、化審法の化学物質のスクリーニング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。

ベンゾトリアゾールは、UV 分解から保護するために様々なポリマー製品に添加される UV 吸収剤である。このグループのいくつかの物質は、環境およびヒト健康に懸念を有する新たな汚染物質として認識されている。ベンゾトリアゾールのカテゴリーは、2009 年の米国 EPA 高生産量チャレンジプログラムと 2011 年の NTP Chemical Information Review によって評価されている。データが乏しい特定の物質の環境影響を評価するために、Weight of Evidence (WoE) アプローチが用いられたが、ヒト健康エンドポイントに対してデータが乏しい物質を含めた評価は試みられていない。ベンゾトリアゾール類の反復投与毒性の試験結果は、肝毒性がこれらの化合物の主要な標的臓器であることを示しているが、毒性レベルは置換基の種類および数によって著しく変化することが示されている。そこで、本研究では、肝臓のトキシコゲノムプロファイルを 5 つのカテゴリー物質について分析し、カテゴリー評価に統合した。試験データを持たない 3 物質の標的臓器と NOAEL 値を、毒性試験データが利用できるカテゴリー中の 9 物質に基づいたリード

アクロスによって予測し、化審法有害性クラスに従って分類した（表1）。

すべての転写プロファイルは、核内受容体経路の活性化および/または酸化ストレスの誘導が、ベンゾトリアゾールの肝毒性影響と関連している可能性があることが示された。さらに、構造的な置換基の差がわずかであっても、転写プロファイルに影響を与えた。これらの結果は、転写物データが類似の作用様式をもつアナログ物質の選択をサポートできることを示唆している。しかしながら、現段階では転写物データは全てのカテゴリー物質で利用可能ではなく、肝毒性のAOPは、試験およびデータ分析のためのリソースの制約のために十分に整理できなかった。毒性試験データがないターゲット物質と毒性試験データが利用できるソース物質の間で橋渡しする遺伝子発現に関する情報と体内動態に関する情報を強化することが、リードアクロス評価における不確実性を低減するために有用であると考えられた。

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。

- ・ 試験目的が明確に説明されている。
- ・ トランスクリプトーム情報をカテゴリーの正当化のため組み入れている。
- ・ 公開文献、QSAR、及びトランスクリプトームからの全ての利用可能な情報を統合し、反復投与毒性及び代謝データに基づく標的物質に関する予測を提供している。
- ・ 予測の不確実性についての説明が透明性のある方法で提供されている。

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。

- ・ ケーススタディのオリジナルバージョンにおいて、化合物12の影響レベルは、最も近い構造類似体ではあるが non-GLP データのみがある、化合物7から評価された。non-GLP データの報告は考慮されるべき全ての影響を網羅しておらず、影響レベル評価が過小評価される可能性を指摘された。代わりに化合物12の影響レベルは、GLP データがあり、スクリーニングにより保守的な評価を引き出す化合物6から評価すべきであると示唆された。コメントに基づきこの点を改訂した。
- ・ なぜ肝毒性のみが考慮され、腎毒性については考慮されなかったかについて説明が求められた。腎毒性がカテゴリー中の3化合物でのみ観察され、これら全ての腎臓の変化が肝毒性の出現と同用量、あるいは高用量で出現したことを理由に、肝毒性がベンゾトリアゾール類のハザード評価にはより重要であると説明した。
- ・ トランスクリプトーム試験の記述を拡大することが求められた（例えば肝毒性のメカニズムと各試験の関連性、トランスクリプトーム試験を実施した特定の物質の選択理由）。コメントに基づきこの点を改訂した。

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。

- ・ ケーススタディでの3つのリードアクロス評価のうち、2つについてはターゲット物質とソース物質との類似性における不確実性が高いとされた。カテ

ゴリーについて、ソース物質のわずかな構造変化が異なる毒性レベルをもたらすことが観察されているため、サブカテゴリーの構造境界を定義することは困難であった。さらに、機序的類似性（例えば ADME データ、トランスクリプトームデータ）をサポートするデータがこれら 2 つのリードアクロス評価には不足していた。

- ・ トランスクリプトームデータが、ベンゾトリアゾールの想定メカニズムに基づき、サブカテゴリー形成をサポートしうることを実証したが、サブカテゴリー形成のための不確実性は、MOA/AOP が十分記述されていない理由のため中程度のレベルとされた。

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。一方、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。

本ケーススタディのレビュー経験に基づき、可能性のあるガイダンス開発のために以下の範囲が特定された：

- ・ トランスクリプトームデータ及び解釈と関連の不確実性の記述の報告法
- ・ ゲノムデータの使用を含むカテゴリー形成の仮説の構築
- ・ 不確実性解析：統合された結論に影響を与えることなく許容され得る不確実性レベルが明確にされていない

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(OECD, 2017, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm#case-studies>)。

D. 考 察

2016 年度の OECD IATA Case Studies Project (第 2 サイクル) では、本ケーススタディを含めて以下の計 5 つのケーススタディが提出され、レビューが行われた。

- ・ 2016-1: Repeated-Dose Toxicity of Phenolic Benzotriazoles [Japan]
- ・ 2016-2: Pesticide Cumulative Risk Assessment & Assessment of Lifestage Susceptibility [the United States]
- ・ 2016-3: 90-Day Rat Oral Repeated-Dose Toxicity for Selected n-Alkanols: Read-Across [ICAPO]
- ・ 2016-4: 90-Day Rat Oral Repeated-Dose Toxicity for Selected 2-Alkyl-1-alkanols: ReadAcross [ICAPO]
- ・ 2016-5: Chemical Safety Assessment Workflow Based on Exposure Considerations and Non-Animal Methods [JRC/BIAC]

表 2 には第 1 回と第 2 回のレビューサイクルでレビューされた 9 件のケーススタディの概要を示す。

ケーススタディで示された評価手法は、化学物質のグルーピング(7 件のケーススタディ)に基づくリードアクロスによるデータギャップ補完、リードアクロスではなく累積リスクアセスメントのための化学物質のグループ分け(ケーススタディ 2016-

2) 安全性評価ワークフロー(ケーススタディ 2016-5)であった。このワークフローにはリードアクロス評価が含まれているが、ケーススタディの焦点はワークフローのコンセプトであった。

ケーススタディの対象となるエンドポイントは、反復投与毒性(6件のケーススタディ)、神経毒性(1件)、遺伝毒性(1件)および生物濃縮(1件)であった。9件のケーススタディのうち5件が反復投与毒性のリードアクロスであった。

すべてのケーススタディは、MOA/AOP(4ケーススタディ)の使用、不確実性の把握とコミュニケーション(5ケーススタディ)、新しいアプローチ手法(NAM)の使用(5ケーススタディ)、低毒性/無毒性予測(ケーススタディ)を検討していた。

2015年の最初のレビューサイクルでは、リードアクロスのケーススタディ(OECD, 2016a)から、ガイダンスを発展させるための以下の6つの分野が特定された。

1. リードアクロスの範囲と文脈の記述
2. MOA/AOPに基づく仮説の構築
3. アナログ/カテゴリーの領域の定義
4. データギャップ補完の正当化
5. 不確実性の分析とレポートング
6. 総合的な結論

2016年の2回目のレビューサイクルで確認された、ガイダンスをさらに発展させるための主な追加的側面は次のとおりであった。

MOA/AOPに基づく仮説の構築: この領域は、2015年の第1回レビューサイクルのリードアクロスケーススタディから特定された。この領域に関する別の側面が、第2回レビューサイクルのリードアクロスを使用

しない2つのケーススタディから得られた。

- ・ リスク評価のためにカテゴリーアプローチを適用する方法。すなわち、同じAOPを介して作用する物質の累積リスクアセスメントへ使用する方法(ケーススタディ 2016-2)
- ・ グループ化における類似性以外の問題に対処するためにIATAにAOP情報を組み込む方法(例: ケーススタディ 2016-5のAOPに基づくインビトロ試験の適用)

低毒性/無毒性予測の決定論理: 陽性の予測(例えば標的毒性を引き起こす分子開始イベントに基づくグループ分け)のためのリードアクロスアプローチが開発されている。一方、低毒性/無毒性のリードアクロスのための有望な調和の取れたアプローチは、その本質的な困難さ故に開発されていない。

しかし、将来の規制上の決定において、低毒性/無毒性予測は重要である。ケーススタディ 2016-3および2016-4はこのような予測を成功裏に実証した。低毒性/無毒性予測のための決定論理は、今後のガイダンスの発展のための領域の1つになると考えられる。New Approach Methodologies (NAM)の導入: 第2回レビューサイクルの5つのケーススタディでは、IATAにおけるNAMデータの使用例が異なっていた。レビューの経験に基づいて、この分野におけるさらなるガイダンスのために、以下の点が確認された。

- ・ NAMの記述方法: 非ガイドラインのインビトロ試験方法を記述するためのOECDガイダンス文書(OECD, 2014)は、背景情報として使用することができる。IATA(OECD, 2016b)で使用されるDefined Approachの報告に関

する OECD ガイダンス文書の個々の情報源を報告するためのテンプレートは、NAM またはキネティクスモデルの報告に使用することができる。しかし、プロジェクトでレビューされた IATA ケーススタディのタイプに適用するには、テンプレートの一部の変更が必要である。

- ・ ケーススタディにおいて NAM の結果とデータを報告する方法
- ・ NAM データの使用方法
- ・ NAM の不確実性の問題に対処する方法

不確実性分析と報告: この領域は、最初のレビューサイクルで、さらなるガイダンスの開発のための最も重要な分野の 1 つとして特定された。第 2 回レビューサイクルのケーススタディにおいても、不確実性を把握して伝達することの重要性が実証された。リードアクロスに対する不確実性の指針は、化学物質のグループ化に関する OECD ガイダンスの一部であるべきであるとされた。ケーススタディ 2016-3, 2016-4, 2015-1, 2015-2 で使用されている既存の不確実性テンプレート (Wu et al., 2010; Blackburn & Stuard, 2014; Schultz et al., 2015) は、ガイダンス開発の出発点となりうる。

E. 結論

このプロジェクトの 2 回目のレビューサイクルでは、5 件のケーススタディがレビューされた。そのうちの 3 つは、リードアクロスのケーススタディ、1 つは化学物質のグループ化による累積リスク評価のケーススタディ、もう 1 つは、動物試験に依存しない曝露ベースの化学物質安全性評価ワークフローに関するケーススタディであっ

た。プロジェクトチームによるケーススタディのレビューでは、5 つのケーススタディのすべてが、IATA 内の代替アプローチをさまざまなアプローチで実用的に使用していることを示し、IATA の使用を促進するために加盟国が共有すべき多くの貴重な知識を含んでいることが明らかになった。

5 つのケーススタディのレビュー結果に基づいて、IATA のさらなるガイダンス開発のために必要な分野が更新された。特に、2 つの新しい領域が優先度の高い領域として識別された。1 つは、NAM の使用である。5 つのケーススタディはすべて、IATA の機序的な妥当性を高めるための新しいアプローチ手法の使用例を示していた。もう一つは、低毒性/無毒性の領域である。低毒性/無毒性のためのリードアクロスの調和の取れたアプローチは、その本質的な困難さのために開発されていない。このレビューサイクルの 2 つのケーススタディは、このような予測を成功裏に実証した。不確実性の分析/報告は、第 2 回レビューサイクルにおいても依然として優先度の高い分野として識別された。

反復投与毒性のリードアクロスから得られた教訓としては、以下の点が挙げられる。

1. リードアクロスの結果の受入れは、基本的に次の 3 つの側面によって推進される。
 - ・ リードアクロスのデータの質と量。
 - ・ 類似性の仮説に関連する信頼性。
 - ・ インビトロ試験法のデータを含むサポート情報と WoE。
2. リードアクロス予測の信頼性は、以下の観点から不確実性を減少させることによって高めることができる。
 - ・ 透明性：リードアクロス予測を受け入

れるための基本となるものである。予測がどのように導出されたのか、またそれが意図された目的のために正当化された理由を科学的に説明することによって予測を正当化する必要がある。細部のレベルは目的に合っていないなければならない。

- ・ 機序的な蓋然性：リードアクロス予測を受け入れるために重要である。毒性学的関連性を示す必要がある。*in vitro*の影響を目的の *in vivo* エンドポイントに結びつける手段を提供する。AOPは、先端のエンドポイントへリンクするキーイベントを示唆することができる。
 - ・ WoE：WoEの増加は、類似性の正当性とリードアクロスの議論の完全性の両方の不確実性を低減する。Many to oneの予測は、one to oneの予測よりも優れている。*In vitro* および代替アプローチのデータは、WoEを改善し得る。
 - ・ 仮説の検証：*in vitro*法を *in silico*法に組み込むことにより、比較的迅速かつ安価な仮説に基づく試験および評価が可能になる。より高いレベルの確実性が要求される可能性が高い場合に、トキシコダイナミクスの不確実性を減少させ、“低毒性/無毒性”予測の受容を増加させることができる。
3. 不確実性の原因を明らかにする必要がある。識別するだけでは不十分である。不確実性には、主に2つの主要な問題に分かれるさまざまな要素が含まれる。一つは類似性の正当化(例えば、異なる試験条件からのデータの使用)に関連する不確実性であり、もうひとつはリードアクロスの議論の完全性に関連す

る不確実性(例えば、機序的妥当性)である。

4. MoAを明確に記載することは必ずしも可能ではないが、不確実性が少ないことは強いメカニズムの妥当性に直結する。毒性学的に関連する *in vitro* または代替方法のデータによってトキシコダイナミクスをサポートすることにより、機序的な妥当性の信頼性を高めることができる。
5. リードアクロスを定量化する際の制限事項として以下が挙げられる。
 - ・ 適切な *in vivo* データの入手可能性。
 - ・ トキシコダイナミクスをサポートする毒性学的に関連する *in vitro* または代替方法のデータの不足。
 - ・ しかし、反復投与エンドポイントでのリードアクロスの主な制約は、トキシコキネティクスのデータと理解の欠如である。

IATA Case Studies Project において我々が提案した反復投与毒性のケーススタディ並びに他のケーススタディも含めたレビューの経験と議論の共有により得られた、リードアクロスの信頼性と結果の受け入れ性の向上へ向けた教訓と課題は、化審法のスクリーニング評価や将来のリスク評価へカテゴリーアプローチ手法を適用するとき有用となると考えられる。

F. 参考文献

- Blackburn, K. and S.B. Stuard (2014) A framework to facilitate consistent characterization of read across uncertainty. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **68**, 353-362.
- OECD (2014), Guidance document for

describing non-guideline *in vitro* test methods, Series on Testing & Assessment No. 211.

OECD (2016a), 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.

OECD (2016b), Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within Integrated Approaches to Testing and Assessment, Series on Testing and Assessment No. 255.

OECD (2017), Report on considerations from case studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA), Second review cycle (2016); Case studies on grouping methods as a part of IATA, Series on Testing and Assessment No. 270.

Schultz, T.W., Amcoff, P., Berggren, E., Gautier, F., Klaric, M., Knight, D.J., Mahony, C., Schwarz, M., White A., Cronin, M.T.D. (2015), A strategy for structuring and reporting a read-across prediction of toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **72**, 586-601.

Wu, S., Blackburn, K., Amburgey, J., Jaworska, J., Federle, T. (2010) A framework for using structural, reactivity, metabolic and physico chemical similarity to evaluate the

suitability of analogs for SAR-based toxicological assessments. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **56**, 67-81.

G. 研究発表

1. 論文発表

Tanabe, S., Kobayashi, K., Matsumoto, M., Serizawa, H., Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A. Toxicity of repeated 28-day oral administration of acenaphthylene in rats, (2017) *Fundam. Toxicol. Sci.*, **4**, 247-259.

Matsumoto, M., Iso, T., Yamaguchi, H., Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (III), *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **135**, 39-44, 2017.

Yamada, T and Hirose, A. Case study on the use of an integrated approach to testing and assessment for the repeated-dose toxicity of phenolic benzotriazoles, Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Series on Testing & Assessment No. 271. 1-44, 2017.

Matsumoto, M., Furukawa, M., Kobayashi, K., Iso, T., Igarashi, T., Yamada, T., Hirose, A. A 28-day repeated oral-dose toxicity study of insecticide synergist N-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo [2.2.2] oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats, (2018) *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**, 1-11.

Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Igarashi, T., Hirose, A. Male-specific

prolongation of prothombin time by industrial chemicals, (2018) *Fundam. Toxicol. Sci.*, 5, 75-82.

山田 隆志. OECDにおけるQSAR、AOPの開発状況 (2018). 皮膚. 技術情報協会. *In press*

2. 学会発表

山田 隆志, 全身毒性の予測へ向けた毒性データベース - 透明性・データの共有・国際動向 - , 第44回日本毒性学会大会シンポジウムシンポジウム: インビトロ・インシリコ手法による全身毒性予測評価の現状と課題.(2017年7月、横浜).

Yamada, T., Hirose, A., Honma, M. Our recent experiences for development of read-across approach for chemical safety assessment, 10th World Congress of Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (August 2017, Seattle, Washington, USA).

Yamada, T., Hayahshi, M., Honma, M. Toxicity Databases of Chemical Substances in Japan to Improve *in Silico* Approaches for Regulatory Safety Assessment. 53rd European Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2017, Bratislava, Slovak).

Yamada, T., Hirose, A., Yang, C., Rathman, J. Development of a new database of non-cancer toxicity endpoints of industrial chemicals for improving TTC approach. 53rd European Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2017, Bratislava, Slovak).

Matsumoto, M., Miura, M., Kawamura, T., Yamada, T., Kobayashi, N., Suzuki, T., Nishimura, T., Hirose, A. Derivation of health advisory values for sub-acute exposure of contaminants in drinking water. 53rd European Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2017, Bratislava, Slovak).

Yamada, T. Toxicity Databases of Chemical Substances in Japan to Improve *in Silico* Approaches for Regulatory Safety Assessment. 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens, (November 2017, Incheon, Korea).

Yamada, T., Hirose, A., Yang, C., Rathman, J. Evaluation of Genotoxicity and Carcinogenicity Profile for the TTC Database Used to Develop Safety Thresholds of Industrial Chemicals. Society of Toxicology Society, 57th Annual Meeting and ToxExpo (March 2018, San Antonio, USA).

Hirose, A., Kawamura, T., Igarashi, T., Yamada, T., Inoue, K., Nishimura, T., Matsumoto, M. Expansion of the sub-acute reference doses for non-quality-standard chemicals in drinking water. Society of Toxicology Society, 57th Annual Meeting and ToxExpo (March 2018, San Antonio, USA).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

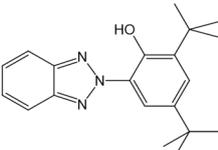
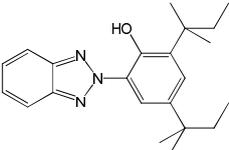
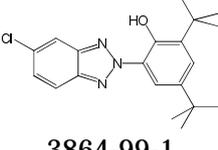
2. 実用新案特許

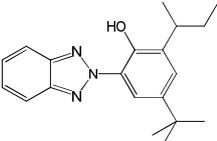
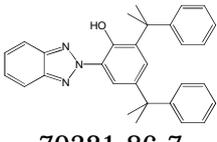
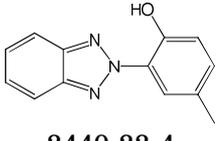
なし

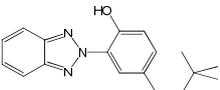
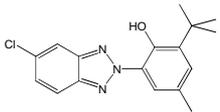
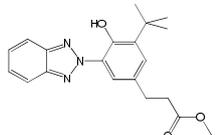
3. その他

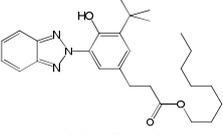
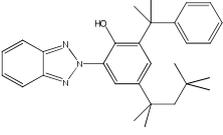
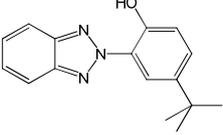
なし

表1. ベンゾトリアゾールカテゴリーのIATAによる評価結果のサマリー

No.	Chemical structure Chemical name CAS No.	Sub Category	Transcriptomic profile	Repeated-dose toxicity		
				Experimental results (GLP/non-GLP)	Integrated conclusion (read-across)	D value (hazard assessment value)*
1	 3846-71-7	1	CAR PXR PPAR Nrf2	Species: rats Dosing: 0, 0.1, 0.5, 2.5 mg/kg bw/day (male), 0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/day (female), 52 weeks by gavage NO(A)EL: 0.1 mg/kg bw/day (0.0003 mmol/kg bw/day) Liver effects: weight increase, hypertrophy of hepatocytes (0.5 mg/kg bw/day in male 12.5 mg/kg bw/day in female), altered hepatocellular foci (0.5 mg/kg bw/day in male) (Hirata-Koizumi <i>et al.</i> , 2008) GLP study		0.001 mg/kg bw/day
2	 25973-55-1	1	Not tested	Species: rats Dosing: 0, 100, 200, 400, 800, 1600 ppm, 90-day feeding NO(A)EL: 100 ppm (ca. 20 mg/kg bw/day, 0.057 mmol/kg bw/day) Liver effects: focal necrosis, bile duct proliferation, parenchymal cells enlarged (200 ppm in male and female) Kidney effect: tubular necrosis (200 ppm in male), Hematological effects (200 ppm in male), (Til <i>et al.</i> , 1968) Non-GLP study		0.010 mg bw/kg/day
3	 3864-99-1	1	CAR PXR PPAR Nrf2	Species: rats Dosing: 0, 2.5, 25, 250 mg/kg bw/day, 56-57 days for male, 55-69 days for female by gavage		0.004 mg/kg bw/day

				<p>NOEL: 2.5 mg/kg bw/day (0.007 mmol/kg bw/day) Liver effect: weight increase (25 mg/kg bw/day in male) non-adverse (Ema <i>et al.</i>, 2008) GLP study</p>	
4	 36437-37-3	1	Not tested	<p>Species: rats Dosing: 0, 0.5, 2.5, 12.5 mg/kg bw/days, 42 days (male), 41–55 days (female) by gavage NO(A)EL: 2.5 mg/kg bw/day (0.008 mmol/kg bw/day) Liver effect: weight increase (12.5 mg/kg bw/day) Kidney effect: weight increase (12.5 mg/kg bw/day) (METI, 2011) GLP study</p>	0.004 mg/kg bw/day
5	 70321-86-7	(2)	PPAR	<p>Species: rats Dosing: 0, 50, 300, 2000, 10000 ppm, 90 days by feeding NO(A)EL: 50 ppm (ca. 2.5 mg/kg bw/day (0.0056 mmol/kg bw/day) Liver effects: weight increase, hypertrophy, and/or cytoplasmic vacuolation of hepatocytes (2000 ppm in male, 300 ppm in female), (Basler, Phil II W. and Gfeller, W., 1987) GLP study</p>	0.0125 mg/kg bw/day
6	 2440-22-4	(3)	Nrf2	<p>Species: rats, Dosing: 0, 30, 100, 300 mg/kg bw/day, 42 days (male), 42–53 days (female) by gavage NOEL: < 30 mg/kg bw/day (< 0.133 mmol/kg bw/day) Liver effects: weight increase (30 mg/kg bw/day in male, 100</p>	0.005 mg/kg bw/day

				mg/kg bw/day in female), hypertrophy of hepatocytes (300 mg/kg bw/day in male, 100 mg/kg bw/day in female), Kidney effects: degeneration and regeneration in proximal tubules (100 mg/kg bw/day in female), (METI, 2007) GLP study		
7	 3147-75-9	(4)	CAR PPAR	Species: rats Dosing: 0, 12500, 25000, 50000 ppm, 30 days of feeding NO(A)EL: 5658 mg/kg bw/day (17.49 mmol/kg bw/day) No effects, (American Cyanamid Company, 1968) Non-GLP study		9.43 mg/kg bw/day
8	 3896-11-5	Not defined	Not tested	Species: rats Dosing: 0, 62.5, 250, 1000 mg/kg bw/day, 42 days for male, 44-56 days for female by gavage NO(A)EL: 1000 mg/kg bw/day (3.167 mmol/kg bw/day) No effects (MHLW., 2007) GLP study		5 mg/kg bw/day
9	 84268-33-7	Not defined	Not tested	Species: rats Dosing: 0, 50, 200, 1000 mg/kg bw/day, 28 days by gavage NO(A)EL: < 50 mg/kg bw/day (< 0.141 mmol/kg bw/day) Liver effects: weight increase, necrosis, hypertrophy of hepatocytes (50 mg/kg bw/day in male), diffuse hypertrophy of hepatocytes (50 mg/kg bw/day in female) (Ciba-Gaigy, 1986) GLP study		0.008 mg/kg bw/day

10	 127519-17-9	Not defined	Not tested		NO(A)EL : <64 mg/kg bw/day (< 0.141 mmol/kg bw/day) Hepatotoxic effects	0.011 mg/kg bw/day
11	 73936-91-1	(2)	Not tested		NO(A)EL : 2.5 mg/kg bw/day (0.0056 mmol/kg bw/day) Hepatotoxic effects	0.004 mg/kg bw/day
12	 3147-76-0	Not defined	Not tested		NO(A)EL : < 35 mg/kg bw/day (< 0.133 mmol/kg bw/day) Hepatotoxic effects	0.006 mg/kg bw/day

*D (mg/kg bw/day) = NOEL (mg/kg bw/day) /uncertainty factor.

If NOEL was not available, D = LOEL (mg/kg bw/day)/uncertainty factor.

表2 . 第1回および第2回レビューサイクルでレビューされたケーススタディの概要

Year-No.	Assessment approach	Endpoint	IATA topics			
			AOP*1	UR*2	NAM*3	L/N*4
2016-1 (Japan)	Read-across	Repeated dose toxicity		X	X	
2016-2 (US)	Grouping for cumulative risk assessment	Neurotoxicity	X		X	
2016-3 (ICAPO)	Read-across	Repeated dose toxicity		X	X	X
2016-4 (ICAPO)	Read-across	Repeated dose toxicity		X	X	X
2016-5 (JRC/BIAC)	Safety assessment workflow	Repeated dose toxicity	X		X	
2015-1 (Canada/US)	Read-across	Mutagenicity	X	X		
2015-2 (Canada)	Read-across	Repeated dose toxicity		X	X	
2015-3 (Japan)	Read-across	Repeated dose toxicity	X	X		
2015-4 (Japan)	Read-across	Bioaccumulation		X		X

- *1: AOP: MoA/AOP の使用
- *2: UR: 不確実性のレポートイング
- *3: NAM: 新規アプローチ手法の使用
- *4: L/N: 低毒性/無毒性予測

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
本間正充	遺伝毒性	日本毒性学会教育委員会	トキシコロジー (第3版)	朝倉書店	東京	2017	128-141

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Petkov, PI, Schultz TW, Honma M, Kirilov K, Kotov S, Mekenyan OG.	Predicting in vitro genotoxicity by mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase mutation assay (MLA): Accounting for simulated metabolic activation of chemicals.	Computational Toxicology	4	45-53	2017
Gadaleta D, Porta N, Vrontaki E, Manganelli S, Manganaro A, Sello G, Honma M, Benfenati E.	Integrating computational methods to predict mutagenicity of aromatic azo compounds.	J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.	35	239-257	2017
Horibe A, Odashima S, Hamasuna N, Morita T, Hayashi M	Weight of contribution of in vitro chromosomal aberration assay for evaluation of pesticides: Experience of risk assessment at the Food Safety Commission of Japan	Regulatory Toxicology and Pharmacology	95	133-141	2018
K. Saito, Y. Hasegawa-Baba, F. Sekiya, S. Hayashi, Y. Mirotani, H. Okamura, S. Maruyama, A. Ono, M. Nakajima, M. Degawa, S. Ozawa, M. Shibutani and T. Ma	Japan Flavour and Fragrance Materials Association's (JFFMA) safety assessment of food-flavouring substances uniquely used in Japan that belong to the class of aliphatic primary alcohols, aldehydes, carboxylic acids, acetals and esters containing additional oxygenated functional groups.	Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment	34(9)	1474-1484	2017

S. Tanabe, K. Kobayashi, M. Matsumoto, H. Serizawa, T. Igarashi, T. Yamada, A. Hirose.	Toxicity of repeated 28-day oral administration of acenaphthylene in rats.	Fundam. Toxicol. Sci.	4	247-259	2017
M. Matsumoto, T. Iso, H. Yamaguchi, T. Igarashi, T. Yamada, A. Hirose.	Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (III)	Bull. Natl. Inst. Health Sci.	135	39-44	2017
T. Yamada and A. Hirose	Case study on the use of an integrated approach to testing and assessment for the repeated-dose toxicity of phenolic benzotriazoles	Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)	271	1-44	2017
M. Matsumoto, M. Furukawa, K. Kobayashi, T. Iso, T. Igarashi, T. Yamada, A. Hirose.	A 28-day repeated oral-dose toxicity study of insecticide synergist N-(2-ethylhexyl)-1-isopropyl-4-methylbicyclo[2.2.2] oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats.	Fundam. Toxicol. Sci.	5	1-11	2018
T. Yamada, Y. Tanaka, R. Hasegawa, T. Igarashi, A. Hirose.	Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals.	Fundam. Toxicol. Sci.	5	75-82	2018