

厚生労働行政推進調査事業費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく

化学物質のヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発

平成 30 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 隆志

国立医薬品食品衛生研究所

平成 31 年 (2019 年) 3 月

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金研究報告書

目 次

I. 総括研究報告書.....	1
インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの 評価ストラテジーの開発 山田 隆志.....	2
II. 研究分担報告書.....	15
1. Ames/QSAR 予測性の向上と運用可能な Ames 変異原性予測のスキームの確立 に関する研究 本間 正充.....	16
2. 代謝予測モデルの改良による MoA に基づいた <i>in vivo</i> 遺伝毒性予測性の向上 に関する研究 森田 健.....	26
3. 反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究 山田 隆志.....	38
4. 反復投与毒性の AOP キーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究 広瀬 明彦.....	52
5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備と IATA への適用に関する研究 石田 誠一.....	60
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	70

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
(H30-化学-指定-005)

研究代表者 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

本研究では、数万種に及ぶ既存化学物質のヒト健康リスクを効率的に評価するために、インシリコ手法の高度化と実用化に基づく評価のストラテジーを開発する。

Ames試験QSARに関しては、構築した大規模データベースを利用して予測精度の向上を目指す国際チャレンジプロジェクトを実施した。Phase IIIトライアルには11社のQSARベンダーが提供する16のQSARモデルが挑戦した。各モデルの予測性はPhase IIに比べて大きな向上は見られなかった。Phase III化合物はユニークな構造をもち、また分子量800以上の化合物を多く含むためと考えられる。本プロジェクトは終了したが、さらに予測性の向上を目指すため、Ames試験報告書の電子化と詳細データベース化に取り組んだ。

遺伝毒性試験結果の相違を*in vitro/in vivo*における代謝の比較解析から検討する前提として、利用データの妥当性を評価した。*In vitro*染色体異常試験（CA）陰性で*in vivo*小核試験（MN）陽性物質およびAmes試験陰性でげっ歯類トランスジェニック突然変異試験（TGR）陽性物質を対象とした結果、前者では21物質中11物質が、後者では13物質中3物質が陰性/陽性で妥当と判断された。また、一部のAmes陰性・TGR陽性物質については、その代謝様式の違い、ならびに想定される警告構造について調査し、暫定的な結果を得た。

反復投与毒性については、カテゴリーアプローチモデルの適用範囲の拡大・高度化を図るため、国内外の公開反復投与毒性試験データを統合し世界最大規模のデータベースの構築を行っており、これまでに約 2500 物質の試験データを統合した。統合データベースの利用として、まず血液毒性について、共通する化学構造とそれらの毒性機序に関する情報収集と解析を行い、新規カテゴリーの候補を見出し、既存カテゴリーの精緻化に対しても統合データベースが有効に利用できる可能性が示唆された。

さらに、化学物質の主要な標的臓器である肝臓に対して、従来の化学構造情報のみを基にした肝毒性構造アラート作成に代わる新たなアプローチとして、AOP の一部である分子開始キーイベント（Molecular Initiating Event; MIE）情報に基づいた *in vitro* 試験データを用いた肝毒性予測モデルの作成を試みた。作成した予測モデルは、既存の知識ベース毒性予測モデル（Derek Nexus）と比較して幅広いケミカルスペースをカバーしており、高い予測性能（感度）を有していることが示された。

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、生理学的薬物動態モデル（PBPK）に

関する文献を収集して、カテゴリーごとに分配係数と代謝パラメータのデータベース化を進めている。さらに、化学構造から推計した組織/血液間分配係数の妥当性について、15種の炭化水素類のラットの脳、肝臓、腎臓、脂肪および血中濃度実測値との比較することにより確認でき、化学物質の体内動態の推計に有用であると考えられた。

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

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

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

石田 誠一

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

室長

の情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する統合的アプローチ（IATA）のコンセプトが整理されつつある。2020年以降は動物実験への依存度を軽減しつつ、化学物質が発現しうるヒトへの毒性を高精度で予測する*in silico*評価技術を確立し、IATAに基づいてヒト健康リスク評価のストラテジーを進化させる動きが加速すると考えられる。本研究では、有害性評価の長年の経験を有する専門家が選別した信頼性が高い試験データセットを用いて、QSAR並びにカテゴリーアプローチ手法の精度を向上させ、得られた成果を基に、国際的な調和の動向を取り入れた*in silico*予測評価ストラテジーを開発する。

Ames変異原性に関しては、これまで我が国で行われた労働安全衛生法（以下、「安衛法」という）Ames試験データを収集し、大規模データベースを構築した。その数は約1万3千物質になる。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チャレンジプロジェクトを実施中である。本年度は4,409化学物質を対象としたPhase IIIトライアルを実施した。（本間）

In vitro（肝S9画分）と*in vivo*（生物個体）間の代謝の違いは、異なる遺伝毒性試験結果を引き起こす可能性があり、この代謝の相違を考慮した*in silico*遺伝毒性予測モデル

A. 研究目的

WSSD2020年目標の達成に向けて、膨大な数の試験データのない化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。さらに、動物福祉の観点から動物実験の削減の流れも着実に進んでいる。こうした動向に対応するため、現状の*in silico*評価の技術レベルの向上、適用範囲の拡大、安全性評価での実運用が強く求められている。近年OECDではAOP（毒性発現経路）の開発が精力的に進められており、QSARの適用が困難と考えられる複雑な毒性エンドポイントについて、AOPに基づいて*in silico*、*in vitro*、*in vivo*

が構築できれば、予測性の向上につながると期待される。*In vivo*特異的陽性の要因を*in vitro/in vivo*における代謝の比較解析等から検討するための前段階として、利用する実データの妥当性を評価する。(森田)

反復投与毒性については、化学構造から効果的に毒性を予測する手法の実用化に向けて、化学物質に関する既知毒性情報を網羅的に検索・解析可能なデータベースを構築(国内外の公開データベースを統合)する。それを有効に活用し、さらに代謝や毒性機序に関する情報を体系的に整理・集約して、カテゴリーアプローチにより未試験化学物質を評価するスキームを確立することを目指す。(山田)

反復投与毒性の毒性予測モデル開発の一環として、肝毒性に焦点を当ててきたが、従来の構造情報と毒性情報との相関性だけを基にした肝毒性アラート法に代えて、肝毒性エンドポイントに関連するkey event情報を収集し、毒性試験結果で得られた肝毒性物質の毒性プロファイルと組み合わせることによる新たなアプローチを用いた予測モデルの作成を目指した。(広瀬)

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、文献等から代謝関連パラメータと分配係数のデータを収集・統合し、データベース化する。取得した代謝関連パラメータと化学構造から推計した組織/血液間分配係数を用いて体内動態を推定し、既存体内動態予測モデルをOECDのPBPKガイドランスに留意しつつ検証する。(石田)

B. 研究方法

B.1. Ames/QSAR予測性の向上と運用可能なAmes変異原性予測のスキームの確立に関する研究(本間)

Ames/QSARツールの予測性の向上を目指す国際チャレンジプロジェクト(Phase III)を継続した。4,409化合物を11社のQSARベンダーに提供し、合計で16のQSARツールが挑戦した。これらAmes試験の結果以下の3つに分類される。

- A判定：Ames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
 - B判定：Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質
 - C判定：Ames試験における陰性判定物質
- 国際チャレンジプロジェクトでは上記のA, B, Cの試験データしか提供していないが、詳細データの提供が予測率の向上に重要と考え、Ames試験報告書の電子化とデータベース化に着手した。1986年～2015年までの安衛法Ames試験報告書を厚生労働省から入手し、電子化と、詳細データの抽出を行った。

B.2. 代謝予測モデルの改良によるMoAに基づいた*in vivo*遺伝毒性予測性の向上に関する研究(森田)

既存の各種データベースから*in vitro* CA陰性で*in vivo* MN陽性と報告されている物質、およびAmes陰性でTGR陽性と報告されている物質を抽出し、原著論文等の精査により当該試験結果の妥当性を評価し、今後の研究に活用すべきデータか否かを検証した。また、一部のAmes陰性・TGR陽性物質については、暫定的にその代謝様式の違い、ならびに想定される警告構造について調査した。なお、当初の研究計画である初年度に*in vitro* CA陰性・*in vivo* MN陽性物質の抽出とそのデータの妥当性評価ならびに*in vitro/in vivo*代謝比較解析、次年度に

同様に Ames 陰性・TGR 陽性物質についての検討を、作業効率の観点から、初年度に *in vitro/in vivo* データの妥当性評価、次年度以降に、*in vitro/in vivo* 代謝比較解析を重点的に実施することとした。

B.3. 反復毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究 (山田)

国内外で公開されている化学物質の反復投与毒性試験データベース (HESS、COSMOS、ToxRef、RepDose、食品健康影響評価書等、総計約2500物質) の構成を調査し、共通・類似のデータ項目を選択して、一部修正を加えつつ、それらのデータを統合することにより、新たなデータベースを構築した。統合データベースを利用して、NO(A)ELの推定根拠となることが多い血液毒性を対象に、300 mg/kg/day以下で毒性を引き起こした物質を収集し、共通する化学構造をカテゴリーの候補として抽出した。代謝と毒性機序に関する情報を別途収集して解析することにより、構造と毒性の因果関係を明確化し、エビデンスに基づく化学物質のカテゴリーの構築を行った。さらに、構造類似で毒性が現われない物質の構造を収集・精査することにより、カテゴリーアプローチの適用範囲を検討・評価した。

B.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究 (広瀬)

肝毒性予測モデル構築のための MIE 情報を検索するための化学構造を持つ化学物質の *in vivo* データと、外部検証に用いるための *in vivo* データを収集した。MIE 検索用データは内部検証としても用いた。MIE 検索用データは、HESS (Hazard Evaluation

Support System)と医薬基盤・健康・栄養研究所が提供する Open TG-GATEs (Toxicogenomics Project-Genomics Assisted Toxicity Evaluation System)の反復投与毒性試験情報 (HESS : 約 700 試験、Open TG-GATEs : 約 150 試験)から収集した。外部検証用データセットとしては USEPA が提供する ToxRefDB (Toxicity Reference Database)に収載された反復投与毒性試験 (約 500 試験)の情報から、上記の基準に従い肝毒性陽性物質 : 128 物質、陰性物質 : 72 物質を収集した。また、肝毒性と関連する MIE 情報を収集するため、PubChem BioAssay から、*in vitro* 試験のデータを収集した。その際、IPA (Ingenuity Pathway Analysis)に収載されている肝毒性に関連したターゲットタンパク質が記載されている *in vitro* 試験データに絞り込みを行った。

B.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備とIATAへの適用に関する研究 (石田)

Ramsey and AndersenタイプのPBPKモデルにより体内動態を推定する際に必要な分配係数 (血液/空気, 組織/血液等) と代謝パラメータ (V_{max} , K_m) をデータベース化するため、主に一般化学物質関連の約1050文献をリスト化した。これらについてタイトルや要旨等からデータベース化に有用性か否かを判定し、選定した文献を収集し、得られる情報について精査した。また、一般化学物質の場合、既報値がある物質に限られるため、収集と並行して、分配係数の推定法 (Jongeneelen & ten Berge (2011) と Béliveau, Tardif and Krishnan (2003)) の妥当性についても、15種の炭化水素類のラットの脳、肝臓、腎臓、脂肪および血中濃度実測値 (Zalsen *et al.*, 1990) と比較することに

より確認した。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 結果

C.1. Ames/QSAR予測性の向上と運用可能なAmes変異原性予測のスキームの確立に関する研究 (本間)

Phase IIIトライアルに参加した11機関に、4,409化学物質の以下の情報を送付した。情報は、管理番号、CAS#、化学物質名、SMILESである。2017年3月末までに参加機関のQSARツールによるAmes試験判定予測結果を回収し、試験結果 (A, B, C) の予測精度を評価した。基本的な能力評価はSensitivity (A)、Sensitivity (A, B)、Specificity (C)、Accuracy (A, B, C) を用いた。全ての評価項目はPhase IIに比べて概して低く、予測率の顕著な向上は求められなかった。Accuracyに関してはCase-ULTRAの統計ベースモデル (87.3%) が最も高く、LeadScopeのルールベース (82.8%) がそれに次いだ。当初予定した国際チャレンジプロジェクトは全て終了し、研究成果を論文化した (Honma *et al.*, 2018)。

予測率の向上には試験結果のA, B, Cだけでなく、陽性を示す試験菌株の情報、代謝活性化の有無、溶媒、被験物質の純度等が重要と考え、これら詳細データのデータベース化を開始した。1986年~2015年までの安衛法Ames試験報告書 (約20,000) を厚生労働省から入手し、電子化作業を行った。H30年度は約2/3が終了する見込みである。このうち、国際チャレンジプロジェクトに利用した、12,140化合物に関して詳細データのデータベース化に着手した。

C.2. 代謝予測モデルの改良によるMoAに基づいたin vivo遺伝毒性予測性の向上に関する研究 (森田)

In vitro CA陰性で*in vivo* MN陽性の21物質中11物質、およびAmes陰性でTGR陽性の13物質中3物質が当初の評価通り陰性/陽性で妥当と判断された。Ames陰性・TGR陽性物質のTamoxifenおよびCyproterone acetateについては、第1相アリル水酸化を受けた後、第2相硫酸抱合されることにより代謝活性化され、これは、*in vivo*個体においてのみ生じ、*in vitro*のS9系では、特別な補酵素を添加しない限り生じないことが、また、Oxazepamについては、環収縮代謝反応による酸化的脱炭酸と脱水素環化で生ずる第1相代謝産物がDNA反応性代謝物と考えられているが、当該物質は*in vitro*では認められないことが判明した。

C.3. 反復毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究 (山田)

国内外で公開されている毒性試験データベース (HESS、COSMOS、ToxRef、RepDose、食品健康影響評価書等、総計約2500物質) について共通するデータ項目を整理し、化学構造式の修正を行い、データベースを統合した。その結果、部分化学構造、毒性影響、試験条件などを指標に、カテゴリーアプローチの高度化に寄与するデータの検索・抽出・解析を効率的に行う基盤を構築することができた。統合データベースの反復毒性データを利用して化学物質の血液毒性を評価・検討し、異なる化学構造を有するカテゴリー (アニリン類、ニトロベンゼン類、オキシム類、ヒドラジン類) が、直接的あるいは代謝活性化を介してヘモグロビンを酸化し、活性酸素に起因する血液毒

性を発現しうる可能性を見いだした。
Ethylene glycol alkyl ether類については、機序の詳細に不明な部分も残るが、血球膜に作用し構造・機能変化を促進すること、aryl-X-aryl構造を有する物質群については、ヘモグロビンの4つのサブユニットで形成される中央部分の空洞内壁部分やヘム結合サイト近傍の疎水ポケット等に複数の分子が非特異的に結合することで、ヘモグロビンのアロステリーに影響を及ぼしその酸素運搬機能の一部を阻害することで血液毒性を発現する可能性が示唆された。

C.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究 (広瀬)

収集した47の *in vitro* 試験データを用いて肝毒性予測モデルを構築した。予測プロセスの原則としては、クエリー（予測対象）物質あるいは類似構造を持つ物質についてそれぞれの *in vitro* 試験データに含まれていた場合にその試験結果（Active or Inactive）をそれぞれ陽性/陰性の判定とする2つのモデル（クエリー物質そのものを予測する Model A と類似構造もクエリーに含める Model B）を作成した。

感度は Model A で 0.49 となった。Model B では Model A よりも真陽性が4物質増えたために、感度は上昇し、0.52 であった。特異度は Model A で 0.84 となった。Model B では、偽陽性が Model A よりも10物質増加したため、特異度は 0.79 に減少した。そのほか陽性的中率、F 値、正確度については Model B が Model A を下回った。Derek Nexus との比較では、Model A, Model B とともに Derek Nexus より高い感度となった。Model A では全ての評価指標で Derek Nexus より

も高い数値が得られた。

また、外部検証データとして ToxRefDB で評価した結果では、Model A は感度が 0.69、特異度が 0.74 となり、HESS-TGP データセットを用いた時より感度が高くなった一方で特異度が減少した。また Model B では Model A と比較して特異度の減少に対する感度の上昇が大きく、陽性的中率、F 値、正確度のいずれにおいても Model A を上回った。Model A, Model B とともに Derek Nexus と比較して特異度は下回った。一方で Derek Nexus の感度は 0.5 以下であったことに対して、Model A および Model B は 0.7 前後の感度が得られた。

C.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備とIATAへの適用に関する研究(石田)

約1050文献の中から、約500を有用文献と選定し、収集した。収集文献の精査の結果、約140物質の情報が得られ、文献のそれぞれ約4割、3割および2割が、炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール・ケトン・エステル・エーテル類に関するもので、また約8割の文献からヒトとラットでの分配係数と代謝パラメータの両方の情報を入手できた。これらをデータベース化している。

15種の炭化水素類のラットの組織および血中濃度を、分配係数測定値 (Gargas *et al.*, 1989) および分配係数推定値 (logPから推定するJongeneelen & ten Bergeの方法、構造から推定するBéliveauらの方法) を用いてPBPKモデルで計算し、Zalsenらの実測値と比較した結果、実測濃度とPBPKモデル計算濃度間の相関係数はそれぞれ、0.81 (測定値)、0.78 (Jongeneelen & ten Bergeの方法)、0.67 (Béliveauらの方法) で、実測値との差異は平均で4.4倍 [0.2~34] (測定値)、5.6倍

[0.02~95] (Jongeneelen & ten Bergeの方法)、4.6倍 [0.06~44] (Béliveauらの方法)であった。これらの比較結果から、Jongeneelen & ten Bergeの方法、Béliveauらの方法による分配係数推定法がデータ補完に有用であると判断された。

D. 考察

D.1. Ames/QSAR予測性の向上と運用可能なAmes変異原性予測のスキームの確立に関する研究 (本間)

今回の Phase III の 4,409 化合物の予測精度に関しては、Phase II に比べて大きな向上は見られなかった。理由として、Phase III の化合物の多くはCAS番号を持たないユニークな構造をもち、また分子量 800 以上の高分子化合物を多く含むため、予測が困難であったことが考えられる。それでも全ての QSAR ツールは、チャレンジプロジェクト前の予測精度を大きく超え、共同研究は成功裡に終了した。いくつかの QSAR ツールの予測精度は 80-85%を示し、この数字は Ames 試験自体の試験機関間の再現性に匹敵する。Ames 試験に限らず生物学的試験にはばらつきや、生物学的不安定は常に存在し、100%結果が再現できることは少ない。むしろ、80-85%の再現性は他の毒性試験よりも高いかもしれない。従って、予測率の向上には QSAR モデルの改良だけでなく、毒性試験の改良や試験結果の再評価が重要である。Ames 試験の問題点はその結果が陽性、陰性の 2 元性(binary)であるため、弱い陽性反応が、場合によっては陰性と判定されることがある。また、複数のデータが有り、一つでも陽性を示した場合、安全性を考慮して保守的に陽性と判断し、データベースに収載されることがある。これらのデ

ータの結果が、科学的妥当性を欠く場合、それらデータはノイズとなって、正確な予測モデルの開発の障害となる。生物学的試験を学習データとする限り、そのデータの信頼性は予測率向上の最も重要な要素である。信頼できるデータのみからなるベンチマークデータセットを学習データとし、モデルを開発することが重要である。

D.2. 代謝予測モデルの改良によるMoAに基づいたin vivo遺伝毒性予測性の向上に関する研究 (森田)

既存の各種データベース等に基づく試験結果は必ずしも正確ではないことが示された。その要因は、データベース収載時の単純な記載間違い、原著論文の読み込み不足、間違った二次資料からの引用などが想定されるが、明らかではない。また、類似の試験結果が存在する場合には、試験の信頼性・妥当性など証拠の重みづけ (Woe) による専門家判断に基づき、結果が異なってくることもある。TGR陽性物質について抽出された警告構造については、さらに検討する必要がある。

D.3. 反復毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究 (山田)

昨年度までにOECDのIATA Case Studies Projectにカテゴリーアプローチによる反復投与毒性の予測のケーススタディを3つ提出し、メンバー国の専門家による詳細なレビューを受けた。その結果として、利用できる毒性情報は可能な限り収集して信頼性評価を行い、目的に応じて適切に使い分けること、カテゴリーの標的とする臓器毒性エンドポイントは、他の臓器毒性エンドポイントより感受性が高いことを確認するこ

と、毒性予測は機序に基づいたものであること、ヒトへの外挿性についてできるだけ情報を提供することなどが毒性予測結果をリスク評価に用いる時の重要ポイントとして挙げられた。本研究において信頼性が高い毒性試験データを基にして構築した血液毒性カテゴリーの多くは、血液毒性が他の毒性より低用量から発現している。カテゴリーを構成する物質数、ならびに代謝や毒性機序に関する情報は肝臓を除く臓器毒性と比較して多く、信頼性の高いカテゴリーアプローチの適用が可能と考えられる。統合したデータベースを利用して反復投与による血液毒性の発現について、カテゴリーアプローチの適用範囲を拡大できる可能性が示唆されたが、同カテゴリーに分類される物質で当該毒性を発現しない事例については検討が不十分で不明な点も残っている。今後も統合データベースを利用した詳細な検討が必要であると考えられる。

D.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究(広瀬)

本研究で作成したModel Aの予測性能については、内部検証用のHESS-TGPデータセットに対する全ての評価指標（感度、特異度、陽性的中率、F値、正確度）と外部検証用のToxRefDBデータセットに対する特異度以外の評価指標はDerek Nexusを上回った。このことから、本研究で用意したデータセットに対して、Model AはDerek Nexusよりも高い予測性能を有していることが明らかになった。Derek Nexusの構造アラートによるアプローチと比べて、Model Aによってカバーされる肝毒性陽性物質のケミカルスペースが幅広いことが要因の一つである

と考えられた。一方、知識ベースのDerek Nexusより感度は上がったとは言え、未だ相当数の偽陰性物質が存在する。これは、未だ肝毒性に関するMIE情報が不足していることを示すものであるが、経口アベイラビリティや排泄などADME情報を加えることで予測性能が高くなる可能性のあることも示唆された。

D.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備とIATAへの適用に関する研究(石田)

収集・整理中の炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール・ケトン・エステル・エーテル類などの分配係数と代謝パラメータの比較解析により、カテゴリー物質の各パラメータがどの程度類似しているかについて知見を得ることが可能となる。また、炭化水素類の組織血中濃度の実測値と分配係数推定値を用いたPBPKモデルによる推計値と実測値の差異は4-6倍程度であり、スクリーニングレベルで活用できる可能性が示された。今後は、異なるカテゴリーへの適用を検討するとともに、代謝パラメータの推計法と推計値の妥当性の検証が必要である。

E. 結論

遺伝毒性については、Ames試験予測QSARモデルの向上を目指した国際チャレンジプロジェクトは成功裡に終了した。さらなる予測性の向上を目指し、詳細データからなるベンチマークデータセットの開発を行う。また、平成31年度は新規の国際チャレンジプロジェクトを開始する。In vitro CA陰性・in vivo MN陽性の21物質中11物質、ならびにAmes陰性・TGR陽性の13物質中3物質が当該結果通りで妥当と判断され、以

降の代謝様式あるいは警告構造の検討に利用すべきと考えられた。

反復投与毒性については、国内外の公開反復投与毒性試験データを統合した世界最大規模のデータベースの構築を開始し、これまでに約2500物質の反復投与毒性試験データを統合した。血液毒性を対象に、機序に基づく信頼性が高いカテゴリーを構築できた。さらに、肝毒性のAOPの一部であるMIE情報に基づいた*in vitro*試験データを用いた肝毒性予測モデルの作成を行い、知識ベースのツールより高い感度を持つ予測モデルの作成に成功した。

体内動態予測システムの基盤整備では、取得した分配係数と代謝パラメータのデータベース化を進めるとともに、化学構造から推計した組織/血液間分配係数を用いて精度の高い体内動態を推定することに成功した。

以上のことから本研究は順調に推移している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

誌上発表

1. Honma M, Kitazawa A, Cayley A, Williams RV, Barber C, Hanser T, Saiakhov R, Chakravarti S, Myatt GJ, Cross KP, Benfenati E, Raitano G, Mekenyan O, Petkov P, Bossa C, Benigni R, Battistelli CL, Giuliani A, Tcheremenskaia O, DeMeo C, Norinder U, Koga H, Jose C, Jeliaskova N, Kochev N, Paskaleva V, Yang C, Daga PR, Clark RD, Rathman J. Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity: outcomes of the Ames/QSAR International Challenge Project. *Mutagenesis*, **34**, 3-16, 2019.
2. Petkov PI, Schultz TW, Honma M, Yamada T, Kaloyanova E, Mekenyan OG. Validation of the performance of TIMES genotoxicity models with EFSA pesticide data. *Mutagenesis*, **34**, 83-90, 2019.
3. Amberg A, Andaya RV, Anger LT, Barber C, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cross KP, Custer L, Dobo K, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Gomez, S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Naven R, Nicolette J, Parenty A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Sasaki JC, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Woolley D, Myatt GJ. Principles and procedures for handling out-of-domain and indeterminate results as part of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol.*, **102**, 59-64, 2019.
4. Mishima M, Hashizume T, Haranosono Y, Nagato Y, Takeshita K, Fukuchi J, and Homma M. Meeting report, ICH M7 relevant workshop: use of (Q)SAR systems and expert judgment. *Genes and Environment*, **40**, 19-25, 2018.
5. Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV. Extrapolation of *in vitro* structural alerts

- for mutagenicity to the *in vivo* endpoint. *Mutagenesis*, **34**, 111-121, 2019.
6. Amberg A, Anger LT, Bercu J, Bower D, Cross KP, Custer L, Harvey JS, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Leavitt P, Quigley DP, Miller S, Snodin D, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, White AT, Wichard J, Myatt GJ. Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: is aromatic N-oxide a structural alert for predicting DNA-reactive mutagenicity? *Mutagenesis*, **34**, 67-82, 2019b.
 7. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M. *In silico* prediction of chromosome damage: comparison of three (Q)SAR models. *Mutagenesis*, **34**, 91-100, 2019.
 8. Benfenati E, Golbamaki A, Raitano G, Roncaglioni A, Manganelli S, Lemke F, Norinder U, Lo Piparo E, Honma M, Manganaro A, Gini G. A large comparison of integrated SAR/QSAR models of the Ames test for mutagenicity. *SAR QSAR Environ Res.*, **29**, 591-611, 2018.
 9. Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, Aptula A, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Burden N, Cammerer Z, Cronin MTD, Cross KP, Custer L, Dettwiler M, Dobo K, Ford KA, Fortin MC, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gervais V, Glover KP, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Hardy B, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Hughes K, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kim MT, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Majer B, Masten S, Miller S, Moser J, Mumtaz M, Muster W, Neilson L, Oprea TI, Patlewicz G, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Ruiz P, Schilter B, Serafimova R, Simpson W, Stavitskaya L, Stidl R, Suarez-Rodriguez D, Szabo DT, Teasdale A, Trejo-Martin A, Valentin JP, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Hasselgren C. *In silico* toxicology protocols. *Regul Toxicol Pharmacol.*, **96**, 1-17, 2018.
 10. Fujita Y, Honda H, Matsumura S, Yamane M, Morita T, Matsuda T, Morita O. A decision tree-based integrated testing strategy for the tailor-made carcinogenicity evaluation of test substances using genotoxicity test results and chemical spaces. *Mutagenesis*, **34**, 101-109, 2019.
 11. Igarashi T, Takashima H, Takabe M, Suzuki H, Ushida K, Kawamura T, Matsumoto M, Iso T, Tanabe S, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial hazard assessment of benzyl salicylate: *In vitro* genotoxicity test and combined repeated-dose and reproductive /developmental toxicity screening test in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **100**, 105-117, 2018.
 12. Chesnut M, Yamada T, Adams T, Knight, D, Kleinstreuer N, Kass G, Luechtefeld T,

- Hartung T. Regulatory acceptance of read-across. *ALTEX*, **35**, 413-419. 2018.
13. Igarashi T, Serizawa H, Kobayashi K, Suzuki H, Matsumoto M, Iso T, Kawamura T, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial hazard assessment of 4-benzylphenol, a structural analog of bisphenol F: Genotoxicity tests *in vitro* and a 28-day repeated-dose toxicity study in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **96**, 64-75, 2018.
 14. 山田隆志. OECDにおけるQSAR、AOPの開発状況, 4-3, 151-157, 皮膚の安全性・有用性評価法. 技術情報協会. 2018.
 15. Yamada T, Tanaka Y, Hasegawa R, Igarashi T, Hirose A. Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals, *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**, 75-82, 2018.
 16. 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-methylbicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats, *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**, 1-11, 2018.
 17. Yamada T, Matsumoto M, Miura M, Hirose A. Case study on the use of integrated approaches to testing and assessment for testicular toxicity of ethylene glycol methyl ether (EGME)-related chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), in press, 2019.
 18. Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Tanabe S, Inoue K, Hirose A. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (IV). *Bull. Natl Inst. Health Sci.*, **136**, 108-113, 2018.
 19. Kohara A, Matsumoto M, Hirose A, Hayashi M, Honma M, Suzuki T. Mutagenic properties of dimethylaniline isomers in mice as evaluated by comet, micronucleus and transgenic mutation assays. *Genes Environ*, **40**, 18-27, 2018.
- 学会発表
1. Honma M. AMES/QSAR International Collaborative Study. QSAR2018 (June 2018, Bled, Slovenia)
 2. 森田健：遺伝毒性評価のための*in vivo*試験実施戦略、日本毒性学会シンポジウム：動き始めた遺伝毒性評価の新たな潮流、第45回日本毒性学会学術年会（2018年7月 大阪）
 3. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M. Current Situation of *in silico* Prediction of chromosome aberration, Environmental Mutagenesis & Genomics Society, 49th Annual Meeting (September 2018, San Antonio, USA)
 4. Fujita Y, Honda H, Yamane M, Morita T, Matsuda T, Morita O. Integrated testing strategy for carcinogenicity evaluation of chemicals using genotoxicity tests and chemical properties, 20th International Congress on *In Vitro* Toxicology (October 2018, Berlin, Germany)
 5. Yamada T, Kurimoto M, Shiraiishi H, Yamamoto H, Tatarazako N, Nishimura T, Hirose A. Evaluation of QSAR models

- for daphnia and fish chronic toxicities of human pharmaceuticals. SETAC Europe 28th Annual Meeting (May 2018, Rome, Italy)
6. 山田隆志：毒性関連大規模データベースの利用とリードアクロスによる安全性評価. 第 45 回日本毒性学会学術大会 (2018 年 7 月 大阪)
 7. 田邊思帆里、広瀬明彦、山田隆志：Adverse Outcome Pathway(AOP)の構築～ヒストン脱アセチル化酵素阻害による精巢毒性に関する AOP を例に～. 第 45 回日本毒性学会学術大会 (2018 年 7 月 大阪)
 8. 五十嵐智女、高部道仁、高島宏昌、鈴木洋、牛田和夫、松本真理子、磯貴子、川村智子、井上薫、小野敦、山田隆志、広瀬明彦：サリチル酸ベンジルの遺伝毒性、反復投与毒性及び生殖発生毒性のスクリーニング. 第 45 回日本毒性学会学術大会 (2018 年 7 月 大阪)
 9. Yamada T, Matsumoto M, Kitajima S, Aisaki K, Kanno J, Hirose A, Category assessment of repeated-dose hepatotoxicity of phenolic benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (September 2018, Brussels, Belgium)
 10. Matsumoto M, Kawamura T, Inoue K, Yamada T, Kobayashi N, Hirose A. Updates and overview of derivation of subacute guidance values for contaminants in drinking water in Japan. 54th Congress of the European Societies of Toxicology (September 2018, Brussels, Belgium)
 11. 山田隆志、栗本 雅之、広瀬明彦、Chihae Yang, James F Rathman：非発がんエンドポイントの TTC アプローチを改良するための新しいデータベースの開発. 日本動物実験代替法学会第 31 回大会 (2018 年 11 月 熊本)
 12. 城島光司、山田隆志、広瀬明彦：分子キーイベントのインビトロ試験データを用いた肝毒性予測モデルの開発. 日本動物実験代替法学会第 31 回大会 (2018 年 11 月 熊本)
 13. 城島光司、山田隆志、広瀬明彦：インビトロ試験データを用いた分子レベルのイベントによる肝毒性予測. 第 46 回構造活性相関シンポジウム (2018 年 12 月 大阪)
 14. Yamada T, Kurimoto M, Miura M, Kawamura T, Jojima K, Taira N, Ohata H, Tsujii S, Ohno A, Hirose A. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across assessment. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2019, Baltimore, USA)
 15. 山田隆志、足利太可雄、小島肇、広瀬明彦：AOP (Adverse Outcome Pathway; 有害性発現経路) に基いた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. 日本薬学会第 139 年会 (2019 年 3 月 千葉)
 16. Hirose A, Matsumoto M, Kawamura T, Yamada T, Inoue K, Setting of the subacute guidance value for risk management of emerging issues at the drinking water quality, ASAITOX 2018 (June 2018, Pattaya, Thailand)
 17. 松本真理子、田邊思帆里、芹沢英樹、

高部道仁、川村智子、五十嵐智女、磯貴子、井上薫、山田隆志、広瀬明彦：
アセナフチレンの人健康影響に係る
安全性試験結果：28日間反復投与毒性
試験及び遺伝毒性試験。第45回日本
毒性学会学術大会（2018年7月 大阪）

18. Inoue K, Otsuki N, Hirose A. Assessment of Reproductive and Repeated Dose Toxicity for Cyclopentyl Methyl Ether (CPME) as a Residual Solvent in Pharmaceuticals. 39th Annual Meeting, American College of Toxicology (November 2018, West Palm Beach, Florida, USA)
19. 田邊思帆里, 山田隆志, 広瀬明彦：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDI)によるシグナルパスウェイ～OECDにおける有害性発現パスウェイ (Adverse Outcome Pathway) の取り組みについて～. 第41回日本分子生物学会年会（2018年11月横浜）
20. 田邊思帆里, 山田隆志, 広瀬明彦：遺伝子ネットワーク解析による分子パスウェイ解明及び AOP 開発状況について. 日本薬学会第139年会（2019年3月 千葉）

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

Ames/QSAR 予測性の向上と運用可能な Ames 変異原性予測の
スキームの確立に関する研究

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	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 研究員
研究協力者	笠松 俊夫	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 研究員

研究要旨

Ames 試験結果の定量的構造活性相関（QSAR）予測に関しては、12,140 化合物の労働安全衛生法（以下、「安衛法」という）Ames 試験データを用いて QSAR 予測精度の向上を目指す国際チャレンジプロジェクトを実施した。7 カ国 12 の QSAR ベンダーが開発した 17 のツールがこの国際チャレンジに参画した。全ての QSAR ツールの予測率が当初のバージョンより向上したことから本プロジェクトは成功裡に終了した。さらなる予測率の向上のためにはトレーニングデータの精査が重要である。陽性、陰性の試験結果だけでなく、陽性を示した菌株、代謝活性化の有無、純度、溶媒などの情報が、メカニズムベースの予測モデルの開発に有用である。そのため安衛法 Ames 試験データベースの精緻化に取り組んだ。さらに詳細データベース開発のために全ての Ames 試験報告書の電子化と詳細データベース化も実施中である。また、安衛法 Ames 試験データ以外のデータベースの関しては、信用性向上のために、既存の古く信頼性の低い試験の再試験も実施した。これら取り組みにより信頼性の高いビッグデータのみからなるベンチマークデータセットの開発を目指す。

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。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Ames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Ames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Ames試験データはAmes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Ames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で実施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Ames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、Ames試験結果を伏せたままでQSARベンダーに提供した。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した。評価後、各QSARベンダーに実際のAmes試験結果を開示し、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した。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。最後のPhase IIIトライアルはH29年度に実施した。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。

本年度（H30）はこれまでの3回のトライアルを総括し、12社、17のQSARツール（1社1ツールはH28-H29のみ参加。）の予測性能を評価した。また、ベンチマークデータセットの構築が重要と考え、Ames試験報告書の電子化と詳細データベース化に取り組

んだ。さらに、偽陽性、偽陰性化合物の同定、再試験を行い、データベースの堅牢化を図った。

B. 研究方法

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課の協力で、1986年～2015年までの安衛法Ames試験結果データを入手した。この内、単体の低分子化合物12,140種のAmes試験結果をデータベース化した。このデータベースを用い、Ames/QSARツールの予測性の向上を目指す国際チャレンジプロジェクトを開始した。プロジェクトは3回のPhaseに分けて行われ、各Phase約4,000化合物をQSARベンダーに提供した。これらデータベースのAmes試験の結果は以下の3つに分類される。

- A判定：Ames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
- B判定：Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質
- C判定：Ames試験における陰性判定物質

QSAR予測結果の評価は試験結果の陽性を陽性と予測できる能力（Sensitivity）と、陰性結果を陰性と判定できる能力（Specificity）を中心に行った。また、A判定化合物に関しては特にA-Sensitivityを評価した。

国際チャレンジプロジェクトでは上記のA, B, Cの試験データしか提供していないが、詳細データの提供が予測率の向上に重要と考え、Ames試験報告書の電子化とデータベース化に着手した。1986年～2015年までの安衛法Ames試験報告書を厚生労働省から

入手し、電子化と、詳細データの抽出を行った。

（倫理面への配慮）本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果および考察

C.1. 国際共同研究プロジェクト

表1に参加機関とQSARツールを示す。12のQSARベンダーが提供する17のQSARツールがチャレンジした。表2に国際チャレンジプロジェクトに利用した12,140化合物の内訳を示す。3回のトライアルを通して、Ames試験陽性の化合物の割合は15%程度であった。この数字はこれまでの報告と類似しており、概して我が国の新規化学物質の15%程度は変異原性物質であると推察できる。

表3にPhase I, II, IIIのQSARモデルの検出能力の平均値と最小、最大を示したQSARツールの値を示す。また、図1にはSensitivityと1-SpecificityをプロットしたROCグラフを示す。Phase IからIIでは多くのQSARツールでモデルの改良が行われ、全ての評価パラメータが大きく向上した。特にA-Sensitivityは平均73.2%、最大89.5%を示し、このことは強い変異原性物質の多くはQSARによって予測可能であることを示している。また、Specificityは平均84.2%、最大92.8%であった。このことは偽陽性が少なく、非変異原物質は正確に判断できることを示している。

一方、Phase IIからIIIでは顕著な予測率の向上は認められなかった。このことはPhase IIIの化合物には高分子量のものも多く含まれ、またCAS#が存在しないことから新規性が高い構造を持つ物質も多く含まれることが考えられる。Phase IIIの化合物をトレーニ

ングデータに装備すれば、ケミカルスペースを拡大することができるため、さらなるチャレンジでは高い予測率が期待できる。

QSARツールの予測性の向上にはこのように多くに新規データをトレーニングデータに組みこむことが重要ではあるが、数だけでなく、データの質にも目を向ける必要がある。Ames試験の判定には国際的に2倍法、3倍法が陽性判定の基準として用いられている。QSAR予測で陽性と判定され、試験が陰性（偽陽性）のケースには、2倍以下の弱い陽性でありながら再現性、用量依存性が認められるケースがある。この場合、QSARツールで明らかなアラート構造が示された場合は陽性判断が正しいと言える。一方、QSARで陰性予測でも実データが陽性（偽陰性）のケースも見受けられる。この場合、試験データが古く信頼性が問題となる場合や、複数のAmes試験データが有り、1つの試験データが陽性であったために、保守的に陽性と判断され、データベースに組み込まれている場合などがある。今回のチャレンジしたQSARツールの多くは、古いデータベースを用いてモデルを開発しているため、このようなケースが多く認められた。QSARツールのさらなる向上のためには信頼できるデータのみからなるベンチマークデータセットの開発が重要である。

C.2. 詳細データベースの開発

厚生労働省労働基準局安全衛生部化学物質対策課から、1986年～2015年までの約22,000物質についての安衛法Ames試験結果報告書の紙媒体を入手し、スキャニングし電子化（PDF化）を実施した。H30年度はこの内、約16,000を電子化（PDF化）した。

先の国際チャレンジプロジェクトで利用

した12,140化合物の内、1,755物質が陽性物質であったが、これら物質に関しては、陽性を示した菌株、代謝活性化の有無、純度、使用溶媒等の情報を含むデータベースを新たに構築中である。H30年度は572物質を入力し、来年度以降は1,183物質を入力予定である。次回チャレンジプロジェクトの際に、これら詳細データをQSARベンダーに提供する予定である。このデータベースは精度の高いQSARツールの開発に役立つ。

C.3. Ames試験の実施とデータベースの改良

試験データが古く、その信頼性に疑義がある場合や、報告ではAmes試験陽性でありながら発がん性試験では陰性を示す化合物については実際にAmes試験を実施し、試験データを検証し、データベースの修正・改良を行った。表4はH30年度に行った6つの化合物の特徴とAmes試験結果を示す。

これらの多くは非発がん性物質と判定されながら、Ames試験で陽性、もしくは曖昧な結果の報告がある。6つの内、4化合物については陽性の結果が得られた。これらの結果によりこれまでの陽性の結果が正しいことが検証された。変異原性がある物質は理論的には発がん性があることを考えると、これら物質に関しては発がん性試験の報告が間違いであるか、もしくはこれら変異原物質は生体内で代謝され、非変異原物質に変化することが考えられる。後者であれば、*in vivo*変異原性予測モデルの開発に繋がるため、さらにデータを蓄積させる必要がある。

一方、2化合物については陰性の結果であった。4'-(chloroacetyl) acetanilideは1985年に報告されたNTPデータの一つであり、複数

の機関で試験が実施され、TA1537株で陽性を示す試験があったことから Known Positiveとされている。しかしながら、その試験結果には一貫性がなく、疑義があり、また多くのQSARツールで陰性予測であったことからAmes試験を実施した。TA98のS9存在下の高濃度で一過性の弱い陽性反応が検出されたが、強い細胞毒性による非特異的反応と判断した。また、報告があるようなTA1537での陽性は認められなかった。以上のことから4'-(chloroacetyl) acetanilideはAmes陰性であり、QSAR予測が正しいことが証明された。このように、時としてQSARの結果が実際のAmes試験の結果より正しい場合がある。QSARは多くの試験結果の蓄積から変異原性のメカニズムを提供してくれる。実際のAmes試験の評価に際してもQSAR結果を利用することは試験結果の評価に科学的根拠を与えてくれることからQSARを予測だけでなく、Ames試験サポートツールとして利用することを推奨する。

Anilineは芳香族アミンの基本形である。芳香族アミンはAmes変異原性アラートでありながら、Aniline自体はAmes陰性を示すことが多く報告されているが、一部の報告ではTA98の代謝活性化系で弱い陽性を示した。また、AnilineはAmes陰性であるが、他の*in vitro*試験（染色体異常試験、MLA）や、*in vivo*小核試験では陽性を示すため、変異原性発がん物質としている評価書も多い。今回、改めてAmes陰性であることを確認した。芳香族アミンはベンゼン環の水酸化（無毒化）、アミノ基の水酸化（活性化）により変異原性が決定されるため、他の部分構造が変異原性の有無や強さに大きな影響を与える。o-, m-, p-位の官能基による変異原性

発現の量的影響を詳細に調査し、芳香族アミンに対する変異原性増強因子、抑制因子をカタログ化すれば芳香族アミンの変異原性の定量的予測が可能となるかもしれない。

D. 結論

Ames 試験 QSAR に関しては、12,140 化合物の労働安全衛生法 Ames 試験データを用いて QSAR 予測精度の向上を目指す国際チャレンジプロジェクトを実施した。12 の QSAR ベンダーが開発した 17 の QSAR モデルがこの国際チャレンジに参画し、全ての QSAR ツールの予測率が向上した。さらなる予測率の向上のためにはトレーニングデータの精査が重要である。陽性、陰性の試験結果だけでなく、陽性を示した菌株、代謝活性化の有無、純度、溶媒などの情報が、メカニズムベースの予測モデルの開発に有用である。そのため安衛法 Ames 試験データベースの精緻化にも取り組んだ。さらに詳細データベース開発のために全ての Ames 試験報告書の電子化と詳細データベース化も実施中である。また、安衛法 Ames 試験データ以外のデータベースに関しては、信用性向上のために、既存の古く信頼性の低い試験の再試験も実施した。これら取り組みにより信頼性の高いビッグデータのみからなるベンチマークデータセットを構築する。このベンチマークデータセットに基づく QSAR モデルの開発を最終目標とする。

E. 研究発表

誌上発表

1. Amberg A, Andaya RV, Anger LT, Barber C, Beilke L, Bercu J, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cross KP, Custer L, Dobo K,

- Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Gomez S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Naven R, Nicolette J, Parenty A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Sasaki JC, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Woolley D, Myatt GJ. Principles and procedures for handling out-of-domain and indeterminate results as part of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2019, **102**, 59-64. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.12.007.
2. Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, Aptula A, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Burden N, Cammerer Z, Cronin MTD, Cross KP, Custer L, Dettwiler M, Dobo K, Ford KA, Fortin MC, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gervais V, Glover KP, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Hardy B, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Hughes K, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kim MT, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Majer B, Masten S, Miller S, Moser J, Mumtaz M, Muster W, Neilson L, Oprea TI, Patlewicz G, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Ruiz P, Schilter B, Serafimova R, Simpson W, Stavitskaya L, Stidl R, Suarez-Rodriguez D, Szabo DT, Teasdale A, Trejo-Martin A, Valentin JP, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Hasselgren C. In silico toxicology protocols. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2018, **96**, 1-17. doi:10.1016/j.yrtph.2018.04.014.
 3. Mishima M, Hashizume T, Haranosono Y, Nagato Y, Takeshita K, Fukuchi J, and Homma M. Meeting report, ICH M7 relevant workshop: use of (Q)SAR systems and expert judgment. *Genes and Environment.* 2018, **40**:19. doi.org/10.1186/s41021-018-0107-2
 4. Benfenati E, Golbamaki A, Raitano G, Roncaglioni A, Manganelli S, Lemke F, Norinder U, Lo Piparo E, Honma M, Manganaro A, Gini G. A large comparison of integrated SAR/QSAR models of the Ames test for mutagenicity. *SAR QSAR Environ Res.* 2018, **29**, 591-611. doi: 10.1080/1062936X.2018.1497702.
 5. Honma M, Kitazawa A, Cayley A, Williams RV, Barber C, Hanser T, Saiakhov R, Chakravarti S, Myatt GJ, Cross KP, Benfenati E, Raitano G, Mekenyan O, Petkov P, Bossa C, Benigni R, Battistelli CL, Giuliani A, Tcheremenskaia O, DeMeo C, Norinder U, Koga H, Jose C, Jeliaskova N, Kochev N, Paskaleva V, Yang C, Daga PR, Clark RD, Rathman J. Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity: outcomes of the Ames/QSAR International Challenge Project. *Mutagenesis.* 2019, **34**, 3-16. doi:10.1093/mutage/gey031.
 6. Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K,

- Honma M. A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox. *Mutagenesis*. 2019, **34**, 49-54. doi:10.1093/mutage/gey046.
7. Petkov PI, Schultz TW, Honma M, Yamada T, Kaloyanova E, Mekenyan OG. Validation of the performance of TIMES genotoxicity models with EFSA pesticide data. *Mutagenesis*. 2019, **34**, 83-90. doi: 10.1093/mutage/gey035.
 8. Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV. Extrapolation of *in vitro* structural alerts for mutagenicity to the *in vivo* endpoint. *Mutagenesis*. 2019, **34**, 111-121. doi: 10.1093/mutage/gey030.
 9. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M. In silico prediction of chromosome damage: comparison of three (Q)SAR models. *Mutagenesis*. 2019, **34**, 91-100. doi: 10.1093/mutage/gey017.
 10. Amberg A, Anger LT, Bercu J, Bower D, Cross KP, Custer L, Harvey JS, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Leavitt P, Quigley DP, Miller S, Snodin D, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, White AT, Wichard J, Myatt GJ. Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: is aromatic N-oxide a structural alert for predicting DNA-reactive mutagenicity? *Mutagenesis*. 2019, **34**, 67-82. doi: 10.1093/mutage/gey020.
 11. 本間正充、化学物質毒性ビッグデータベースと、インシリコによる毒性予測 IT・ビッグデータと薬学 公益財団法人 日本学術協力財団 89-100 (2019)
- 学会発表
1. 本間正充、医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理 口演、2018年 ISPE 日本支部年次大会、2018/5/24、国内
 2. 本間正充、Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、QSAR2018、2018/06/12、ブレット・スロベニア
 3. 本間正充、遺伝毒性の新たな動き 口演 第45回日本毒性学会学術年会、2018/7/20、国内
 4. 本間正充、Mutagens and carcinogens in Japanese food: evolution of prioritized risk 口演、第49回米国環境変異ゲノミクス学会、2018/9/26、サンアントニオ・米国
 5. 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity 口演、KNect365 Life Sciences Annual Meeting of Genotoxic Impurities、2018/10/24、ベルリン・ドイツ
 6. 本間正充、(QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity and its application to risk assessment 口演、2018 Joint International Workshop "Progress of Genotoxicity Methods and Regulatory Acceptance、2018/11/27、広州・中国
- F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1: Participants in Ames/QSAR International Challenge Project

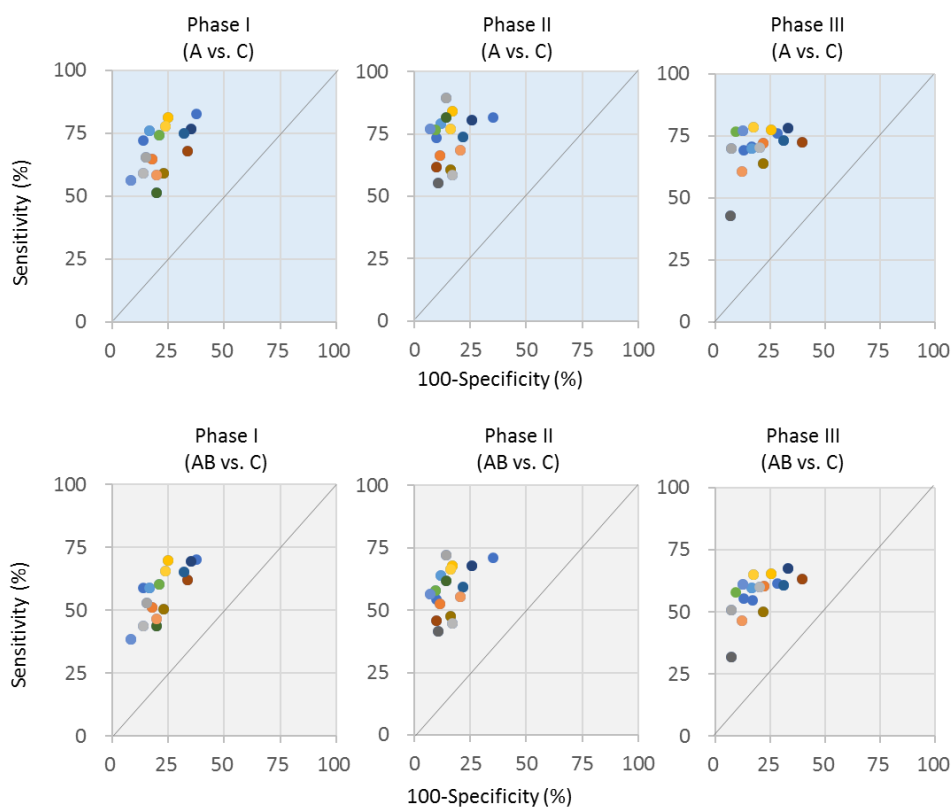
QSAR Vender	QSAR Tool	Methodology
1. Lhasa Limited (UK)	a. Derek Nexus b. Sarah Nexus	
2. MultiCASE Inc (USA)	c. CASE Ultra statistical-based d. CASE Ultra rule-based	
3. Leadscope Inc (USA)	e. Leadscope statistical-based f. Leadscope rule-based	
4. IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri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

表 2: Number of Chemicals in Ames/QSAR International Challenge Project

Class	Phase I (2014-2015)	Phase II (2015-2016)	Phase III (2016-2017)	Total (2014-2017)
Class A	183 (4.7%)	253 (6.6%)	236 (5.4%)	672 (5.5%)
Class B	383 (9.8%)	309 (8.1%)	393 (8.9%)	1,085 (8.9%)
Class C	3,336 (85.5%)	3,267 (85.3%)	3,780 (85.7%)	10,383 (85.6%)
Total	3,902	3,829	4,409	12,140
Only chemicals with >800 m.w.				
Class A	3 (1.8)	1 (2.4)	2 (0.8)	6 (1.3)
Class B	16 (9.7)	1 (2.4)	9 (3.8)	26 (5.8)
Class C	146 (88.5)	39 (95.1)	229 (95.4)	414 (92.8)
Subtotal	165	41	240	446









表 3 : Averages and ranges of the performance metrics of QSAR tools in the Ames/QSAR challenge project

	Phase I	Phase II	Phase III
A-Sensitivity (%)	68.7 (51.4-82.8)	73.2 (55.3-89.5)	70.2 (42.7-78.6)
Sensitivity (%)	56.7 (38.6-70.0)	58.0 (41.6-72.1)	57.1 (31.7-67.6)
Specificity (%)	77.7 (62.5-91.5)	84.2 (64.9-92.8)	79.9 (60.7-93.0)
Accuracy (%)	74.7 (63.6-83.9)	80.3 (65.8-87.7)	76.7 (61.1-87.3)
Balanced Accuracy (%)	67.2 (62.1-72.5)	71.1 (64.0-78.9)	68.5 (62.0-74.4)
MCC	0.28 (0.20-0.39)	0.37 (0.24-0.50)	0.31 (0.17-0.44)
Coverage (%)	91.4 (57.7-100)	89.1 (22.7-100)	92.3 (74.5-100)



☒ 1

表 4 H30 化学物質 Ames 試験実施化合物候補化合物 (6 化合物)
(灰色の 2 化合物は実施していない)

ID	Chemical	Structure	CAS No.	DEFRA Status	GRT/Ultra		文庫調査		その他情報 ECOM, Ames positive, Database_4, 02-2014	判定	コメント	Ames 試験結果	最終判定	溶媒	経度	委託機関
					GTL_SHUT Possibility (%)	Ref source Ames	コメント									
NC3	Acrolein		127-02-8	PLAUSIBLE	Known Positive	48.3	Howarth S, Lawlor T, Montemans K, Speck W, Zager E, Saravola M. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982.	コメント 登録済みの遺伝毒性データなし。EPA (NIH) に登録されている。EPA 登録番号が「012」で、登録済みの遺伝毒性データあり。	FDL+ NTP+	芳香族アミン / 化学的安定性 強い遺伝毒性である	陽性	陽性	水	99% 受評		
NC11	p-bisulfide MD		2026649-8	PLAUSIBLE	Known Positive	74.9	Howarth S, Lawlor T, Montemans K, Speck W, Zager E, Saravola M. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982. Dovek IC, Zager E, Spinks D, McCoy E, Madigan D, Montemans K, Saravola M, and Simon W. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982. Dovek IC, Zager E, Spinks D, McCoy E, Madigan D, Montemans K, Saravola M, and Simon W. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982.	コメント FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。	FDL+ NTP+	芳香族アミン / 化学的安定性 強い遺伝毒性である	陽性	陽性	水	99% 受評		
NC9	1H-benzotriazole		96-14-7	INACTIVE	Negative	22.3	Dovek IC, Zager E, Spinks D, McCoy E, Madigan D, Montemans K, Saravola M, and Simon W. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982.	コメント FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。	FDL+ NTP+	芳香族アミン / 化学的安定性 強い遺伝毒性である	陽性	陽性	DMF/DMSO	90% 受評		
NC11	4-Chloroethyl-1-azetidine (N-Ethylchlorazepine)		142-98-8	INACTIVE	Known Positive	78.9	Dovek IC, Zager E, Spinks D, McCoy E, Madigan D, Montemans K, Saravola M, and Simon W. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982.	コメント FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。	FDL+ NTP+	芳香族アミン / 化学的安定性 強い遺伝毒性である	陽性	陽性	DMF/DMSO	96.20% 受評		
NC8	2-Chloroethyl-1-piperidine MD		6899-41-3	PLAUSIBLE	Known Positive	47.3	Howarth S, Lawlor T, Montemans K, Speck W, Zager E, Saravola M. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982.	コメント FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。	SS+	芳香族アミン / 化学的安定性 強い遺伝毒性である	陽性	陽性	水	97% 受評		
NC11	Diphenyl-piperonyl ether diamine		74-83-7	INACTIVE	Known Positive	22.9	Zager E, Spinks D, McCoy E, Madigan D, Montemans K, Saravola M, and Simon W. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982.	コメント FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。	FDL+ NTP+	芳香族アミン / 化学的安定性 強い遺伝毒性である	陽性	陽性	DMF/DMSO	96.60% 受評		
NC8	Penthoen		918-98-9	EQUIVOCAL	Known Positive	66.4	Howarth S, Lawlor T, Montemans K, Speck W, Zager E, Saravola M. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982.	コメント FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。	FDL+ NTP+	芳香族アミン / 化学的安定性 強い遺伝毒性である	陽性	陽性	DMF/DMSO	96.60% 受評		
NC2	benzine HC1		148-204-1 (66-35-3)	INACTIVE	Known Negative	44.8	Howarth S, Lawlor T, Montemans K, Speck W, Zager E, Saravola M. Ames mutagenicity tests for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 3 (Suppl. 2): 3-142, 1982.	コメント FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。FAIS370 の 4.9% (10/204) で陽性反応を示した。	FDL+ NTP+	芳香族アミン / 化学的安定性 強い遺伝毒性である	陽性	陽性	DMF/DMSO	99% 受評		

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価戦略の開発
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

代謝予測モデルの改良による MoA に基づいた *in vivo* 遺伝毒性予測性の向上に関する研究

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 室長

研究協力者 重田 義之 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 研究員

研究要旨

In silico による *in vivo* 遺伝毒性予測技術の高度化・実用化を実現するためには、*in vitro* 陰性で *in vivo* 陽性の物質を抽出し、その要因を *in vitro/in vivo* における代謝の比較解析から検討する必要がある。その前提として利用するデータの妥当性・適切性が極めて重要となるため、既存の各種データベースから *in vitro* 染色体異常試験 (CA) 陰性で *in vivo* 小核試験 (MN) 陽性と報告されている 21 物質および Ames 試験 (Ames) 陰性でげっ歯類トランスジェニック突然変異試験 (TGR) 陽性と報告されている 13 物質を抽出し、当該試験結果の妥当性を評価した。その結果、前者では 21 物質中 11 物質が、後者では 13 物質中 3 物質が当初の評価通り陰性/陽性で妥当と判断された。また、一部の Ames 陰性・TGR 陽性物質については、その代謝様式の違い、ならびに想定される警告構造について調査し、暫定的な結果を得た。

A. 研究目的

In vitro (肝 S9 画分) と *in vivo* (生物個体) 間の代謝の違いは、異なる遺伝毒性結果を引き起こす可能性がある。特に、*in vitro* 遺伝毒性試験では陰性だが、*in vivo* 試験で陽性となる物質の存在は、遺伝毒性試験戦略ならびに評価において極めて重要な意味を持つ。*In vitro* と *in vivo* における代謝の違いは、概念的には、1) *in vivo* における第 2 相代謝反応の存在、2) 臓器 (肝臓 S9 画分) に対する生物全体の代謝レベルの相違、3) *in*

in vivo における受容体介在性の基質特異的酵素の存在、が挙げられる。すなわち、*in vitro* の代謝系では *in vivo* の代謝系を完全には再現できないと仮定すべきである。しかしながら、この「代謝の違い」を考慮した *in silico* 遺伝毒性予測モデルが構築できれば、特に *in vivo* における予測性の向上につながることを期待できる。最終的には、*in vitro/in vivo* の代謝の相違を反映した代謝予測シミュレータを開発し、Mode of Action (MoA) に基づく *in vivo* 遺伝毒性の予測性の向上を目指

す。そのために、*in vitro* 陰性で *in vivo* 陽性の物質を抽出し、*in vivo* 特異的陽性の要因を *in vitro/in vivo* における代謝の比較解析等から検討する。

B. 研究方法

In vitro 陰性で *in vivo* 陽性の物質を抽出し、その要因を *in vitro/in vivo* における代謝の比較解析等から検討し、*in silico* 予測技術の高度化・実用化を実現するためには、利用する実データの妥当性・適切性が極めて重要となる。*In vitro* あるいは *in vivo* を問わず、質の高い遺伝毒性試験データに基づき、陽性・陰性を判断する必要がある。それらの正しい結果を利用することにより、MoA に基づく *in vivo* 遺伝毒性の *in silico* 予測性の向上が可能となる。そのため、既存の各種データベースから *in vitro* 染色体異常試験 (CA) 陰性で *in vivo* 小核試験 (MN) 陽性と報告されている 21 物質を抽出し、原著論文等の精査により当該試験結果の妥当性を評価した。また、同様に Ames 試験 (Ames) 陰性でげっ歯類トランスジェニック突然変異試験 (TGR) 陽性と報告されている 13 物質を抽出し、当該試験結果の妥当性を評価した。それら遺伝毒性試験データの精査に基づき、今後の研究に活用すべきデータか否かを検証した。また、一部の Ames 陰性・TGR 陽性物質については、暫定的にその代謝様式の違い、ならびに想定される警告構造について調査した。

なお、当初の研究計画では初年度に *in vitro* CA 陰性・*in vivo* MN 陽性物質の抽出とそのデータの妥当性評価ならびに *in vitro/in vivo* 比較解析を、次年度に同様に Ames 陰性・TGR 陽性物質についての検討を実施するものであった。しかしながら、作業効率の

観点から、初年度に *in vitro* CA 陰性・*in vivo* MN 陽性物質および Ames 陰性・TGR 陽性物質のデータの妥当性評価ならびに一部物質についての *in vitro/in vivo* 比較解析を実施し、次年度以降、*in vitro/in vivo* 比較解析を重点的に実施することとした。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C.1. *In vitro* CA 陰性・*in vivo* MN 陽性物質の検証

抽出した 21 物質について評価した試験結果の妥当性の要約を表 1 に、評価の詳細を Appendix 1 に示す。21 物質中 11 物質が、当初の評価通り陰性・陽性 (-ve/+ve) で妥当と判断された。1 物質は、*in vitro* CA 陰性と明確には断定できず、残り 9 物質はいずれか、あるいは両方の結果の評価が異なった。今後の研究に活用すべきデータとしては、前者の 12 物質 (すなわち、Thioacetamide、1,1,2,2-Tetrachloroethane、CI Solvent yellow 14、C.I. Direct black 38、Urethane、Chlordiazepoxide、Procarbazine hydrochloride、Diazepam、Atrazine、Amphetamine、Dimethylvinyl chloride および Salicylazosulfapyridine) を用いることが妥当と考えられた。また、データベースおよび *in silico* 評価における問題点として、*in vitro* CA における数的異常 (異数性/倍数性) を含むか否かが挙げられた。必要に応じ、これに該当する 1 物質 (Thiabendazole) も使用データに含めることが妥当と考えられた。

C.2. Ames 陰性・TGR 陽性物質の検証

抽出した 13 物質について評価した試験結果の妥当性の要約を表 2 に、評価の詳細を Appendix 2 および Appendix 3 に示す。13

物質中 3 物質が、当初の評価通り -ve/+ve で妥当と判断された。2 物質は Ames 陰性の妥当性が確定できず、また、別の 2 物質は TGR 陽性の妥当性が確認できなかった。残り 6 物質はいずれか、あるいは両方の結果の評価が異なるかデータが認められなかった。今後の本研究に活用すべきデータとしては、前者の 3 物質 (Cyproterone acetate, Tamoxifen, Oxazepam) および必要に応じ妥当性に疑問の残る 4 物質 (Dicyclanil, Leucomalachite green, Hexachlorobutadiene, Procarbazine HCl) を用いることが妥当と考えられた。

C.3. 一部の Ames 陰性・TGR 陽性物質の要因解析と TGR 特異的警告構造の抽出

In vitro/in vivo における代謝の相違の例として、対象物質数の少なさから *in vitro* Ames と *in vivo* TGR を対象とした。Ames 陽性および TGR 陰性は、物質が生体内において代謝解毒される、すなわち、*in vivo* における第 2 相代謝反応の存在によると考えられる。一方、Ames 陰性および TGR 陽性は、物質が生体内において代謝活性化される、すなわち、生体活性化第 2 相硫酸抱合反応の存在、あるいは、*in vivo* における追加的の第 1 相代謝反応の存在によると考えられる。本研究では、Ames 陰性および TGR 陽性を対象とし、以下の物質について検討した。

C.3.1. Tamoxifen と Cyproterone acetate

Tamoxifen は α -水酸化された後に硫酸抱合され、脱硫酸すると求電子性の活性中間体となり DNA 付加体を形成すると考えられている。すなわち、第 1 相アリル水酸化を受けた後、第 2 相硫酸抱合されることにより代謝活性化される。これは、*in vivo* 個体においてのみ生じ、*in vitro* の S9 系では、特別な補酵素を添加しない限り生じない。類似の例として Cyproterone acetate が挙げら

れた。これらの知見から、アリルフラグメントは TGR で陽性を示す特異的警告構造として考えられた。4223 物質の Ames データベースには本警告構造を有するものが 161 物質認められ、その大部分 (153 物質) は、Ames 陰性であった。このことは、第 2 相硫酸抱合が *in vitro* の S9 系では生じないことを示唆している。

C.3.2. Oxazepam

Oxazepam の複数の代謝経路の内、環収縮代謝反応による酸化的脱炭酸と脱水素環化で生ずる第 1 相代謝産物が DNA 反応性代謝物と考えられているが、本物質は *in vitro* では認められていない。本知見から、ベンゾジアゼピンフラグメントは TGR で陽性を示す特異的警告構造として考えられた。4223 物質の Ames データベースには本警告構造を有するものは 5 物質しか認められなかったが、いずれも Ames 陰性であった。このことは、*in vivo* で追加的の第 1 相代謝反応が生じていることを示唆している。

D. 考察

既存の各種データベース等に基づく試験結果は必ずしも正確ではないことが図らずも明らかとなった。最終的に *in vitro* CA 陰性・*in vivo* MN 陽性あるいは Ames 陰性・TGR 陽性と評価されたのは、それぞれ 21 物質中 11 物質あるいは 13 物質中 3 物質と、半分以下であった。その要因は、単純な記載間違い、原著論文の読み込み不足、間違った二次資料からの引用などが想定されるが、明らかではない。また、類似の試験結果が存在する場合には、試験の信頼性・妥当性など証拠の重みづけ (Woe) による専門家判断に基づき、結果が異なってくることもある。Ames 陰性・TGR 陽性において結果が正し

いものと判断された 3 物質について、暫定的に *in vitro* と *in vivo* における代謝様式の相違を検討し、また、警告構造を抽出したが、これらについてはより詳細に検討する必要がある。

E. 結論

既存の各種データベースから抽出した *in vitro* CA 陰性・*in vivo* MN 陽性の 21 物質中 11 物質、ならびに Ames 陰性・TGR 陽性の 13 物質中 3 物質が当該結果通りで妥当と判断され、以降の代謝様式あるいは警告構造の検討に利用すべきと考えられた。また、一部の Ames 陰性・TGR 陽性物質について、代謝様式の違いおよび想定される警告構造の暫定的な結果を得た。これらについてはより詳細に検討する必要がある。

F. 研究発表

誌上発表

1. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M: *In silico* prediction of chromosome damage: Comparison of three QSAR models. *Mutagenesis*, **34**, 91-100, 2019.
2. Fujita Y, Honda H, Matsumura S, Yamane M, Morita T, Matsuda T, Morita O: A decision tree-based integrated testing strategy for the tailor-made carcinogenicity evaluation of test substances using genotoxicity test results and chemical spaces, *Mutagenesis*, **34**, 101-109, 2019.
3. Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV : Extrapolation of *in vitro* structural alerts for mutagenicity to the *in vivo* endpoint,

Mutagenesis, **34**, 111-121, 2019.

学会発表

1. 森田 健 ; 遺伝毒性評価のための *in vivo* 試験実施戦略、日本毒性学会シンポジウム：動き始めた遺伝毒性評価の新たな潮流、第 45 回日本毒性学会学術年会 (2018.7、大阪)
2. Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M; Current Situation of *in silico* Prediction of Chromosome Aberration, Environmental Mutagenesis & Genomics Society, 49th Annual Meeting (2018.9, サンアントニオ、米国)
3. Fujita Y, Honda H, Yamane M, Morita T, Matsuda T and Morita O; Integrated testing strategy for carcinogenicity evaluation of chemicals using genotoxicity tests and chemical properties, 20th International Congress on *In Vitro* Toxicology (2018.10, ベルリン、ドイツ)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. *In vitro* CA 陰性・*in vivo* MN 陽性と報告されている 21 物質のデータ評価

#	物質名	CAS	評価結果 CA/MN ¹⁾	備考
1	Thioacetamide	62-55-5	-ve?/+ve	CA陰性は不明確知見
2	1,1,2,2-Tetrachloroethane	79-34-5	-ve/+ve	問題なし
3	4,4'-methylenebis(2-chlorobenzeneamine)	101-14-4	+ve/-ve	倍数体誘発によりCA陽性；WOEによりMN陰性
4	1,4-dichlorobenzene	106-46-7	-ve/-ve	WOEによりMN陰性
5	Thiabendazole	148-79-8	+ve/+ve	異数体誘発によりCA陽性
6	CI Solvent yellow 14	842-07-9	-ve/+ve	問題なし
7	C.I. Direct black 38	1937-37-7	-ve/+ve	問題なし
8	Urethane	51-79-6	-ve/+ve	10 mM以上でCA陽性
9	Carbon tetrachloride	56-23-5	-ve/-ve	MN陽性知見の信頼性疑問
10	Chlordiazepoxide	58-25-3	-ve/+ve	問題なし
11	Acetaldehyde	75-07-0	+ve/+ve	MN陰性知見は減数分裂時
12	Thiram	137-26-8	+ve/+ve	情報収集不足によるCA陰性
13	Procarbazine hydrochloride	366-70-1	-ve/+ve	問題なし
14	Diazepam	439-14-5	-ve/+ve	<i>In vitro</i> MN陽性（異数性）
15	Atrazine	1912-24-9	-ve/+ve	問題なし
16	Chloracetophone	74940-61-6	-ve/-ve	ハムスターによるMN陽性知見は疑問；ラットでは陰性
17	Amphetamine	300-62-9	-ve/+ve	問題なし
18	Dimethylvinyl chloride	513-37-1	-ve/+ve	問題なし
19	Propylene glycol mon-t-butyl ether	57018-52-7	-ve/-ve	マウス3か月吸入による雌のMN陽性は疑問；雄は陰性
20	Cypermethrin	52315-07-8	-ve/-ve	GLP試験結果に基づくWOEにより陰性
21	Salicylazosulfapyridine	599-79-1	-ve/+ve	<i>In vitro</i> MN陽性（異数性）
1)	<i>In vitro</i> CA/ <i>in vivo</i> MN			
	:評価結果が変更したもの			

表 2. Ames 陰性・TGR 陽性 (-ve/+ve) と報告されている 13 物質のデータ評価

#	物質名	CAS	評価結果 Ames/TGR	備考
1	Cyproterone acetate	427-51-0	-ve/+ve	問題なし
2	Dicyclanil	112636-83-6	-ve/+ve?	TGRの陽性知見は行政目的では疑問的。
3	Adozelesin	110314-48-2	No data/+ve	Ames知見は確認できず。
4	Leucomalachite green	129-73-7	-ve/+ve?	TGRの陽性知見は行政目的では疑問的。
5	Solasodine	126-17-0	No data/-ve	Ames知見は確認できず。本物質のTGR知見は陰性。
6	Rachelmycin	69866-21-3	+ve/+ve	Ames陰性は不適切な情報収集による
7	Tamoxifen	10540-29-1	-ve/+ve	問題なし
8	alpha-Hydroxytamoxifen	97151-02-5	No data/+ve	Ames知見は確認できず。
9	Oxazepam	604-75-1	-ve/+ve	問題なし
10	Benzene	71-43-2	-ve/-ve	12週吸入曝露によるTGR陽性知見は信頼性に乏しい。経口投与では陰性。
11	Hexachlorobutadiene	87-68-3	-ve?/+ve	Amesは33 ug/plateまでの試験。最高用量の適切性疑問。
12	Procarbazine HCl	366-70-1	-ve?/+ve	Amesは333 ug/plateまでの試験。最高用量の適切性疑問。
13	Uracil	66-22-8	-ve/-ve	TGR陽性は細胞増殖亢進による二次的なもの
	評価結果が変更したもの			

Appendix 1. Evaluation of *in vivo* bone marrow (BM) or peripheral blood (PB) micronucleus (MN) data on certain chemicals which showed negative in *in vitro* chromosomal aberration (CA) test but positive in *in vivo* MN test.

#	Name (CAS)	In vitro CA	In vivo MN	Evaluation of in vitro CA and in vivo MN data
1	Thioacetamide (62-55-5)	-ve → OK, but nonclear -ve	+ve → OK	Mirkova reported positive in mouse BM MN test (Mutat Res., 352, 23-30, 1996). Thioacetamide showed reproducible positive responses in C57BL/6 male and female mice treated by oral gavage up to 1500 mg/kg. In BALB/c male and female mice, weak response was shown (no clear dose-response, no reproducible) in mortality dose range. I suppose it was negative in BALB/c mice. Morita et al summarized as positive in <i>in vivo</i> MN to thioacetamide (Mutat Res., 786-788, 14-44, 2015), in which thioacetamide is metabolized <i>in vivo</i> to acetamide. Acetamide was negative both in Ames test and mouse BM MN test (Mirkova, 1996; Morita et al., 1997). On the other hand, thioacetamide was negative in repeated dose rat BM MN and liver MN tests for 14- or 28-days treatment up to 20 mg/kg/day (Hamada et al., Mutata. Res., 780-781, 2-17, 2015). Data from <i>in vitro</i> CA test of thioacetamide was assigned TC (technically compromised, original call by the authors was negative) in CGX database (Kirkland et al., Mutat. Res., 584, 1-256, 2005; Morita et al., Mutat Res., 802, 1-29, 2016). Overall evaluation is non-clear negative in <i>in vitro</i> CA test and positive in <i>in vivo</i> MN test by single high dose oral exposure.
2	1,1,2,2-Tetrachloroethane (79-34-5)	-ve → OK	+ve → OK	Morita et al., 1997 does not mention <i>in vivo</i> MN test result on 1,1,2,2-tetrachloroethane. It will be Morita et al., 2016. The compound showed positive response in mouse peripheral blood (normochromatic erythrocytes) MN test by feeding for 14 weeks up to 9100 ppm (Morita et al., 2016; NTP TOX 49, https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/st_rpts/tow049.pdf). The response was weak both male and females, but statistically significant (pair wise and trend tests). Overall evaluation is negative in <i>in vitro</i> CA and positive in <i>in vivo</i> MN test using mouse normochromatic erythrocytes by feeding for 14 weeks.
3	4,4'-methylenebis(2-chlorobenzeneamine) (101-14-4) Synonym: 4,4'-methylene-bis-[2-chloroaniline] (MOCA)	-ve → +ve in numerical aberration (polyploidy)	+ve → -ve	Heddle et al (Mutation Res., 123, 61-118, 1983) summarized MN data on this compound; -u in Tsuchimoto & Matter, 1981, + in Salamone et al., 1981. Mavournin et al (Mutat Res., 239, 29-80, 1990) also summarized the positive data. However, no details were given on the positive finding, thus no conclusion can be given. Morita et al (1997) reported negative in CD-1 mouse BM MN test by ip injection in 3 independent assays and positive in MS mouse PB MN test by ip injection in one assay. In conclusion, the data was "inconclusive" in Morita et al (1997). Wakata et al (Environ Mol Mutagen., 32, 84-100, 1998) reported also negative in rat BM and PB MN test by ip dosing. Based on these two reports, Morita et al (2016) assigned negative in <i>in vivo</i> MN on this compound. With respect to <i>in vitro</i> CA/MN, this compound induced polyploidy in CA (http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/file/file101-14-4.html) and MN (Matsushima et al., Mutagenesis, 14, 569-580, 1999). Therefore, Morita et al (2016) assigned positive in <i>in vitro</i> CA on this compound. Overall evaluation is positive in <i>in vitro</i> CA as polyploidy and negative in <i>in vivo</i> MN test in usual mouse strains and rat treated by ip injection.
4	1,4-dichlorobenzene (106-46-7)	-ve → OK	+ve → -ve	Mohitashampur et al (Mutagenesis, 2, 111-113, 1987) reported as positive in <i>in vivo</i> mouse BM MN test by ip injection. However, this data is doubtful; one control group for 8 test compounds, MN frequencies in the lowest dose in all 8 compounds were higher than the control, benzene was positive by ip injection (usually, benzene was positive by po route, but negative by ip route). Morita et al (1997) and Witt et al (Environ Mol Mutagen., 36, 163-194, 2000) reported negative in <i>in vivo</i> mouse PB MN by ip or po route, thus Morita et al (2016) assigned negative in <i>in vivo</i> MN. Overall evaluation is negative in <i>in vitro</i> CA and negative in <i>in vivo</i> MN test. Please also see EU risk assessment report (https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eu-scientific-and-technical-research-reports/european-union-risk-assessment-report-14-dichlorobenzene-cas-no-106-46-7-einecs-no-203-400-5) and EPA toxicological review (https://ofmpub.epa.gov/eims/eimscmm.getfile?p_download_id=457549).
5	Thiabendazole (148-79-8)	-ve → +ve (aneugenicity)	+ve → OK	Mudry de Pargament et al (Mutat Res., 188, 1-6, 1987) reported that thiabendazole (TBZ) was positive in mouse BM MN test by ip dosing up to 200 mg/kg. JECFA reported positive in <i>in vitro</i> CA (aneuploidy) and negative in <i>in vivo</i> CA (http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v39je02.htm). Food Safety Committee Japan (FSCJ, 2014; Japanese) reported positive in <i>in vitro</i> CA (aneugenicity) and positive <i>in vivo</i> BM MN by ip injection. The mechanism of aneugenicity by TBZ is tubulin polymerization inhibition. Overall evaluation is positive in <i>in vitro</i> CA (aneugenicity) and positive in <i>in vivo</i> MN by ip injection.

6	1-Phenylazo-2-naphthol (CI Solvent yellow 14) (842-07-9)	-ve → OK	+ve → OK	Elliott et al (Mutagenesis, 12, 2555-258, 1987) reported positive in rat BM MN (clear effect) and in mouse BM MN (weak effect) by oral gavage at 5000 mg/kg. Wakata et al (1998) reported solvent yellow 14 was positive in rat BM (clear) and PB (weak) MN test by oral route up to 2000 mg/kg. Hamada et al (2015) also reported positive in rat repeated dose BM MN test (14 days), but negative in rat repeated dose liver MN test up to 600 mg/kg/day. Overall evaluation is positive in in vivo rat BM MN by po single or 14-days treatment. Please also see EFSA opinion (http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/263.pdf).
7	C.I. Direct black 38 (1937-37-7)	-ve → OK	+ve → OK	Beije (Mutat Res., 187, 227-234, 1987) reported positive (weak effect) in rat BM MN test by oral gavage up to 1000 mg/kg. Overall evaluation is positive in in vivo rat BM MN by po treatment.
8	Urethane (51-79-6)	MNT -ve → OK (CA -ve, but +ve at more than 10 mM)	+ve → OK	Odagiri et al (Mutat Res., 170, 79-83, 1986) reported positive in in vivo mouse BM MN by inhalation up to 150 min at 13 mg/L. Urethane also showed positive in in vivo mouse PB MN by oral gavage up to 1000 mg/kg (CSGMT, Mutat. Res., 278, 83-98, 1992; Morita et al., 2016). With respect to in vitro CA, urethane showed positive response at equal or more than 90 mM, resulting in negative call based on the recent test guidelines (limit to 10 mM or 2 mg/mL) (Morita et al., Mutat Res., 769, 34-49, 2014; Morita et al., 2016).
9	Carbon tetrachloride (56-23-5)	-ve → OK	+ve → -ve	Ye et al (2004, Chinese) reported positive in mouse BM MN test (for abstract, http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotol-HJY7200406008.htm). The mice were treated by ip injection up to 25 mg/kg. I suppose that this finding is quite doubtful. Morita et al reported clear negative in mouse BM/PB MN test by ip or po treatment up to 2000 mg/kg in four independent assays (Morita et al., 389, 3-122, 1997). In vitro CA data by Sofumi (1998) is negative. Morita et al summarized to in vitro CA-negative and in vivo MN-positive (Morita et al., Mutat Res., 802, 1-29, 2016). Overall evaluation is negative in in vitro CA and negative in several reliable in vivo MN tests.
10	Chlordiazepoxide (58-25-3) [Chlordiazepoxide HCL (438-41-5)]	-ve → OK	+ve → OK	Kirkland et al summarized genotoxicity data on this chemical as in vitro CA-negative and in vivo MN-positive (Kirkland et al., Mutat Res., 721, 27-73, 2011). It cited Snyder (2009) as one of two references, which is based on the PDR (Snyder, Environ. Mol. Mutagen., 50, 435-450, 2009). In the other data, Susheela reported positive in in vivo mouse BM MN test (Susheela and Rao, Toxicol Lett., 18, 45-48, 1983). The mice treated with chlordiazepoxide HCL by ip or po route up to 201 mg/kg or 562 mg/kg, respectively, resulting in both positive. In vitro CA data by Sofumi (1998) is negative. Overall evaluation is negative in in vitro CA and positive in in vivo MN tests.
11	Acetaldehyde (75-07-0)	-ve → +ve	+ve → OK	The paper by Lahdetie (1988) is not good reference for this project; it showed negative in meiotic MN. Morita et al (1997) reported positive in mouse BM MN by ip dosing up to 400 mg/kg in two independent assays. In vitro CA data by Sofumi (1998) is positive with and without S9. CGX database summarize in vitro CA-positive and in vivo MN-positive ((Kirkland et al., Mutat. Res., 584, 1-256, 2005; Morita et al., 2016). Overall evaluation is positive in in vitro CA and positive in in vivo MN tests.
12	Tetramethylthiuram disulfide (Thiram) (137-26-8)	-ve → +ve	+ve → OK	In vitro CA data by Sofumi (1998) is positive with S9 mix and equivocal without S9. Kirkland et al (2011) summarized to in vitro CA-positive and in vivo MN-positive. IARC mono V53 (https://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/0015090osh.pdf) and Netherland (https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol53/mono53-16.pdf) also presented positive results in both tests. Overall evaluation is positive in both in vitro CA and in vivo MN tests.
13	Procabazine hydrochloride (366-70-1)	-ve → OK	+ve → OK	Morita et al (2016) summarized to in vitro CA-negative and in vivo MN-positive, which cited CSGMT data presenting clear positive (CSGMT, Mutat Res., 278, 83-98, 1992). The data from CSGMT will be more reliable than Bruce et al (1979). In vitro CA data by Sofumi (1998) is negative. Overall evaluation is negative in in vitro CA and positive in in vivo MN tests.
14	Diazepam (439-14-5)	-ve → OK, but in vitro MN +ve (aneugenicity)	+ve → OK	Morita et al (2016) summarized to in vitro CA-negative using Kirkland et al (2005) and in vivo MN-positive. Garza et al (Arch Med Res., 29, 285-289, 1998) also showed positive in mouse BM MN test. In vitro CA data by Sofumi (1998) is negative, but short-term treatment (e.g., 6 hrs) was not employed. So, this negative is technically compromised (TC) negative. On the other hand, Snyder (2009) reported positive in in vitro CA based on the data from PDR. Schuler et al also showed positive in in vitro MN test (Mutat Res., 702, 219-229, 2010). Diazepam is considered aneugen. Overall evaluation is negative in in vitro CA (but positive in in vitro MN due to aneugenicity) and positive in in vivo MN tests.
15	Atrazine (1912-24-9)	-ve → OK	+ve → OK	CGX database showed in vitro CA-negative and in vivo MN-positive (Kirkland et al, 2005; Morita et al., 2016). In vitro CA data by Sofumi (1998) is negative. Overall evaluation is negative in in vitro CA and positive in in vivo MN tests.

16	2-chloroacetophenone (532-27-4) [Maybe Chloracetophenone (74940-61-6)]	-ve → OK	+ve → -ve (in rats)	2-Chloroacetophenone (CAS 532-27-4) will not be correct chemical. Because NTP TR379 reported weak positive in vitro CA test without S9. The chemical to be evaluated will be chloracetophenone (74940-61-6; Kirkland et al., 2011; but, the name of 'chloroacetophenone' is described in this paper.). Kirkland et al (2011) summarized to Ames-positive (TA100, with and without S9, less than x2, up to 6000 ug/p), in vitro MN-negative with TC, in vitro CA-negative with TC, in vivo MN-negative in rats, but -positive in hamsters, in vivo CA-negative in rats and hamsters. All data were from Kappas et al (Mutat Res., 240, 203-208, 1990). In Kappas paper, other negative in rat BM MN test was described. From WOE approach, the positive finding in hamster BM MN is questionable. Overall evaluation is negative in in vitro CA and negative in in vivo rat MN tests.
17	Amphetamine, alpha-methylphenethylamine (300-62-9)	-ve → OK	+ve → OK	Morita et al (2016) summarized to in vitro CA-negative and in vivo MN-positive. Tariq et al reported the in vivo MN-positive originally (Mutat Res., 190, 153-157, 1987). NTP TR387 reported in vitro CA-negative. US FDA (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/208147s0031b1.pdf) also mentioned in vitro CA-negative and in vivo MN-positive for d, l-Amphetamine (1:1 enantiomer ratio). However, amphetamine, in the enantiomer ratio present in DYANAVEL XR (d- to l-ratio of 3.2 to 1), was not clastogenic in the mouse bone marrow micronucleus test in vivo. Overall evaluation is negative in in vitro CA and positive in in vivo MN tests.
18	Dimethylvinyl chloride (513-37-1)	-ve → OK	+ve → OK	Morita et al (2016) summarized to in vitro CA-negative and in vivo MN-positive, based on the US NTP data. Overall evaluation is also negative in in vitro CA and positive in in vivo MN tests.
19	Propylene glycol mon-t-butyl ether (57018-52-7)	-ve → OK	+ve → -ve	NTP TR515 reported Ames-positive (TA97 without S9, up to 10000 ug/p, x2.1-2.4 at 10000 ug/p), in vitro CA-negative, in vivo mouse PB (normochromatic erythrocytes) MN-negative in males, but -positive (statistically significant) in females by inhalation for 3 months at 1200 ppm (max. conc.). The MN frequency were 1.05/1000 in cont vs 1.10/1000 at 1200 ppm in male, and 0.70/1000 in cont vs 1.25/1000 at 1200 ppm in female. The effect was very small, and biological significance is questionable. Overall evaluation is negative in in vitro CA and negative in in vivo MN tests.
20	Cypermethrin (52315-07-8)	-ve → OK	+ve → -ve	Pluijmen et al (1984) reported negative in V79 HGPRT and OUA mutation test, not in vitro CA test (Mutat Res., 137, 7-15, 1984). PDM 163 cited Amer et al as positive in mouse BM CA by ip route (180 mg/kg of cis:trans=1:1), not BM MN (not examined) (Amer et al., J Appl. Toxicol. 13, 341-345, 1993). Amer et al also reported positive in mouse BM MN by oral route (feeding for 14 days up to 900 ppm), but negative by ip route up to 180 mg/kg of cis:trans=1:1 (Amer et al, Mutat Res., 155, 135-142, 1985). Kirkland et al (2011) summarized to Ames-negative, in vitro MN-positive, in vitro CA-positive, in vivo MN-positive and in vivo CA-positive. Regulatory genotoxicity data are generally negative in EC (https://cirabc.europa.eu/sd/a/2a9e841c-ed61-4922-93fc-f8b2d61742a2/Cypermethrin%20(assessment%20report%20as%20finalised%20on%2012.07.13).pdf) which says "In vivo, cypermethrin cis:trans/40:60 did not produce micronuclei in the immature erythrocytes of the mouse bone marrow micronucleus assay (single oral dose), and was, therefore considered negative for mutagenicity. The open literature provides inconsistent evidence of genotoxicity in vitro as well as in vivo. The global weight-of-evidence suggests that cypermethrin cis:trans/40:60 should not be considered a genotoxicant." and Japanese pesticide evaluation (negative in Ames, in vitro CA, hamster in vivo BM CA by po route up to 40 mg/kg, in vivo rat liver UDS by po route up to 200 mg/kg for cypermethrin; negative in Ames, MLA, in vitro CA, in vivo rat BM CA by po route up to 8 mg/kg, in vivo mouse MN by po route up to 10 mg/kg for alpha-cypermethrin; negative in Ames (small response (x2) at 10000 ug/p in TA100), CHO HGPRT mutation, in vitro CA, in vivo rat BM CA by po route up to 125 mg/kg for zeta-cypermethrin), but mixed results (evaluated by regulatory and published data) in Canada (http://publications.gc.ca/site/archive-archived.html?url=http://publications.gc.ca/collections/collection_2016/sc-hc/H113-27-2016-18-eng.pdf). Cypermethrin has several formula/preparations, and regulatory data and published data are inconsistent, which makes evaluation difficult. Evaluation based on the regulatory data is negative in both in vitro CA and in vivo MN tests. On the other hand, evaluation based on the published data is positive in both in vitro CA
21	Salicylazosulfapyridine ; sulfasalazine; (599-79-1)	-ve → OK, but in vitro MN +ve (aneugenicity)	+ve → OK	Kirkland et al (2011) summarized to Ames-negative with TC, in vitro MN-positive, in vitro CA-negative with TC, in vivo MN-positive and in vivo CA-negative. Bishop et al (1990) reported in vitro CA-negative and in vivo MN-positive (Mutagenesis, 5, 549-554, 1990). Bishop et al also reported in vivo MN-positive by kinetochore positive (Mutat Res., 283, 53-57, 1992). This, aneugenic effect of this chemical, will be due to negative in in vitro and in vivo CA-negative, and in vitro and in vivo MN-positive. Iatropoulos et al also summarized genotoxicity data (in vitro CA-negative, in vitro MN-positive, in vivo MN-positive) and reported that "SASP and its major metabolites are not genotoxic. Folate deficiency associated with SASP administration is probably responsible for aneuploidy in lymphocytes and erythrocytes" (Iatropoulos et al., Exp. Toxic Pathol, 49, 15-28, 1997). Overall evaluation is negative in in vitro CA (but positive in in vitro MN due to aneugenicity and positive in in vivo MN tests.

Appendix 2. Evaluation of 9 substances having *in vitro* Ames negative and *in vivo* TGR positive data

#	Name (CAS)	In vitro CA	In vivo MN	Evaluation of Ames and TGR data
1	Cyproterone acetate (427-51-0)	-ve → OK	+ve → OK	Negative in the Ames test by Lang & Reimann (Environ Mol Mutagen, 21, 272-304, 1993) has been confirmed. There was no Ames data on E. coli or TA102. However, it will be OK that this chemical is considered as Ames-negative (Kasper, Pharmacol. Toxicol. 88, 223-231, 2001). Positive in TGR test by Krebs et al (Carcinogenesis, 19, 241-245, 1998) has been also confirmed, in which the chemical was administered by single oral dose of 20 to 100 mg/kg to female Big Blue F344 rat for investigation of Lac I mutation in the liver. The mutant frequencies were less than 4 times above the control at the highest dose of 200, 100 or 100 mg/kg in the expression periods of 6, 11 or 22 days, respectively. However, the effect was reproducible (Krebs et al, 1998; Topinka et al, Pharmacol. Toxicol. 85, S1, 22, 1999, Abstract; Kasper, 2001). Overall evaluation is negative in Ames and positive in TGR.
2	Dicyclanil (112636-83-6)	-ve → OK	+ve → Questionable +ve	The references of Umemura et al (Mutat Res., 633, 46-54, 2007) and Moto et al (J Toxicol Sci, 28, 173-179, 2003) are not suitable for Ames-negative, because no Ames data are presented. The JECFA/WHO Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food, WHO Food Additives Series, No. 45, 2000 will be useful (http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v45je04.htm). Ames test results are negative in house reports. Umemura et al showed positive in TGR assay in female mice, but not male, in which dicyclanil was administered by feed (0.15%) for 13 weeks to male and female B6C3F1 gpt delta mice for 6-TG mutation in the liver. The mutant frequency in the treatment group was about 5 times above the control group. I suppose the data has several limitations as follows: 1) only single dose employed (difficult for evaluation of dose-response relationship), 2) 13 weeks treatment (longer than the guideline length of 4 weeks), 3) no positive control employed (difficult for evaluation of data quality), 4) increase of liver weight observed (mitogenic effect), and 5) no clear differences identified in oxidative stress as 8-OHdG level between male and female (difficult for clear explanation of the difference between male and female). Therefore, the positive TGR data is questionable for regulatory use. Thus, overall evaluation is negative in Ames and questionable positive in TGR.
3	Adozelesin (110314-48-2)	-ve → No data	+ve → OK	The reference on Ames-negative (Harbach et al, Cancer Res., 48, 32-36, 1988) does not present any Ames data on adozelesin. Based on the TGR review paper by Lambert et al (Mutat Res., 590, 1-280, 2005), there is no Ames data. Positive in TGR test by Monroe and Mitchell (Cancer Res., 53, 5690-5696, 1993) has been confirmed, in which adozelesin was administered by single iv injection of 0.036 mg/kg to male Big Blue mice for investigation of Lac I mutation in the liver (also in review papers by Lambert et al, 2005, and OECD, 2009: SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT, Number 103, DETAILED REVIEW PAPER ON TRANSGENIC RODENT MUTATION ASSAYS, 2009 (http://www.oecd.org/mwg-internal/de5fs23hu73ds/progress?id=vDjt3QSQicizf02YTLEpG6LU2h8yH1IoaOCHS Jz2j6w.&dl)). The mutant frequencies in the treatment group were about 3 times higher than the control group at 3 or 15 days after the treatment. The effect was expression time dependent (negative at 18 hrs after the treatment). Overall evaluation is no data in Ames and positive in TGR.
4	Leucomalachite green (129-73-7)	-ve → OK	+ve → Questionable	Negative in the Ames test by Fessard et al (J Appl. Toxicol. 19, 421-430, 1999) has been confirmed, in which 4 strains of S. thymipurium (TA97a, TA98, TA100, TA102) were employed and tested up to 2 mg/plate (precipitation at >0.5 mg/plate). Positive in TGR test by Mittelstaedt et al (Mutat Res., 561, 127-138, 2004) has been confirmed, in which the chemical was administered by feeding of 204 or 408 ppm to female Big Blue mice for 4 or 16 weeks. No increase in lymphocyte Hprt mutant frequencies were observed. On the other hand, weak increase in liver cII mutant frequencies (less than 2 times of the control) were observed at 408 ppm for 16 weeks treatment (no data presented by 204 ppm- or 4 weeks-treatment). The weak effect will be due to 2 of 6 high responder mice. In female Big Blue rats treated by feeding at 543 ppm for 16 weeks, no increase in liver cII mutant frequencies were observed. I suppose the data has several limitations as follows: 1) only single dose data presented (difficult for evaluation of dose-response relationship), 2) 16 weeks treatment (longer than the guideline length of 4 weeks), and 3) no positive control employed (difficult for evaluation of data quality). Therefore, the positive TGR data is questionable for regulatory use. Thus, overall evaluation is negative in Ames and questionable positive in TGR.

5	Solasodine (126-17-0)	-ve → No data	+ve → -ve	The reference of Friedman et al (Fd Chem Toxicol, 41, 61-71, 2003) is not for Ames test data. Based on the review document by Kirkland et al (Mutat Res., 721, 27-73, 2011), no Ames data is existed. Positive in TGR test by Crawford and Myhr (Fd Chem Toxicol, 33, 191-194, 1995) has been confirmed, in which solasodine was administered by ip injection at 300 mg/kg (MTD) for 3 days to impregnated female MutaMouse. The reference mentions that no increase in lacZ mutant frequencies in the dam livers was obtained by solasodine, but three or four times above spontaneous background were shown by alpha-solanine, solanidine or alpha-chaconine. Therefore, solasodine is not positive in TGR assay. Thus, overall evaluation is no data in Ames and negative in TGR. Kirkland et al (2011) summarizes that solanidine and alpha-solanine are negative in the Ames test, but positive in TGR assay. Solasodine is also shown as TGR-positive, but it is a mistake. Instead of solasodine, selection of solanidine or alpha-solanine might be better. However, quality of both positive data in the TGR assay is not suitable for regulatory use.
6	Rachelmycin (69866-21-3) Synonym: CC-1065	-ve → OK	+ve → OK	The reference cited as Ames-negative is ChemID which is the acute toxicity database for toxicology. Genotoxicity data is not included in the database. Synonym of rachelmycin is CC-1065 based on ChemID; the Ames positive data in TA100 is shown in Harbach et al, 1988 (see #3 Adozelesin). Thus, the reference (Harbach et al, 1988) cited as TGR-positive is not suitable, it is for Ames-negative. A reference cited as TGR-positive should be Monroe and Mitchell, 1993 (see #3 Adozelesin). It has been confirmed, in which CC-1065 was administered by single iv injection of 0.050 mg/kg to male Big Blue mice for investigation of Lac I mutation in the liver (also in review paper by Lambert et al, 2005, and OECD, 2009). The mutant frequencies in the treatment group were about 3 times above the control group at 3 days after the treatment. CC-1065 binds to double-strand DNA irreversibly, and CC-1065 is mutagenic bacteria and mammalian cells (Harbach et al, 1988). From the mode of action of CC-1065, the positive finding in TGR assay is reasonable. Overall evaluation is both positive in Ames and TGR.
7	Tamoxifen (10540-29-1)	-ve → OK	+ve → OK	The reference of Glatt et al (Carcinogenesis, 19, 1709-1713, 1998) cited as Ames-negative is not suitable reference; it contains modified Ames data on alpha-hydroxytamoxifen, but not tamoxifen. PDR genotoxicity database by Snyder (Mutata Res., 488, 151-169, 2001; Environ Mol Mutagen, 50, 435-450, 2009) shows negative in Ames test. TGR database shows also Ames-negative (Lambert et al, 2005; OECD, 2009). The reference of White (Carcinogenesis, 20, 1153-1160, 1999) cites as TGR-positive is not good reference. Davies et al (Cancer Res, 57, 1288-1293, 1997, http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/57/7/1288.full.pdf) or Kawamura et al (Toxicology, 312, 56-62, 2013) are better references. Review paper by Nohmi et al (Genes Environ, 39:11, 2017, https://genesenvironment.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s41021-016-0072-6) is also good reference for this purpose. Tamoxifen showed TGR-positive in female Big Blue or gpt delta rats liver treated by ip injection, gavage or diet. Overall evaluation is negative in Ames and positive in TGR.
8	alpha-Hydroxytamoxifen (97151-02-5)	-ve → No data	+ve → OK	The reference of Glatt et al (1998) cited as Ames-negative is not suitable reference; it shows negative in TA1538 and positive in TA 1538-rHStA (expressing rat hydroxysteroid sulfotransferase a). These data do not provide any positive/negative conclusion in the Ames test. Kirkland et al (2011) concluded as +M (positive by modified assay including sulfotransferases) to the result. TGR database papers say no data for Ames test (Lambert et al, 2005; OECD, 2009). The reference of Boockale et al (Carcinogenesis, 20, 153-160, 1999) cites as TGR-positive is not suitable reference; there is no TGR data. White et al (Carcinogenesis, 22, 553-557, 2001, https://academic.oup.com/carcin/article/22/4/553/2529895), Chen et al (Carcinogenesis, 23, 1751-1757, 2002, https://academic.oup.com/carcin/article/23/10/1751/2896663), and Costa et al (Cancer Lett, 176, 37-53, 2002, https://ac.els-cdn.com/S0304383501007418/1-s2.0-S0304383501007418-main.pdf?_tid=d5f1636f-3d5b-4747-8525-4910ff1516ca&acdnat=1533015238_68dd1f533d8a355c64935430dc174d3f) are better references. Review paper by Nohmi et al (2017) is also good reference for this purpose. Alpha-hydroxytamoxifen showed TGR-positive in female Big Blue rat liver treated by ip injection or gavage. Overall evaluation is no data in Ames and positive in TGR.
9	Oxazepam (604-75-1)	-ve → OK	+ve → OK	The reference of Griffin and Burka (Drug Metab. Dispos. 23, 232-239, 1995) cited as Ames-negative is not suitable reference; there is no Ames data. PDR genotoxicity database by Snyder (2009) shows negative in Ames test. Definitive Ames data is presented by NTP TR443, 2003 (https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr443.pdf), in which oxazepam was negative in TA102, TA100, TA1535, TA97, or TA98 up to 3333 ug/plate. Positive in TGR test by Shane et al (Carcinogenesis, 20, 1315-1321, 1999) has been confirmed, in which oxazepam was administered by feeding of 2500 ppm to male Big Blue mice for 180 days. About 2 times increase of mutant frequency (Lac I) in the liver was observed. Additional work by Singh et al (Biochem Pharmacol, 62, 685-692, 2001, https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295201007225?via%3DIihub) showed similar positive result, in which oxazepam was administered by feeding of 2500 ppm to male Big Blue mice for 180 days. About 2 times increase of mutant frequency (cII) in the liver was observed. Overall evaluation is negative in Ames and positive in TGR.

Appendix 3. 発がん性物質で Ames 陰性で TGR 陽性 4 物質の再評価結果

#	Chemical	CAS No.	Ames		TGR			
			Ames Result	Ref Ames	TGR Result	Ref TGR	TGR Comments	
1	benzene	71-43-2	N	Zeiger E. and Haworth S., Test with a preincubation modification of the Salmonella/microsome assay. In Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Ashby, J., de Serres, F. J., Draper, M., Ishidate, M., Jr., Margolin, B. H., Matter, B. E. ... F. J., Draper, M., Ishidate, M., Jr., Margolin, B. H., Matter, B. E., and Shelby, M. D. (Eds). Elsevier/North Holland, Haworth S., Lawlor T, Montelmann K, Speck W, Zeiger E. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 5 (Suppl.1), 3-142, 1983. TAL535, TAL00, TAL537, TA98 で 333ug/plate までしか試験してはいない		Mullin, A.H. et al. (1995) Inhalation of benzene leads to an increase in the mutant frequencies of a lacI transgene in lung and spleen tissues of mice. Mutat. Res., 327(1-2): 121-129. Provost, G.S. et al. (1996) Mutagenic response to benzene and tris(2,3-dibromopropyl)-phosphate in the lambda lact transgenic mouse mutation assay: a standardized approach to in vivo mutation analysis. Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 342-347.	Mullinの論文は陽性判断。BigBlueマウス。IacI. 300ppm(10日間)で吸入暴露。1日6時間。週5日。12週間継続した。肝臓で1.7倍。脾臓で1.5倍のMFの増加。肝臓では変異の増加無し。 Provostの論文は陽性。BugBlueマウス。IacI。経口投与。2000, 400, 750mg/kg 5日間投与後14日後にさす。肝臓(XL-A)、骨髄。脾臓(XL-B)でわずかな増加。肝臓、脾臓、統計学的には陽性。 前者は大学、後者はCROのデータ。試験デザイン、信頼性を考慮し、陽性判断。	
2	Hexachlorobutadiene	87-68-3	N	Haworth S, Lawlor T, Montelmann K, Speck W, Zeiger E. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ. Mutagen. 5 (Suppl.1), 3-142, 1983. TAL535, TAL00, TAL537, TA98 で 333ug/plate までしか試験してはいない		Unpublished data		
3	Procarbazine HCl	366-70-1	N	Dunkel VC, Zeiger E, Brusick D, McCoy E, McGregor D, Montelmann K, Rosenkranz HS, Simmon VF. Reproducibility of microbial mutagenicity assays: I. Tests with Salmonella typhimurium and Escherichia coli using a standardized protocol. Environ. Mutagen. 6 (suppl. 2), 1-251.1984 全333ug/plateで行ったが、333ug/plate までしか試験を継続していない (Dunkelの論文に關しては最高用量が333ug/plateまで)	ECMMのAmes陽性DBTは Equivocal. 陽性の報告は以下の文献。 vivo 特異的代謝物生成と考えられる D.G. Gatehouse, D.J. Paes, A Demonstration Of The In Vitro Bacterial Mutagenicity Of Procarbazine, Using The Microtitre Fluctuation Test And Large Concentrations Of 59 Fraction. Carcinogenesis, 4 (1983) 347-352. S. Parodi, S. De Flora, M. Cavanna, A. Pino, L. Robbiano, C. Benniselli, G. Brambilla, DNA-damaging activity in vivo and		Suzuki, T. et al. (1999b) Procarbazine genotoxicity in the MutaMouse; strong clastogenicity and organospecific induction of lacZ mutations. Mutat. Res., 444(2): 269-281. Pletsas, V. et al. (1997) DNA damage and mutagenesis induced by procarbazine in lambda lacZ transgenic mice: evidence that bone marrow mutations do not arise primarily through miscoding by O6-methylguanine. Carcinogenesis, 18(11): 2191-2196. Myhr, B.C. (1991) Validation studies with Muta Mouse: a transgenic mouse model for detecting mutations in vivo. Environ. Mol. Mutagen., 18(4): 308-315.	4つの論文は明確に陽性反応。肝、脾、骨髄。陽性判定
4	Uracil	66-22-8	N	全333ug/plateで行ったが、333ug/plate までしか試験を継続していない (Dunkelの論文に關しては最高用量が333ug/plateまで)			BigBlueマウス。3%のウラシル(10日間)500ppm(2-50日)まで経口的暴露。脾臓で10日目からMFの増加を觀察。5日目。変異体の増加数が少ない。脾臓(2, 5, 3日)、骨髄はMFの増加は経時的増進に基づいて考察している 変異陽性とは無関係と判断する陰性判断	

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価戦略の開発
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究

研究分担者	山田 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	室長
研究協力者	辻井 伸治	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	栗本 雅之	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	三浦 稔	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	大畑 秀雄	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	田邊 思帆里	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	主任研究官
研究協力者	小野 敦	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科		教授

研究要旨

本研究では、数万種に及ぶ既存化学物質のヒト健康リスクを効果的に評価するために、*in silico* 手法の高度化と実用化に基づいた強化戦略の構築の一環として、反復投与毒性について、カテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究を実施した。まず、カテゴリーアプローチモデルの適用範囲の拡大・高度化を図るため、国内外で公開されている反復投与毒性試験のデータを可能な限り入手し統合することで、世界最大規模のデータベースを構築した。次に、統合により得られた約 2500 物質の反復投与試験データの活用として、化学物質の影響が最初に現れることが多い血液毒性について、共通する化学構造（部分構造または官能基）を検索（抽出）し、それらに起因する毒性発現機序の情報を収集・解析することで、既存カテゴリーの同定と精緻化（＝高度化）に利用すると共に新規カテゴリー候補も見出すことができ、本件統合データベースが化学物質のヒト健康リスクの評価（予測）に有用であることを明らかにした。

A. 研究目的

WSSD2020 年目標の達成に向け、膨大な数の試験データを必要とする化学物質の安全性評価が大きな課題となっており、また、

動物愛護の観点から、動物実験の削減の流れも着実に進んでいる。このような世界の動向に対応するため、現状の *in silico* 評価技術レベルの向上、適応範囲の拡大、安全性

評価での実運用が強く求められている。

近年 OECD では、AOP（毒性発現経路）の開発が精力的に進められており、QSAR の適用が困難と考えられる複雑な毒性エンドポイントについては、AOP に基づき *in silico*、*in vitro*、*in vivo* の情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する統合的アプローチ（IATA）の活用が提案・推奨されている。従って、2020 年以降は動物実験への依存度を軽減しつつ、化学物質が発現するヒトへの毒性を高い精度で予測する *in silico* の評価技術を確立し、IATA に基づいたヒト健康リスクの評価手法を進化させる動きが加速すると考えられる。

本研究では、上記の国際動向に歩調を合わせ、新たな評価スキームの開発と実用化を目指す。本年度は、まず、化学物質の毒性情報について、網羅的かつ容易に、検索し解析することができるデータベースを構築するため、国内外で公開されている毒性試験データを、当研究機関の国内外ネットワークを活用して可能な限り入手し、世界最大規模の毒性データベースを構築する。さらに、統合したデータベースを活用して、反復毒性についてのカテゴリーアプローチを実践し、統合データベースが有用性を明らかにする。即ち、統合データベースの検索・解析で示唆される化学物質についてカテゴリーを予測し、さらにそれぞれについて代謝経路や毒性発現機序に関する情報を収集して体系的に整理することで、カテゴリーを精緻化（高度化）し未試験（又は新規）化学物質の毒性予測の新たなスキームの確立を図る。

B. 研究方法

国内外で公開されている化学物質の反復投与毒性試験データについて、信頼性の高いデータベース（HESS、COSMOS、ToxRef、RepDose、食品健康影響評価書等、総計約 2,500 物質）から毒性試験データを入手した。それぞれのデータベースから入手した情報は、それぞれの構成を調査し、データベース間で共通または類似する項目を整理し、必要に応じて修正を加え、データの検索と解析が容易な形式で、世界最大規模の反復毒性試験データベースとして統合した。

統合データベースの有用性評価（バリデーション）は、NO(A)EL の推定根拠となることが多い血液毒性を対象に、体重 1kg 当たりの 1 日摂取量が 300mg 以下で毒性所見が認められる物質を検索・収集し、共通する化学構造（部分構造または特性的な官能基）からカテゴリーを予測した後、それぞれの代謝経路や毒性機序に関する情報を別途収集して化学構造と血液毒性の因果関係を検討することで、エビデンスに基づく化学物質のカテゴリーを構築した。また、共通する化学構造を保有していても血液毒性を発現しない物質を併せて評価することでカテゴリーアプローチの適用範囲の限定等、精緻化（高度化）を試みる。

（倫理面への配慮）本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

国内外で公開されている信頼性が高い毒性試験データベースの内、（独）製品評価技術基盤機構と国衛研が構築した我が国化審法にかかる化学物質（HESS：709 物質）、欧州共同体 EU から化粧品等に使用される化学物質（COSMOS：668 物質）、米国 EPA か

らヒト・環境に影響を及ぼす化学物質 (ToxRef : 417 物質)、から欧州化学工業会 (Cefic) の委託を受け独国フラウンホーファー研究所が纏めた化学物質 (RepDose : 939 物質)、内閣府食品安全委員会の委託を受け国衛研で纏められた食品健康影響評価書の化学物質 (FCSJ : 194 物質) 等、これまでに総計約 2,500 物質の「反復毒性試験データ」を入手し、共通するデータ項目を整理すると共に、各データベースに特有のデータ項目は維持して統合データベースを構築した (表 1、図 1)。統合に際し、各データ項目の品質管理 (QC) を実施したところ、化学物質の毒性情報データベースとして最も重要な化学構造式の情報に誤記や混乱を招く記述が存在したため、統合データベースでは米国ケミカル・アブストラクト・サービス (CAS) 記載の化学構造式に統一し、立体異性体 (相対的および光学的) や位置異性体を有する化学物質については、詳細な化学構造情報を含む SMILES 表記に修正し、それぞれの CAS 登録番号ごとに毒性データを再帰属した。その結果、これまで既存毒性データベースの利用の際に生じていたと考えられる (多くの場合、データベースの利用者は認知していないかもしれない)、例えば、同じ平面構造を持つ化学物質の異性体間での毒性情報の混乱や誤解の問題を解決した。ただし、構造異性体が複数存在する化学物質であっても、既存の毒性データがどの異性体に帰属されるべきかが明らかでない場合、原典データベースの帰属に従い、CAS 登録番号ごとに毒性データを帰属した。なお、化学構造情報を修正した場合、原典データベースとの互換性 (連携) を維持するため、出典データベース名の記載と共に、必要に

応じて、平面構造に帰属された CAS 登録番号や SMILES 表記等を併記した。

毒性情報の QC については、収録情報の 80%以上 (約 52 万データポイント中約 43 万データポイント) が、我が国化審法又は厚生労働省、米国 EPA 又は NTP、OECD 推奨のテストガイドラインに従い実施されたデータであり信頼性は高いが、収録に使用している用語が原典データベースにより若干異なっている。統合データベース利用時の混乱を回避するためには用語の統一もしくは同義語索引などで作成が必要であるが、いずれの対応も未だ完了しておらず、改善課題である。

以下に、統合データベースに収録されている主な毒性情報の項目を示した。

- 試験動物 (種・性別)
- 試験物質 (純度)
- 投与量 (最大-最小値)
- 投与経路および方法
- 投与期間
- エンドポイント : LO(A)EL/NO(A)EL
- 標的臓器又は組織
- 観察所見 : 生化学パラメータ等の変化
- 試験動物の挙動等 (特記すべき場合)
- 準拠ガイドライン
- 試験報告 (公開年)

これらすべての情報は、上述した通り、完全に化学物質 (=化学構造) の情報と紐づいている (帰属されている) ため、任意の項目 (例えば、毒性発現臓器または組織等) の任意のデータ (毒性を発現する投与量等) を満足する化学物質 (化学構造) を容易に検索 (抽出) することができ、化学構造と毒性レベルや標的エンドポイントとの関係を解析する際有効に利用することができる (表 2、

図 2)。

以上の通り、統合データベースの構築により、カテゴリーアプローチに必要な化学構造(部分構造を含む)と毒性エンドポイント及びその強度や発現条件など、個別又は複合的に情報収集や解析等、一連の作業が極めて容易に実行することが可能となり、より高度なカテゴリーアプローチを実施する基盤が構築できたと考えている。

次に、統合データベースの有用性を評価(バリデーション)として、反復投与による化学物質の毒性予測のカテゴリーアプローチの高度化を検討した。

毒性エンドポイントは、化学物質のNO(A)ELの推定根拠となることが多い血液毒性(赤血球数低下、ヘモグロビン量低下、ヘマトクリット値低下、網赤血球数変動)を指標とし、体重1kg当たりの1日摂取量が300mg以下で毒性所見が認められる物質を検索し、類似(部分)構造を指標に、以下の6つの化学構造のカテゴリー候補を見出した(表3)。

1. アニリン(アシルアミン)類
2. ニトロベンゼン類
3. オキシム類
4. ヒドラジン類
5. エチレングルコールアルキルエーテル(EGA)
6. アリル-X-アリル類

これらのカテゴリー物質は、血液毒性が主要な毒性である。多くの場合、肝臓を中心に他の臓器にも毒性影響があらわれているが、血液毒性が他の毒性と比べて低用量あるいは同レベルから毒性が発現しており、血液毒性所見(赤血球数低下、ヘモグロビン量低下、ヘマトクリット値低下、網赤血球数

変動、脾臓における色素沈着)が、NO(A)ELの推定根拠となっているものが多い。一方、同一カテゴリーの化学構造を有する物質で、血液毒性を示さない物質がある。構造の違いが血液毒性に与える影響を考察しカテゴリーの領域を精緻化すること、毒性機序情報を整理して血液毒性にリンクする測定・予測可能なキーイベントを同定することが、信頼性の高いカテゴリーアプローチの適用のために重要となると考えられる。

D. 考察

統合データベースを利用した血液毒性物質の評価で見出した6つのカテゴリーについて、それぞれの毒性発現情報を収集し、以下の通り整理することができた。即ち、カテゴリーに分類したアニリン類とニトロベンゼン類の物質は共に、生体内で代謝されて生成するN-水酸化体が、血中のヘモグロビンを酸化してさらに活性酸素(過酸化水素やスーパーオキシド)を生成し、血液毒性を発現する可能性を見出している。また、アゾ化合物やアミド化合物は代謝により、アニリン類を生成し、血液毒性を発現する可能性がある。

オキシム類は、ヒドロキシルアミン類と同様に、グルタチオンパーオキシダーゼやグルタチオントランスフェラーゼを阻害することで赤血球内のグルタチオンの欠乏を引き起こし、赤血球の酸化防御機構を低下させ血液毒性を発現する機序が示唆された。また、オキシムエステルやオキシムシランなどは加水分解によりオキシム類を生成し、血液毒性を発現する可能性がある。

ヒドラジン類は、主にヘモグロビンを含む酸化還元反応系で生成する炭素ラジカル

や活性酸素類がヘモグロビンと反応しその機能を阻害することで血液毒性を発現すると考えられるが、その機序は多様で詳細は不明である(Ortiz de Montellano *et al.* (1983), Shetlar and Hill (1985))。

EGA は、機序の詳細に議論もあるが、主にエチレングリコール構造に由来する細胞膜親和性により赤血球膜に作用してその構造や機能に変化することで血液毒性の発現に寄与している可能性が示唆されている。

EGA のエステル、ジエチレングリコールアルキルエーテルは代謝により EGA を生成し、血液毒性を発現する可能性がある。

アリル-X-アリル類は、上記カテゴリーの血液毒性発現機構とは全く異なり、ヘモグロビンの4つのサブユニットで形成される中央部分の空洞内壁部分やヘム結合サイト近傍の疎水ポケット等に複数の分子が非特異的に結合することで、ヘモグロビンのアロステリーに影響を及ぼしその酸素運搬機能の一部を阻害することで血液毒性を発現する可能性を示唆する知見が報告されている(Perutz *et al.* (1986), Shibayama *et al.* (2002), Mehanna and Abraham (1990))。

次に、カテゴリーアプローチの高度化を図るため、先ず、各カテゴリーの適用範囲について検討した。

アニリン類は、表3(A)から明らかな通り、芳香環にアルキル基、アリル基、アルコキシル基、ハロゲン又は水酸基が1つ若しくは複数置換していても血液毒性を発現することがわかる。アニリン類の血液毒性を発現する強度(最低投与量)は、反復投与期間に依存するため予測は容易ではない。また、複数の異なる官能基を有する場合も、血液毒性発現するアミノ基の代謝(活性化)

が、分子内の他の官能基の代謝や物質の体外への排泄等、様々な要因と競合するため、同様にその強度の正確な予測は難しい。例えば、CAS 99-09-2 (3-nitro-aniline)は強い血液毒性を示すが、CAS 99-57-0 (3-nitro-5-hydroxy-aniline)は、恐らく水酸基由来の水溶性の増大や二次代謝(抱合)等により体外排出能が増大した結果、血液毒性を発現しないと考えられる。

ニトロベンゼン類は、(ハロ)アルキル基、アルコキシル基、(N-アルキル置換)アミノ基、ハロゲン又は水酸基が1つ若しくは複数置換していても血液毒性を発現することがわかる。血液毒性の発現強度は、アニリン類と同様、投与期間や他の官能基との競合や排泄能の影響を受け予想は困難である。したがって両カテゴリーに属する未試験物質の血液毒性を、カテゴリーアプローチによりスクリーニングレベルで評価するためには、NOAEL値が最も低いワーストケースアナログを選択し、そのキースタディの試験期間を考慮した不確実性係数を適用して、TDI値を算出するなどのプロセスが必要となると考えられる。毒性レベルをより精緻に推計する必要があるケースでは、評価対象物質の *in vivo* におけるキネティクスやダイナミクスの詳細なデータが必要になると考えられる。

オキシム類は、事例が少なくC4の鎖状アルキル基を有する物質のみであり、現状ではカテゴリーの領域の精緻化は難しい。

ヒドラジン類は、アシル置換(チオカルボニル基を含む)された誘導体は毒性試験の最大投与量でも血液パラメータに変動はない。無置換又はアルキル若しくはアリル置換ヒドラジンが、先述した作用機序で血液

毒性を発現する。

EGA 類は、単量体で最も強い血液毒性を示し、二重化により減弱する。三量体は、弱い血液毒性を示す可能性を否定しない (CAS 112-49-2: PLT↓, RBC 等は変化無し)。末端の水酸基の置換基は、分岐 (CAS 7580-85-0 : t-Bu) を許容し、C1~C4 までのアルキル基 (CAS 112-59-4 (C6) は血液毒性なし) 又はアリル基 (CAS 94-74-6) も血液毒性を示す。一方、他端の水酸基は、カルボン酸に酸化されることが必須で、当該部分が 2 級水酸基であるプロピレングリコール誘導体は、血液毒性を示さない (CAS 108-65-6、CAS 29911-28-2)。また、EGA 類の血液毒性発現機序として赤血球膜への親和性に由来する膜機能の障害が示唆されているが、鎖長の短い EGA 類がより強い毒性を示すことから、その他の機序の存在も示唆していると考えられる。

アリル-X-アリル類は、表 3 (B) に示す物質が含まれるが、これらの他にも多数の類似物質が存在する。また、その作用機序が他の血液毒性物質とは異なり、非特異的に複数ヘモグロビンに結合することでアロステリーに影響を与え酸素運搬能の一部を障害することで血液毒性を発現することが、高脂血症治療剤として開発されたベザフィブラート等が、ヘモグロビンと結合することや臨床上の副作用として貧血が起こすことから示唆されている (KEGG DRUG Database)。本カテゴリーの物質は、構造や置換基の変化でヘモグロビンへの結合部位が異なることが知られており、適用範囲を明確に規定することは困難であるが、アリル-X-アリルの部分構造を有する物質が血液毒性を発現する可能性を予測することに

利用できると考えている。

続いて、カテゴリーアプローチの更なる高度化を図るため、同じカテゴリーに属する化学構造で血液毒性を発現しない化学物質について、個々に、統合データベースの毒性情報や、必要に応じて、統合前のデータベースの毒性情報 (毒性試験報告書が入手可能な場合は、それを含む) 等、詳細に検討した。結果は、弱い血液毒性は有するものの検索条件外であったことが主な原因であったが、稀に毒性データの未記載や不十分な記述が認められた。また、誤記も少数存在することが判明した。更に、検索そのものや結果を混乱させる一つの要因として、同じ毒性情報でも、統合に利用したデータベースにより、使用している用語や記載方法が異なる場合があることが判明した。

以上のことから、信頼性の高いカテゴリーアプローチの適用のためには、精緻化したカテゴリー領域を OECD QSAR Toolbox や HESS などのカテゴリーアプローチ支援ツールのカテゴリープロファイラーに実装するとともに、解析結果を知識ベースとして整備する必要がある。さらに、今後統合データベースを有効に活用するためには収載した毒性情報の整備を再度実施し、統合データベースの更なる品質の向上が必要である。

E. 結論

国内外で信頼性が確立された化学物質の毒性情報を入手・統合することで、世界最大規模の統合データベースを構築した。

また、統合データベースの有用性評価として、反復毒性情報を使用したカテゴリーアプローチを実践し、予想したカテゴリー

物質の代謝経路や毒性発現機序等の情報を収集して体系的に整理することにより、カテゴリーの適用範囲を明確にし、カテゴリーアプローチの高度化(精緻化)を行った。

以上、統合データベースの構築とカテゴリーアプローチの高度化の実践により、将来的に、化学物質のヒト健康に与える影響の予測の新たなスキームの基盤を構築した。但し、統合データベースには修正が必要な課題があることも判明した。

F. 参考文献

1. KEGG DRUG Database, https://www.kegg.jp/dbget-bin/www_bget?dr_ja:D01366
2. Mehanna A.S. and D.J. Abraham, Comparison of crystal and solution hemoglobin binding of selected antigelling agents and allosteric modifiers. *Biochemistry*, 1990, **29**,3944-52.
3. Ortiz de Montellano P.R., O. Augusto, F.Viola and K.L.Kunze , Carbon radicals in the metabolism of alkyl hydrazines. *J Biol Chem.*, 1983, **258**, 8623-9.
4. Perutz M.f., G. Fermi, D.J. Abraham, C. Poyart and E. Bursaux, Hemoglobin as a receptor of drugs and peptides: x-ray studies of the stereochemistry of binding. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 1064-1078.
5. Shetlar M.D. and H.A. Hill, Reactions of hemoglobin with phenylhydrazine: a review of selected aspects. *Environ Health Perspect.*, 1985, **64**, 265-81.
6. Shibayama N, S. Miura, J.R. Tame, T. Yonetani and S.Y. Park, Crystal structure of horse carbonmonoxyhemoglobin-

bezafibrate complex at 1.55-Å resolution. A novel allosteric binding site in R-state hemoglobin. *J Biol Chem.*, 2002, **277**, 38791-6.

G. 研究発表

誌上発表

1. 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-methylbicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2018, **5**, 1-11.
2. Yamada T, Tanaka Y, Hasegawa R, Igarashi T, Hirose A. Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2018, **5**, 75-82.
3. Igarashi T, Serizawa H, Kobayashi K, Suzuki H, Matsumoto M, Iso T, Kawamura T, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial hazard assessment of 4-benzylphenol, a structural analog of bisphenol F: Genotoxicity tests *in vitro* and a 28-day repeated-dose toxicity study in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2018, **96**, 64-75.
4. 山田 隆志. OECDにおけるQSAR、AOPの開発状況. 皮膚の安全性・有用性評価法. 技術情報協会. 2018, **4-3**, 151-157.
5. Chesnut M, Yamada T, Adams T, Knight D, Kleinstreuer N, Kass G, Luechtefeld T, Hartung T. Regulatory acceptance of read-across. *ALTEX*. 2018, **35**, 413-419.
6. Igarashi T, Takashima H, Takabe M, Suzuki H, Ushida K, Kawamura T, Matsumoto M, Iso T, Tanabe S, Inoue K, Ono A, Yamada

- T, Hirose A. Initial hazard assessment of benzyl salicylate: *In vitro* genotoxicity test and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2018, **100**, 105-117.
7. Petkov PI, Schultz TW, Honma M, Yamada T, Kaloyanova E, Mekenya OG. Validation of the performance of TIMES genotoxicity models with EFSA pesticide data. *Mutagenesis.* 2019, **34**, 83-90.
 8. Yamada T, Matsumoto M, Miura M, Hirose A. Case study on the use of integrated approaches to testing and assessment for testicular toxicity of ethylene glycol methyl ether (EGME)-related chemicals. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), *in press*, 2019.
- 学会発表
1. Evaluation of QSAR models for daphnia and fish chronic toxicities of human pharmaceuticals. Yamada, T., Kurimoto, M., Shiraishi, H., Yamamoto, H., Tatarazako, N., Nishimura, T., Hirose, A. *SETAC Europe 28th Annual Meeting* (May 2018 Rome, Italy)
 2. Validation of the *in silico* prediction tool for toxicity of Algae by pharmaceuticals in environment. Hirose, A., Kurimoto, M., Shiraishi, H., Yamamoto, H., Tatarazako, N., Nishimura, Yamada, T., *SETAC Europe 28th Annual Meeting* (May 2018 Rome, Italy)
 3. 毒性関連大規模データベースの利用とリードアクロスによる安全性評価, 山田隆志, 第 45 回日本毒性学会学術大会 (2018 年 7 月大阪)
 4. Adverse Outcome Pathway(AOP)の構築～ヒストン脱アセチル化酵素阻害による精巣毒性に関する AOP を例に～, 田邊思帆里, 広瀬明彦, 山田隆志, 第 45 回日本毒性学会学術大会 (2018 年 7 月大阪)
 5. サリチル酸ベンジルの遺伝毒性、反復投与毒性及び生殖発生毒性のスクリーニング, 五十嵐智女, 高部道仁, 高島宏昌, 鈴木洋, 牛田和夫, 松本真理子, 磯貴子, 川村智子, 井上薫, 小野敦, 山田隆志, 広瀬明彦, 第 45 回日本毒性学会学術大会 (2018 年 7 月大阪)
 6. アセナフチレンのヒト健康影響に係る安全性試験結果: 28 日間反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験, 松本真理子, 田邊思帆里, 芹沢英樹, 高部道仁, 川村智子, 五十嵐智女, 磯貴子, 井上薫, 山田隆志, 広瀬明彦, 第 45 回日本毒性学会学術大会 (2018 年 7 月大阪)
 7. Category assessment of repeated-dose hepatotoxicity of phenolic benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016. Yamada, T., Matsumoto, M., Kitajima, S. Aisaki, K., Kanno, J., Hirose, A., *EUROTOX 2018* (September 2018 Brussels)
 8. Updates and overview of derivation of subacute guidance values for contaminants in drinking water in Japan, Matsumoto, M., Kawamura, T., Inoue, K., Yamada, T., Kobayashi, N. Hirose, A. *EUROTOX 2018* (September 2018 Brussels)
 9. 非発がんエンドポイントの TTC アプローチを改良するための新しいデータベース

- ースの開発, 山田隆志, 栗本雅之, 広瀬明彦, Chihae Yang, James F Rathman, 日本動物実験代替法学会第 31 回大会 (2018 年 11 月熊本)
10. 分子キーイベントのインビトロ試験データを用いた肝毒性予測モデルの開発, 城島光司, 山田隆志, 広瀬明彦, 日本動物実験代替法学会第 31 回大会 (2018 年 11 月熊本)
 11. インビトロ試験データを用いた分子レベルのイベントによる肝毒性予測, 城島光司, 山田隆志, 広瀬明彦, 第46回構造活性相関シンポジウム (2018 年 12 月大阪)
 12. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across assessment. Yamada, T., Kurimoto, M., Miura, M., Kawamura, T., Jojima, K., Taira, N., Ohata, H., Tsujii, S., Ohno, A., Hirose, A, *58th Annual Meeting of Society of Toxicology* (March 2019, Baltimore, USA)
 13. AOP (Adverse Outcome Pathway; 有害性発現経路) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ, 山田隆志, 足利太可雄, 小島肇, 広瀬明彦, 日本薬学会第 139 年会 (2019 年 3 月千葉)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表2 反復投与毒性データベースの活用：化審法有害性クラス2・
クラス外相当物質をソートした例

CAS No.	化学物質名	NO(A)EL	試験期間	補正值	D値	有害性クラス
104653-34-1	difethialone	<0.002 mg/kg/day	90 day	2	<0.000001	クラス2相当
21725-46-2	cyanazine;propanenitrile, 2-[[<0.005 mg/kg/day	91 day	2	<0.0000025	クラス2相当
58-89-9	lindane	<0.01 mg/kg/day	90 day	2	<0.000005	クラス2相当
7786-34-7	mevinphos	<0.011 mg/kg/day	90 day	2	<0.0000055	クラス2相当
50-28-2	17beta-estradiol	0.003 mg/kg/day	90 day	2	0.000015	クラス2相当
51-52-5	6-n-propyl-2-thiouracil;propy	0.01 mg/kg/day	28 day	6	1.66667E-05	クラス2相当
57-63-6	ethynlestradiol;ethynyl estrad	0.01 mg/kg/day	28 day	6	1.66667E-05	クラス2相当
96182-53-5	tebupirimfos	<0.2 mg/kg/day	86 day	6	<0.0000333333333333	クラス2相当
98886-44-3	fosthiazate	<0.08 mg/kg/day	91 day	2	<0.00004	クラス2相当
98-07-7	benzotrifluoride;trichloromet	0.025 mg/kg/day	28 day	6	4.16667E-05	クラス2相当
5598-13-0	chlorpyrifos-methyl;chlorpyrif	<0.1 mg/kg/day	91 day	2	<0.00005	クラス2相当
298-00-0	methyl parathion	<0.12 mg/kg/day	90 day	2	<0.00006	クラス2相当
13194-48-4	ethoprophos	0.015 mg/kg/day	90 day	2	0.000075	クラス2相当
36437-37-3	2-(2h-benzotriazol-2-yl)-4-(t	<0.5 mg/kg/day	42 day	6	<0.0000833333333333	クラス2相当
333-41-5	diazinon;phosphorothioic acid	0.018 mg/kg/day	90 day	2	0.00009	クラス2相当
117-81-7	di(2-ethylhexyl) phthalate;ph	<0.25 mg/kg/day	91 day	2	<0.000125	クラス2相当
173584-44-6	indoxacarb	<0.25 mg/kg/day	90 day	2	<0.000125	クラス2相当
69409-94-5	fluvalinate	<0.3 mg/kg/day	91 day	2	<0.00015	クラス2相当
95465-99-9	cadusafos	0.031 mg/kg/day	90 day	2	0.000155	クラス2相当
2058-94-8	perfluoroundecanoic acid;her	0.1 mg/kg/day	42 day	6	0.000166667	クラス2相当
112-60-7	tetraethylene glycol;ethanol, 2	2000 mg/kg/day	33 day	6	3.33333333333	クラス外
6373-74-6	c.i. acid orange 3	750 mg/kg/day	91 day	2	3.75	クラス外
107-43-7	betaine;methanaminium, 1-ca	769 mg/kg/day	90 day	2	3.845	クラス外
81334-34-1	imazapyr	816 mg/kg/day	90 day	2	4.08	クラス外
208465-21-8	mesosulfuron-methyl	977 mg/kg/day	91 day	2	4.885	クラス外
79-01-6	trichloroethylene;1,1,2-trichlo	1000 mg/kg/day	91 day	2	5	クラス外
1854-26-8	4,5-dihydroxy-1,3-bis(hydroxy	1000 mg/kg/day	90 day	2	5	クラス外
152019-73-3	metolachlor oxanilic acid (oa)	1020 mg/kg/day	90 day	2	5.1	クラス外
111-27-3	1-hexanol;hexyl alcohol	1130 mg/kg/day	90 day	2	5.65	クラス外
71203-19-5	ethanaminium, 2-hydroxy-n,n	1170 mg/kg/day	91 day	2	5.85	クラス外
100-21-0	terephthalic acid	1180 mg/kg/day	90 day	2	5.9	クラス外
7177-48-2	ampicillin trihydrate	1500 mg/kg/day	91 day	2	7.5	クラス外
90-43-7	2-phenylphenol;1,1'-biphenyl	1550 mg/kg/day	90 day	2	7.75	クラス外
114311-32-9	imazamox	1660 mg/kg/day	91 day	2	8.3	クラス外
104098-48-8	imazapic	1730 mg/kg/day	91 day	2	8.65	クラス外
93-92-5	benzenemethanol, alpha-met	2000 mg/kg/day	91 day	2	10	クラス外
42609-52-9	dymron;daimuron	3120 mg/kg/day	90 day	2	15.6	クラス外
9005-65-6	polysorbate 80	3850 mg/kg/day	91-94 day	2	19.25	クラス外
27882-76-4	chromium picolinate monohydr	4240 mg/kg/day	91 day	2	21.2	クラス外
13718-94-0	6-o-(alpha-D-glucopyranosyl)-d-	7690 mg/kg/day	90 day	2	38.45	クラス外

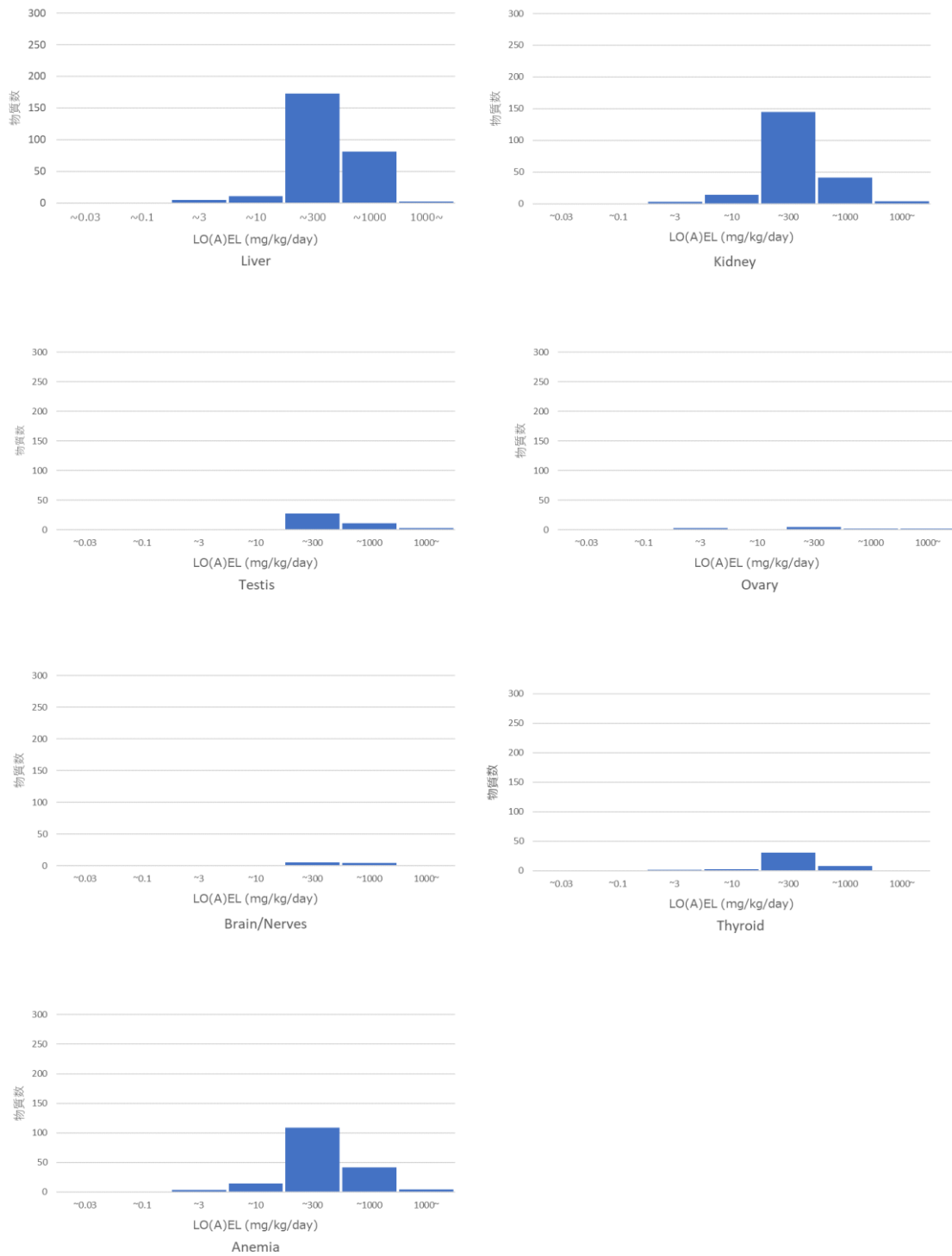
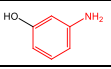

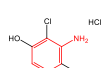
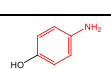
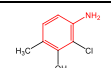
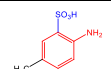
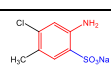
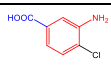
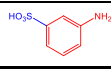
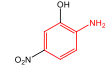
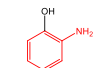
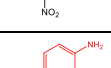
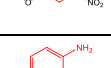


図2 反復投与毒性データベースの活用：亜急性試験を対象とした標的器官ごとに影響を及ぼす化学物質のLO(A)ELと物質数

表3 (A) アニリンカテゴリー

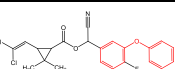
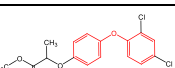
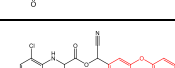
CAS	Structure	Study duration	Blood	Heart	Brain	Spinal Cord	Lung	Skeletal muscle	Adrenal	Mammary gland	Thyroid	Pituitary	Pancreas	Large Intestine (Cecum/Colon)	Liver	Salivary gland	Small Intestine (Duodenum)	Stomach	Bone marrow	Lymph node	Spleen	Thymus	Epididymis	Prostate	Seminal vesicle	Testis	Ovary	Uterus	Kidney	Urinary bladder
20265-96-7		91 d	Red												Red				Red	Red									Red	
103-69-5		28 d	Red												Red				Red	Red									Red	
95-51-2		93d (5d/w)	Red												Yellow				Yellow	Yellow									Yellow	
108-42-9		93 d	Red												Yellow				Yellow	Red									Red	
156-43-4		28 d	Yellow												Yellow				Yellow	Yellow										
578-54-1		42 d	Yellow												Red				Yellow	Red										
536-90-3		50 d	Yellow												Yellow				Yellow	Red									Yellow	
99-88-7		48 d	Red												Yellow				Red	Red										
122-42-9		90 d	Yellow												Yellow				Yellow	Yellow										
90-41-5		28 d	Yellow												Yellow				Yellow	Yellow									Yellow	
108-44-1		42 d	Yellow												Yellow				Yellow	Red									Yellow	
14861-17-7		28 d	Yellow												Yellow				Yellow	Red									Yellow	
95-64-7		28 d	Yellow												Yellow				Yellow	Yellow										
87-62-7		42 d	Yellow												Yellow				Yellow	Yellow										
95-78-3		28 d	Yellow												Yellow				Yellow	Yellow										
2185-92-4		91-92 d													Green				Green	Yellow						Yellow			Yellow	
99-09-2		28 d	Red												Red				Red	Red			Yellow					Red		
89-63-4		42 d	Yellow												Yellow				Yellow	Yellow										
97-52-9		28 d	Yellow												Yellow				Yellow	Yellow										

Red : LOEL ≦ 30 , Yellow : 30 < LOEL ≦ 100 , Light Yellow : 100 < LOEL ≦ 300 , Green : 300 < LOEL (mg/kgbw/day)

CAS	Structure	Study duration	Blood	Heart	Brain	Spinal Cord	Lung	Skeletal muscle	Sciatic nerve	Adrenal	Mammary gland	Thyroid	Pituitary	Pancreas	Large intestine (Cecum/Colon)	Liver	Salivary gland	Small intestine (Duodenum)	Stomach	Bone marrow	Lymph node	Spleen	Thymus	Epididymis	Prostate	Seminal vesicle	Testis	Ovary	Uterus	Kidney	Urinary bladder
591-27-5		91 d	Yellow																			Yellow									
95-85-2		91 d	Yellow													Green			Green			Yellow									Green
61693-43-4		90 d	Green							Yellow						Yellow															Yellow
123-30-8		28 d	Green																			Yellow									Yellow
84540-50-1		90 d						Green								Yellow			Green												
88-44-8		28 d																Green													
6627-59-4		42 d																													
2840-28-0		42 d																			Green										
121-47-1		28 d																													
121-88-0		91 d														Green															
99-57-0		91 d																			Green										Green
96-96-8		42 d														Yellow					Green										
88-74-4		63 d																													

Red : LOEL ≤ 30 , Yellow : 30 < LOEL ≤ 100 , Light Yellow : 100 < LOEL ≤ 300 , Green : 300 < LOEL (mg/kgbw/day)

表 3 (B) アリル-X-アリルカテゴリー

CAS	Structure	Study duration	Blood	Heart	Brain	Lung	Skeletal muscle	Sciatic nerve	Adrenal	Mammary gland	Thyroid	Pituitary	Pancreas	Large intestine (Cecum/Colon)	Liver	Salivary gland	Small intestine (Duodenum)	Stomach	Bone marrow	Lymph node	Spleen	Thymus	Epididymis	Prostate	Seminal vesicle	Testis	Ovary	Uterus	Kidney	Urinary bladder	
68359-37-5		91d	Red												Red																
51338-27-3		91d	Red												Red																
102851-06-9		90d	Red												Red																

Red : LOEL ≤ 30 , Yellow : 30 < LOEL ≤ 100 , Light Yellow : 100 < LOEL ≤ 300 , Green : 300 < LOEL (mg/kgbw/day)

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価戦略の開発
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

反復投与毒性の AOP キーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究

研究分担者	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	部長
研究協力者	山田 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	室長
研究協力者	城島 光司	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究生
研究協力者	田邊 思帆里	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	主任研究官
研究協力者	五十嵐 智女	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究助手
研究協力者	鈴木 洋	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	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

研究要旨

H30 年度は、化学物質の主要な標的臓器である肝臓に対して、従来の化学構造情報のみを基にした肝毒性構造アラート作成に代わる新たなアプローチとして、AOP の一部である分子開始キーイベント（MIE）情報に基づいた *in vitro* 試験データを用いた肝毒性予測モデルの作成を試みた。MIE 情報を検索するための化学物質の *in vivo* データソースとしては HESS と Open TG-GATEs の反復投与毒性試験情報を用い、外部検証として ToxRefDB の反復投与毒性試験情報を適用した。一方、PubChem BioAssay より肝毒性と関連性のある MIE として 47 の *in vitro* 試験データを収集した。予測対象物質そのもの（Model A）あるいは類似化合物（Model B）が、それぞれの *in vitro* 試験データに含まれていた場合に、そのインビト試験の結果（Active or Inactive）を肝毒性の陽性と陰性を判定する 2 種類の予測モデルを作成した。予測モデルは、既存の知識ベース毒性予測モデル Derek Nexus と比較して幅広いケミカルスペースをカバーしており、高い予測性能を有していることが示された。また、Model B は、最適な類似度の設定を模索することで、より幅広いケミカルスペースを対象とすることでより感度の高い予測性能の高いモデルに発展していくことが期待できた。一方で、本モデルでカバー出来ていない毒性機序の存在や、*in vivo* における ADME の影響を考慮することにより、予測性能をさらに向上させることができることも示された。

A. 研究目的

近年の化学物質の規制に関わる国際的な関心は、化学物質の安全性評価において動物実験を用いた試験だけに頼ることなく、化学物質曝露による有害作用を同定し評価するための評価ストラテジーを確立することであり、その中において構造活性相関(QSAR)やカテゴリーアプローチなどの *in silico* 手法を用いたコンピュータトキシコロジーは重要な位置づけでもあり、発展の望まれる研究分野である。本研究では、反復投与毒性の毒性予測モデル開発の一環として、肝毒性に焦点を当ててきたが、従前の構造情報と毒性情報との相関性を基にした肝毒性アラートを作成してきた手法に代えて、肝毒性エンドポイントに関連する **key event** 情報を収集し、毒性試験結果で得られた肝毒性物質の毒性プロファイルと組み合わせることによる新たなアプローチを用いた肝毒性の予測モデルの作成を行うことを目的とする。

B. 研究方法

B-1. *In vivo* データの収集

肝毒性予測モデル構築のためのMIE情報を検索するための化学構造を持つ化学物質の *in vivo* データと、外部検証に用いるための *in vivo* データを収集した。MIE 検索用データは内部検証としても用いた。MIE 検索用データは、HESS (Hazard Evaluation Support System)と医薬基盤・健康・栄養研究所が提供する Open TG-GATEs (Toxicogenomics Project-Genomics Assisted Toxicity Evaluation System)の反復投与毒性試験情報(HESS：約700試験、Open TG-GATEs：約150試験)から収集した。肝臓の臓器重量変化および病理組織学的変化の所見における LOEL(最小

影響量) Liver が 50 mg/kg/day 以下の被験物質を肝毒性陽性物質とし、LOEL Liver 1000 mg/kg/day 以上の物質を肝毒性陰性物質とし、陽性物質：170物質、陰性物質：173物質を収集した。外部検証用データセットとしては US EPA が提供する ToxRefDB (Toxicity Reference Database)に収載された反復投与毒性試験(約500試験)の情報から、上記の基準に従い肝毒性陽性物質：128物質、陰性物質：72物質を収集した。

B-2. MIE 情報の収集

肝毒性と関連すると思われる分子キーイベント (MIE) を測定した *in vitro* 試験のデータを PubChem BioAssay から収集した。収集基準は次の(1)~(4)の条件を満たすものとした。

- (1) 標的タンパクが明示されていること
- (2) 試験されている物質数が100以上
- (3) 試験結果のうち陽性(Active)の物質数が4以上である
- (4) 試験結果のうち、肝毒性陽性物質数の割合が0.7以上であること。

さらに収集した *in vitro* 試験データの中から、肝毒性と関連性のあるタンパク質の絞り込みを行うため、QIAGEN 社が提供する遺伝子パスウェイ解析ソフトウェアの IPA (Ingenuity Pathway Analysis)から肝毒性に関する ToxList に記載されている MIE 情報で絞り込みを行った。その結果、肝毒性と関連性のある MIE として47の *in vitro* 試験データを収集した。核内受容体および芳香族炭化水素受容体のシグナル攪乱に関する試験は24試験、CYPの阻害試験は12試験、その他各種シグナル活性化や阻害を測定した試験11試験から各種物質の *in vitro* 試験データを収集した。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C-1. 予測モデルの構築

収集した 47 の *in vitro* 試験データを用いて肝毒性予測モデルを構築した。予測のプロセスの原則としては、クエリー (予測対象) 物質についてそれぞれの *in vitro* 試験データに含まれていた場合にその試験結果 (Active or Inactive) をそれぞれ陽性/陰性の判定とした。この予測方法は、収集した *in vitro* 試験で測定されている分子キーイベントが引き起されると肝毒性発現につながるであろうという仮説から設定している。しかし、全てのクエリー物質に *in vitro* 試験データが存在するとは限らないので、予測手法として、2 つのモデル (Model A および Model B) を構築した。

Model A: この Model では、クエリー物質の構造と一致する *in vitro* 被験物質の試験結果を採用する。構造の一致する被験物質が存在しない *in vitro* 試験については、試験結果の採用は行わない。

Model B: この Model では、Model A の判定に使用できた物質に加えて、類似する被験物質の試験結果も採用する。類似物質としては、クエリー物質と分子類似度の最も高い被験物質の試験結果を採用する。しかし、被験物質の分子類似度が予め設定した閾値を超えていない場合は試験結果の採用を行わないことにした。分子類似度の算出には比較する物質同士の Morgan Fingerprint (Feature Definition、半径 3、2048 ビット) から Dice 係数を用いて算出した。

モデルの構築はプログラミング言語であ

る Python (version 2.7.12) を用い、構造情報の InChIKey や Morgan Fingerprint の生成、および Dice 係数の計算にはオープンソースのケモインフォマティクスソフトウェアである RDKit を使用した。

C-2. 予測モデルの検証

作成した Model A および Model B の予測性能を検証として、内部検証用には HESS-TGP データセットを、外部検証用には ToxRefDB データセットを用いた。比較対象の毒性予測モデルとして、Lhasa 社が提供する知識ベース毒性予測モデルの Derek Nexus を用いた。Derek Nexus の予測の条件としては、肝毒性アラートの Level of Likelihood (毒性発現の確からしさ) を Equivocal (7 段階の真ん中) 以上に設定した。また、Model A と Derek Nexus のどちらか一方でも陽性と予測した時の予測性能も検証した (Model A + Derek)。

HESS-TGP データセットを用いて内部検証の結果、各モデルのクロス集計表と、肝毒性予測性能は以下のとおりであった。

Model A のクロス集計表

		予測 (Model A)	
		陽性	陰性
<i>in vivo</i> 肝毒性	陽性	84	86
	陰性	27	146

Model B のクロス集計表

		予測 (Model B)	
		陽性	陰性
<i>in vivo</i> 肝毒性	陽性	88	82
	陰性	37	136

HESS-TGP データセットに対する肝毒性予測性能

	Model A	Model B	Derek	Model A + Derek
感度	0.49	0.52	0.44	0.72
特異度	0.84	0.79	0.82	0.69
陽性的中率	0.76	0.70	0.72	0.70
F 値	0.60	0.60	0.55	0.71
正確度	0.67	0.65	0.63	0.71

感度は Model A で 0.49 であった。Model B では Model A よりも真陽性が 4 物質増えたために、感度は上昇し、0.52 であった。特異度は Model A で 0.84 となった。Model B では、偽陽性が Model A よりも 10 物質増加したため、特異度は 0.79 に減少した。そのほか陽性的中率、F 値、正確度については Model B が Model A を下回った。Derek Nexus との比較では、Model A, Model B とともに Derek Nexus より高い感度となった。Model A では全ての評価指標で Derek Nexus よりも高い数値が得られた。Model A + Derek ではそれぞれのモデルと比べて特異度が低下したが、感度が 0.7 を超え、F 値と正確度で最も高い数値となった。

肝毒性予測に寄与した *in vitro* 試験データを解析するために、Model A についての *in vitro* 試験データごとに F 値を計算した結果、最も高い F 値が得られた *in vitro* 試験データは甲状腺ホルモン受容体(Thrb)シグナルの抑制に関する試験データで、次いでアンドロゲン受容体(AR)のアンタゴニスト試験と CYP2C9 の阻害試験のデータとなった。F 値の高い上位 10 データの各々の感度は低いが、陽性適中率はどれも 0.75 以上と高いものであった。

ToxRefDB データセットを用いての外部

検証の結果、各モデルのクロス集計表と、肝毒性予測性能は以下のとおりであった。

Model A のクロス集計表

		予測 (Model A)	
		陽性	陰性
<i>in vivo</i> 肝毒性	陽性	88	40
	陰性	19	53

Model B のクロス集計表

		予測 (Model B)	
		陽性	陰性
<i>in vivo</i> 肝毒性	陽性	95	33
	陰性	20	52

HESS-TGP データセットに対する肝毒性予測性能

	Model A	Model B	Derek	Model A + Derek
感度	0.69	0.74	0.43	0.81
特異度	0.74	0.72	0.78	0.61
陽性的中率	0.82	0.83	0.78	0.79
F 値	0.75	0.78	0.55	0.80
正確度	0.71	0.74	0.55	0.74

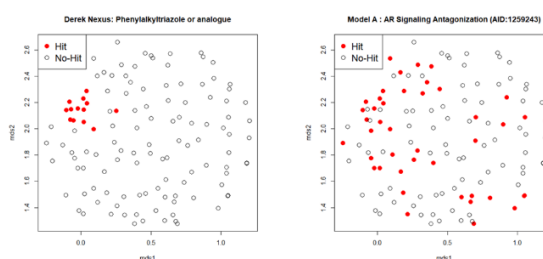
Model A は感度が 0.69、特異度が 0.74 となり、HESS-TGP データセットを用いた時より感度が高くなった一方で特異度が減少した。また Model B では Model A と比較して特異度の減少に対する感度の上昇が大きく、陽性的中率、F 値、正確度のいずれにおいても Model A を上回った。Model A, Model B とともに Derek Nexus と比較して特異度は下回った。一方で Derek Nexus の感度は 0.5 以下であったことに対して、Model A および Model B は 0.7 前後の感度が得られた。肝毒性予測に寄与した *in vitro* 試験データを

解析するために、Model A についての *in vitro* 試験データごとに F 値を計算した結果、HESS-TGP データセットと同じくアンドロゲン受容体(AR)と甲状腺ホルモン受容体(Thrb)のアンタゴニストを測定した試験データが上位2位の高いF値を示した。一方、HESS-TGP データセットで上位を占めていた CYP の阻害に関する試験に代わって、エストロゲン受容体(ER)や CAR などの核内受容体のシグナル攪乱に関する試験のデータが上位に入った。F 値の高い上位 10 データの各々の感度は低い、陽性適中率はどれも 0.83 以上と HESS-TGP データセットの場合よりも高いものであった。

D. 考察

本研究で作成した Model A の予測性能については、内部検証用の HESS-TGP データセットに対する全ての評価指標(感度、特異度、陽性的中率、F 値、正確度)と外部検証用の ToxRefDB データセットに対する特異度以外の評価指標は Derek Nexus を上回った。このことから、本研究で用意したデータセットに対して、Model A は Derek Nexus よりも高い予測性能を有していることが明らかになった。Derek Nexus の構造アラートによるアプローチと比べて、Model A によってカバーされる肝毒性陽性物質のケミカルスペースが幅広いことが要因の一つであると考えられた。例えば、ToxRefDB データセットの肝毒性陽性物質に対して最も多くヒットした Derek Nexus のアラートは「Phenylalkyltriazole or analogue」であるが、肝毒性陽性物質全体のケミカルスペースの中でカバーしている範囲は狭い。これに対して Model A で最もヒットしたアンドロゲ

ン受容体(AR)アンタゴニスト試験(AID:1259243)では、広いケミカルスペースをカバーしているため、*in vitro* 試験データを利用した Model A が Derek Nexus より高い予測性能を示したと推測される。



Derek Nexus (左) と Model A (右) がカバーするケミカルスペースの例 (ToxRefDB データセットの肝毒性陽性物質について分子類似度を用いて距離行列を作成し、多次元尺度構成法で 2 次元に配置した。)

一方、収集された *in vitro* 試験データの多くは内部検証だけでなく、外部検証用の ToxRefDB データセットにおいても高い陽性的中率を有しており、これらが測定の対象としている分子キーイベントは何等かの形で肝毒性に寄与していると考えられる。例えば、肝毒性予測に対して高い F 値を達成した核内受容体のシグナル攪乱に関する化学物質については、肝臓における様々な内在性代謝への影響や、細胞の肥大・増殖などとの関連性を示唆する研究報告が知られているほか、CYP 阻害の肝毒性影響に対する機序的な関連性についてはよく解明されていないが、一部は化学物質が CYP 分子種の阻害剤として作用することにより、肝臓における内在性リガンドの代謝を抑制する可能性、あるいは化学物質が CYP 分子種の基質として作用して反応性代謝物が生成し、生体高分子に作用することにより細胞スト

レスや機能障害を引き起こす可能性などが報告されている。

一方、知識ベースの Derek Nexus より感度は上がったとは言え、未だ相当数の偽陰性物質が存在する。これは、未だ肝毒性に関する MIE 情報が不足していることを示すものであるが、それだけではない。HESS-TGP データセットにおいて Model A で偽陰性となり Derek Nexus で真陽性となった物質について Derek Nexus のアラート数を解析すると「Aromatic nitro compound」「Halobenzene」「Halogenated hydrocarbon」に 6 物質が含まれていた。このうち、「Halobenzene」と「Halogenated hydrocarbon」については、ハロゲン化物の多くは CYP2E1 による代謝活性化が毒性発現に関与していると考えられているが、本研究で収集した *in vitro* 試験データの中に CYP2E1 に関する試験は含まれていなかった。「Aromatic nitro compound」も Derek Nexus によると毒性発現に代謝が関与しているとされている。同様に ToxRefDB データセットに対する Model A の偽陰性物質については「Phenoxyacetic acid or derivative」のアラートが多く、このアラートも代謝活性化が毒性発現に関与しているとされている。この様に Model A で偽陰性となる物質の特徴の 1 つに代謝活性化の関与が考えられた。

一方、本研究で作成した肝毒性予測モデルの予測性能を下げる偽陽性の要因として、ADME の影響が考えられ、その 1 つに、経口アベイラビリティの影響が挙げられる。経口バイオアベイラビリティに影響する化学記述子として TPSA (Topological Polar Surface Area) と RBC (Rotatable Bond Count) が提案されており、RBC > 10 または TPSA

> 140 で経口アベイラビリティが低くなることが示されている。HESS-TGP データセットの解析では、RBC > 10 または TPSA > 140 である物質の多くは肝毒性陰性であり、これらの記述子等を用いて経口バイオアベイラビリティが低い物質をあらかじめ予測することにより、予測性能を向上させることができる可能性がある。また、排泄の影響も考えられた。HESS-TGP データセットおよび ToxRefDB データセットでスルホ基を持つ物質は全部で 22 物質あり、その内 21 物質が肝毒性陰性であったが、Model A に偽陽性となった物質が 5 物質含まれていた。スルホ基を持つ物質は、硫酸抱合反応などで速やかに体内から排泄され、肝毒性影響が軽減されると考えられる。この様な ADME を考慮することにより偽陽性を減らすことができる可能性が示された。

E. 結論

H30 年度は、化学物質の主要な標的臓器である肝臓に対して、従来の化学構造情報のみを基にした肝毒性構造アラート作成に代わる新たなアプローチとして、AOP の一部である分子キーイベント (MIE) 情報に基づいた *in vitro* 試験データを用いた肝毒性予測モデルの作成を試みた。MIE 情報を検索するための化学物質の *in vivo* データソースとしては HESS と Open TG-GATEs の反復投与毒性試験情報を用い、外部検証として ToxRefDB の反復投与毒性試験情報を適用した。一方、PubChem BioAssay より肝毒性と関連性のある MIE として 47 の *in vitro* 試験データを収集した。予測対象物質そのもの (Model A) あるいは類似化合物 (Model B) が、それぞれの *in vitro* 試験データに含

まれていた場合に、その *in vitro* 試験の結果 (Active or Inactive) を肝毒性の陽性と陰性を判定する 2 種類の予測モデルを作成した。予測モデルは、既存の知識ベース毒性予測モデル Derek Nexus と比較して幅広いケミカルスペースをカバーしており、高い予測性能を有していることが示された。また、Model B は、最適な類似度の設定を模索することで、より幅広いケミカルスペースを対象とすることでより感度の高い予測性能の高いモデルに発展していくことが期待できた。一方で、本モデルでカバー出来ていない毒性機序の存在や、*in vivo* における ADME の影響を考慮することにより、予測性能をさらに向上させることができることも示された。

F. 研究発表

誌上発表

1. Igarashi T, Serizawa H, Kobayashi K, Suzuki H, Matsumoto M, Iso T, Kawamura T, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial hazard assessment of 4-benzylphenol, a structural analog of bisphenol F: Genotoxicity tests *in vitro* and a 28-day repeated-dose toxicity study in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **96**, 64-75, 2018.
2. Igarashi, T., Takashima, H., Takabe, M., Suzuki, H., Ushida, K., Kawamura, T., Matsumoto, M. Iso T, Tanabe S, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A. Initial hazard assessment of benzyl salicylate: *In vitro* genotoxicity test and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats. *Regul.*

Toxicol. Pharmacol., **100**, 105-117, 2018.

3. Kohara A, Matsumoto M, Hirose A, Hayashi M, Honma M, Suzuki T. Mutagenic properties of dimethylaniline isomers in mice as evaluated by comet, micronucleus and transgenic mutation assays. *Genes Environ.* 2018 Aug 22; **40**:18. doi: 10.1186/s41021-018-0106-3. eCollection 2018.
4. 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. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**, 1-11, 2018.
5. Mishima M, Hoffmann D, Ichihara G, Kitajima S, Shibutani M, Furukawa S, Hirose A. Derivation of acceptable daily exposure value for alanine, N, N-bis(carboxymethyl)-, trisodium salt. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**(5):167-170. 2018
6. Yamada, T., Tanaka, Y., Hasegawa, R., Igarashi, T., Hirose, A. Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals. *Fundam. Toxicol. Sci.*, **5**, 75-82, 2018.

学会発表

1. Yamada, T., Kurimoto, M., Miura, M., Kawamura, T., Jojima, K., Taira, N., Ohata, H., Tsujii, S., Ohno, A., Hirose, A. Establishing mechanistic key event information of repeated dose toxicity to support category-based read-across

- assessment. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2019, Baltimore, USA)
2. Yamada, T., Matsumoto, M., Kitajima, S., Aisaki, K., Kanno, J., Hirose, A., Category assessment of repeated-dose hepatotoxicity of phenolic benzotriazoles for OECD IATA Case Studies Project in 2016. 54th EUROTOX 2018 (September 2018 Brussels)
 3. 五十嵐智女、高部道仁、高島宏昌、鈴木洋、牛田和夫、松本真理子、磯貴子、川村智子、井上薫、小野敦、山田隆志、広瀬明彦：サリチル酸ベンジルの遺伝毒性、反復投与毒性及び生殖発生毒性のスクリーニング. 第45回日本毒性学会学術大会 (2018年7月大阪)
 4. 山田隆志、栗本 雅之、広瀬明彦、Chihae Yang, James F Rathman：非発がんエンドポイントのTTCアプローチを改良するための新しいデータベースの開発. 日本動物事件代替法学会第31回大会 (2018年11月熊本)
 5. 松本真理子、田邊思帆里、芹沢英樹、高部道仁、川村智子、五十嵐智女、磯貴子、井上薫、山田隆志、広瀬明彦：アセナフチレンの人健康影響に係る安全性試験結果：28日間反復投与毒性試験及び遺伝毒性試験. 第45回日本毒性学会学術大会 (2018年7月大阪)
 6. 城島光司、山田隆志、広瀬明彦：インビトロ試験データを用いた分子レベルのイベントによる肝毒性予測. 第46回構造活性関連シンポジウム(2018年12月大阪)
 7. 城島光司、山田隆志、広瀬明彦：分子キーイベントのインビトロ試験データを用いた肝毒性予測モデルの開発. 日本動物事件代替法学会第31回大会 (2018年11月熊本)
 8. 田邊思帆里、広瀬明彦、山田隆志：Adverse Outcome Pathway(AOP)の構築～ヒストン脱アセチル化酵素阻害による精巢毒性に関するAOPを例に～. 第45回日本毒性学会学術大会 (2018年7月大阪)
 9. 田邊思帆里、山田隆志、広瀬明彦：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDI)によるシグナルパスウェイ～OECDにおける有害性発現パスウェイ (Adverse Outcome Pathway) の取り組みについて～. 第41回日本分子生物学会年会 (2018年11月横浜)
 10. 田邊思帆里、山田隆志、広瀬明彦：遺伝子ネットワーク解析による分子パスウェイ解明及びAOP開発状況について. 日本薬学会第139年会 (2019年3月千葉)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
なし

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価戦略の開発
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備と IATA への適用に関する研究

研究分担者 石田 誠一 国立医薬品食品衛生研究所 薬理部 室長
研究協力者 吉田 喜久雄 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 明関 由里子 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 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、動物試験の代替法として有害性評価での活用が期待されている。化学物質の有害性は、標的部位への到達用量や反応性代謝物量等に大きく依存するため、有害性指標をより適切にカテゴリーアプローチで推定するには体内動態を考慮することが重要である。そこで、我々は生理学的薬物動力学（PBPK）モデルで推定されるトキシコキネティクス情報を加味して、より適切な判断が可能となることを目指し、既報の PBPK モデルパラメータ値を収集し、約 100 文献から約 170 物質の分配係数（血液/空気、組織/血液等）と代謝パラメータ（ V_{max} 、 K_m ）についてカテゴリーごとにデータベース化し、解析した。その結果、分配係数および代謝パラメータには、カテゴリーごとに関連性があることが推察された。さらに、推定の妥当性を確認した PBPK モデルを用いて既報の分配係数推定手法の妥当性を評価し、これらの推定法は、既報値がない物質の分配係数のデータ補完に十分活用できることを確認した。今後収集データを増やし、データベースを拡充して、種々のカテゴリーごとの関連性を確認するとともに、欠損データの補完手法のさらなる検討を行い、カテゴリーアプローチにおけるトキシコキネティクス情報の有用性を明らかにする。

A. 研究目的

WSSD2020 年目標の達成に向けて、有害性情報が欠如した多くの化学物質の健康リスクの評価の実施が大きな課題となっている。また、動物福祉の観点から実験動物を用

いた毒性試験を削減する流れも着実に進んでいる。こうした状況に対応するためには、*in silico* の有害性評価技術の信頼性の向上と適用範囲の拡大が必要である。

定量的構造活性相関 (QSAR) およびカテゴリーアプローチは、実験動物を使用せずに、短期間で多くの化学物質について推定可能であるため、近年、代替法として化学物質の有害性評価での活用が検討されている。カテゴリーアプローチは、有害性が規則的または類似のパターンを示す構造類似物質をグループ (カテゴリー) 化し、各カテゴリーに対する傾向分析やリードアクロスにより欠損データを補完し、未試験物質の有害性を推定する手法である。

化学物質の有害性は、その標的器官・組織への化学物質の到達用量や反応性代謝物の生成量等に大きく依存する。したがって、同一カテゴリーの物質であっても無影響濃度 (NOEL) 等の有害性の指標をより適切に傾向分析やリードアクロスで推定するためには体内動態を考慮することが重要と考えられる。

本研究は、生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルで推定した到達用量や生成代謝物量の情報を傾向分析やリードアクロスを行う際に考慮することにより、より適切な判断が可能となることを目指す。

本年度は、PBPK モデルによる化学物質の体内動態推定に必須の血液/空気および組織/血液間の分配係数、代謝パラメータ (V_{max} 、 K_m) の既報値を収集・解析し、データベース (DB) 化した。さらに、有害性情報と同様に PBPK モデルパラメータ値も多くの物質で欠如しているため、化学構造や物性から推定した血液/空気および組織/血液間分配係数を用いて体内動態を推定し、推定手法の妥当性を検証した。

B. 研究方法

既報のモデルパラメータ値の収集は、比

較的情報が多い脂肪族および芳香族炭化水素、ハロゲン化炭化水素等の揮発性有機化合物 (VOCs) を本年は主に対象とした。これらの物質はヒト健康リスク評価が行われる代表的な一般化学物質である。

さらに、VOCs の吸入曝露でのトキシコキネティクス推定に一般に使用される Ramsey & Andersen タイプの PBPK モデルの推定の妥当性を測定値との比較で確認し、このモデルで、血中や組織中濃度を 3 つの手法で推定された分配係数を用いて推定し、測定値と比較することで分配係数推定法が PBPK モデルパラメータ値の補完において有用であるか否かを検証した。

B.1. PBPK モデルパラメータ値の DB 化

PBPK モデルによる化学物質の体内動態推定に必要な分配係数と代謝パラメータの既報値の収集と DB 化は、主に一般化学物質に関する約 1050 文献がリスト化された U.S. EPA (2006) の 'List of publications relevant to PBPK modeling of environmental chemicals and its use' を基にした。

このリストに記載された各論文について、タイトルや要旨等から DB 化に有用か否かを判定し、採用文献を順次収集した。

その後、収集した文献の内容を精査し、化学物質ごとの分配係数および代謝パラメータを、CAS 番号、SMILES 記法に基づく構造式、対象種、分子量、物性 (Henry 則定数、オクタノール/水分配係数) 等の情報と関連付けてまとめるとともに、カテゴリー (芳香族炭化水素類、炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール・エーテル・エステル・ケトン類等) ごとに物性との相関性等について解析した。

B.2. 検討に用いる PBPK モデルの検証

化学物質の血液/空気および組織/血液の間の分配係数を推定する 3 つの手法を検証する際に使用する PBPK モデルとして、図 1 の Ramsey & Andersen 型の PBPK モデル (吉田・吉田, 2018) を選択した。Ramsey & Andersen 型のモデルは VOCs の吸入曝露時の体内動態推定に一般的に用いられる。このモデルは、動脈血中濃度 (C_A)、静脈血中濃度 (C_V)、肝臓中濃度 (C_L) およびその他の臓器・組織中濃度 (脂肪、高血流組織、低血流組織) (C_F , C_R , C_S) の時間変化を以下の式で表す

$$C_A = (Q_A \cdot C_I + Q_T \cdot C_V) / (Q_T + Q_A / P_N)$$

$$C_V = \left(\sum_i Q_i \cdot C_i / O_i \right) / Q_T \quad i = L, F, R, S$$

$$V_L \frac{dC_L}{dt} = Q_L \left(C_A - \frac{C_L}{P_L} \right) - \frac{V_{max} \cdot C_L / P_L}{K_m + C_L / P_L}$$

$$V_j \frac{dC_j}{dt} = Q_j \left(C_A - \frac{C_j}{P_j} \right) \quad j = F, R, S$$

ここで、 Q_A : 肺胞換気速度、 C_I : 吸気中濃度、 Q_T : 心拍出量、 P_N : 空気/血液分配係数、 Q_i : 臓器・組織 i への血流量、 C_i : 臓器・組織 i 中濃度、 P_i : 臓器・組織 i /血液分配係数、 V_i : 臓器・組織 i への容積、 V_{max} : 最大代謝速度、そして K_m : Michaelis 定数である。

使用する PBPK モデルによる推定が妥当であることを確認するため、Haddad *et al.* (2000) により報告されているベンゼン、トルエン、 m -キシレンおよびエチルベンゼンのラットの生理学パラメータ、分配係数、代謝パラメータを用いてモデルで 50、100 または 200 ppm の濃度で 4 時間吸入曝露されたラットの静脈血中濃度を推定し、報告されている 4 時間の吸入曝露終了後 6 分、30 分、1 時間、1.5 時間、2 時間目に測定された濃度と比較し、推定の妥当性を検討した。

B.3. 分配係数推定手法の検証

一般化学物質の分配係数や代謝パラメータの既報値は限られるため、既報値収集と並行して、以下の分配係数推定法の妥当性を検証した。

- Béliveau, Tardif & Krishnan (2003)
- 吉田・吉田 (2014)
- Jongeneelen & ten Berge (2011)

これらはいずれも Gargas *et al.* (1989) のラットでの血液/空気および組織/空気分配係数の測定値をベースとしており、Béliveau *et al.* の方法は対数測定値と物質の部分構造 (メチル基、二重結合、芳香環等) の間の重回帰分析で得られた相関式で炭化水素とハロゲン化炭化水素の分配係数を予測する。吉田・吉田の方法は物質を構成する元素 (sp^3 混成軌道炭素、芳香族 sp^2 混成軌道炭素等) の間の重回帰分析で得られた相関式で炭化水素の分配係数を予測する。Jongeneelen & ten Berge の方法は、対数測定値と物質のオクタノール/水分配係数 ($\log Pow$) および Henry 則定数の間の相関式から様々な物質の分配係数を予測する。

これらの分配係数推定法を検証するため、以下の 15 炭化水素の血液/空気分配係数、肝臓、脂肪、高血流量組織および低血流量組織の対血液分配係数を推定した (下線付は Gargas *et al.* による測定値がある物質)。

- 脂肪族炭化水素: n -ヘキサン、 n -ヘプタン、 n -オクタン、 n -ノナン、 n -デカン
- 芳香族炭化水素: ベンゼン、トルエン、 o -キシレン、1,2,4-トリメチルベンゼン、 t -ブチルベンゼン
- 脂環式炭化水素: シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、1,2-ジメチルシクロヘキサン、1,2,4-トリメチルシクロヘキサン、 t -ブチルシクロヘキサン

分配係数推定値と Gargas *et al.* の測定値を用いて、Ramsey & Andersen 型の PBPK モデルで 15 物質のラットの脳、肝臓、腎臓、脂肪および血中濃度を Zalsen *et al.* (1990) による体内動態試験と同じ条件で推定した。その際、脳と腎臓中濃度は高血流組織中濃度と等しいと仮定した。

- ・ 動物：ラット（体重：150～200 g）
- ・ 曝露濃度：100 ppm
- ・ 曝露時間：12 時間/日×3 日
- ・ 濃度測定：血液、脳、肝臓、腎臓、脂肪組織中の被験物質濃度を吸入曝露開始後、12、36、60 および 72 時間目に Head space 法で測定

なお、PBPK モデルによる推定に必要な 15 物質の V_{max} (mg/h/kg^{0.75}) と K_m (mg/L) の値は Price and Krishnan (2011) の既報値を用いた。また、ラットの生理学パラメータは、体重が 0.175 kg としたこと以外は表 3 と同じ値を用いた。

（倫理面への配慮）本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

収集文献の精査結果、使用する Ramsey & Andersen 型の PBPK モデルの検証結果および分配係数推定手法の検証結果について以下に記載する。

C.1. PBPK モデルパラメータ値の DB 化

U.S. EPA (2006) の 'List of publications relevant to PBPK modeling of environmental chemicals and its use' 内の約 1050 文献のリストの中から、約 500 をタイトルや要旨から有用文献と判定し、収集した。

収集した文献の内容を精査し約 100 文献から DB 化に必要な約 170 物質の情報を得

た。表 1 に示すように、情報のそれぞれ、約 2 割、4 割および 3 割が、炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール・ケトン・エステル・エーテル類の各カテゴリーに関するもので、また約 6 割弱の文献からヒトとラットでの分配係数と代謝パラメータの両方の情報を入手できた。

収集した情報は、表 2 に示す芳香族炭化水素類の一例のような形式でカテゴリーごとに DB 化した。

収集した既報のラットの血液/空気分配係数値と空気/水平衡定数である Henry 則定数にはいくつかの外れ値も見られるが負の相関性が見られた。代表的な芳香族炭化水素類であるトルエン、キシレン、スチレン、ベンゼン、エチルベンゼン、クロロベンゼンのラットでの血液/空気分配係数と Henry 則定数は比較的狭い範囲に分布し、ハロゲン化炭化水素類の血液/空気分配係数と Henry 則定数の分布からも化学物質のカテゴリーごとに関係性があることが推察された。

また収集した既報のラットの V_{max} 値と K_m 値の関係を調べた結果、芳香族炭化水素類とハロゲン化炭化水素化合物類の代謝パラメータは炭化水素類とは異なった位置に分布し、カテゴリーごとに関係性があることが推察された。

C.2. 検討に用いる PBPK モデルの検証

表 3 および表 4 に示す Haddad *et al.* (2000) が報告した生理学パラメータ、分配係数および代謝パラメータを用いて Ramsey & Andersen 型の PBPK モデルで推定したベンゼン、トルエン、*m*-キシレンおよびエチルベンゼンのラット静脈血中濃度と測定濃度を比較した結果を図 2 に示す。PBPK モデルは 50、100 または 200 ppm で 4 時間吸入曝露されたラットの血中濃度を再現できる

と判断された。測定濃度と推定濃度間の相関係数は4物質とも0.96であり、推定濃度と測定値との差異は0.77倍(ベンゼン)、0.93倍(トルエン)、0.98倍(エチルベンゼン)および1.00倍(*m*-キシレン)であった。ベンゼンにおいて推定値は測定値に比べて若干低い、これらの比較結果から、分配係数推定法の妥当性の検証に、Ramsey & Andersen 型のPBPKモデルを用いることは可能と判断した。

C.3. 分配係数推定手法の検証

Gargas *et al.*の分配係数測定値およびBéliveau *et al.*、吉田・吉田またはJongeneelen & ten Bergeの方法で推定した分配係数を用いてRamsey & Andersen 型のPBPKモデルで計算した15種の炭化水素のラットの脳、肝臓、腎臓、脂肪および血中濃度とZalsen *et al.*の測定濃度を比較した。

Zalsen *et al.*の測定濃度とPBPKモデルによる推定濃度間の相関係数はそれぞれ、0.85(Gargas *et al.*の測定値:n=83(5物質))、0.71(Béliveau らの方法による推定値:n=271(トレーニング用5物質、検証用10物質))、0.87(吉田・吉田の方法による推定値:n=271(トレーニング用5物質、検証用10物質))および0.81(Jongeneelen & ten Bergeの方法による推定値:n=214(トレーニング用5物質、検証用7物質))であった。また、推定濃度は測定濃度に比べて高めの傾向を示し、推定濃度と測定濃度との差異はそれぞれ、2.8倍(Gargas *et al.*の測定値)、3.5倍(Béliveau らの方法による推定値)、1.4倍(吉田・吉田の方法による推定値)および2.8倍(Jongeneelen & ten Bergeの方法による推定値)であった。

以上の比較結果から、既報の分配係数推定法はラット体内の臓器・組織中濃度をフ

ァクター5未満の差異で推定でき、分配係数のデータ補完に十分活用できると判断できた。

D. 考察

収集・整理中の炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール・ケトン・エステル・エーテル類等の分配係数と代謝パラメータに対する解析により、カテゴリー内物質の各パラメータがどの程度類似しているかについて知見を得ることが可能となると考えられた。今後、関連文献をさらに収集・整理しDB化に供する物質数およびカテゴリーの拡大を図り、カテゴリー別の代表的な代謝パラメータの値を設定する等の検討を行う必要がある。

炭化水素類の体内動態試験結果との比較により、Ramsey & Andersen 型のPBPKモデルは、炭化水素等のVOCsの吸入曝露後の体内動態を適切に再現でき、体内動態推定に有用と判断されたが、既報の試験結果を用いた同様の検証が経口経路の曝露に対しても必要と考えられる。

また、ハロゲン系炭化水素等のように、反応性代謝物の生成が有害性発現の機序に係ると示唆されている物質にも対応できるように代謝物の生成量等についてもモデル推定の妥当性を検証する必要があると考えられる。

検討した3つ推定法による分配係数推定値には大きな差異はないと考えられるが、Jongeneelen & ten Bergeの方法は、物性値さえあれば、炭化水素類やハロゲン化炭化水素以外の様々な物質の分配係数の推定にも適用可能なため、3つの方法の中では最も有用と判断される。今後も含酸素あるいは含窒素物質等についてもこの方法の推定の妥

当性を検証する必要がある。

代謝パラメータについては、残念ながら、実用に値する既報の推定法はないため、収集した既報の V_{max} 値や K_m 値を基にした推定方法の検討が必要と考えられる。

E. 結論

体内動態予測システムの基盤整備では、収集した分配係数と代謝パラメータの DB 化を進めるとともに、化学物質の物性や化学構造から推計した血液/空気および組織/血液間の分配係数を用いて妥当な体内動態を推定することが可能であることを確認した。

F. 参考文献

1. Béliveau, M., R. Tardif, and K. Krishnan (2003), Quantitative structure–property relationships for physiologically based pharmacokinetic modeling of volatile organic chemicals in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189**, 221–232
2. Gargas M.L., R.J. Burgess, D.E. Voisard, G.H. Cason and M.E. Andersen (1989), Partition coefficients of low-molecular-weight volatile chemicals in various liquids and tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **98**, 87–99.
3. Haddad, S., G. Charest-Tardif, R. Tardif, and K. Krishnan (2000), Validation of a physiological modeling framework for simulating the toxicokinetics of chemicals in mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **167**, 199–209.
4. Jongeneelen, F. and W. ten Berge (2011), IndusChemFate, A multi-chemical PBTK-model in MS-Excel applicable for workers, consumers and experimental animals User manual, version 2.00.
5. Meulenberg, C.J.W. and H.P.M. Vijverberg (2000), Empirical relations predicting human and rat tissue:air partition coefficients of volatile organic compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **165**, 206–216.
6. Price K. and K. Krishnan (2011), An integrated QSAR–PBPK modelling approach for predicting the inhalation toxicokinetics of mixtures of volatile organic chemicals in the rat. *SAR QSAR Environ. Res.*, **22**, 107–128.
7. Ramsey, J. C., and Andersen, M. E. (1984), A physiologically-based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 159–175.
8. U.S. EPA (2006), Approaches for the application of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models and supporting Data in risk assessment, Appendix List of publications relevant to PBPK modeling of environmental chemicals and its use. EPA/600/R-05/043F.
9. Zahlens K., I. Eide, A.M. Nilsen and O.G. Nilsen (1992), Inhalation kinetics of C6 to C10 aliphatic, aromatic and naphthenic

hydrocarbons in rat after repeated exposures. *Pharmacol. Toxicol.*, **71**, 144-149.

10. 吉田喜久雄・吉田愛 (2014), 分子構造に基づく有機化学物質の体内動態の予測. 日本リスク研究学会第 27 回年次大会講演論文集, C-1-1.
11. 吉田喜久雄・吉田愛 (2018), 有機ハイドライドおよびその脱水素体による水素ステーション周辺住民への慢性健康影響リスクの推定. 環境科学会誌, **31**, 164-177.

G. 研究発表

誌上発表

なし

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 収集文献から得られた約 170 物質の情報の内訳

	分配係数のみ	代謝パラメーターのみ	分配係数および代謝パラメーター
芳香族炭化水素類	12	4	44
ハロゲン化炭化水素類	31	14	69
アルコール・ケトン・エステル・エーテル類	49	5	32
ダイオキシン類	29	0	19
その他	0	0	4
計	121	23	168
合計			312

表 2. 芳香族炭化水素類の分配係数および代謝パラメーター一覧

Chemical Name	CAS RN	SMILES	対象種	Vmax, mg/h/kg	Km, mg/L	血液/空気分配係数	分配係数							文献no				
							種類	肝臓(L)	脂肪(F)	高血流(RP)	低血流(SP)	脳(B)	筋肉(M)					
Toluene	108-88-3	c(ccc1)C1C	rat		0.3	18.0	組織/血液	4.64	28				2.79	1.54	75			
			rat	7.5	0.3	18.0	組織/血液	4.64	56.72						240			
			rat	4	0.29	18	組織/血液	4.6	56.7	4.6	1.5	2			933			
			rat	4.8	0.55	18	組織/空気	83.6	1021.0	83.6	27.7				6			
			rat	3.44	0.13	18.0	組織/空気	83.6	1021.0	83.6	27.7				385			
			rat	3.44	0.13	18	組織/空気	83.52	1020.6	83.52	27.72				386			
			rat	4.8	0.55	18.0	組織/空気	83.6	1021.0	83.6	27.7				892			
			rat	3.44	0.13										530			
			human		0.55	15.6	組織/血液	2.98	65.8						75			
			human	4.8	0.55	13.9	組織/血液	3.04	130.22	3.04	1.99	2.6			76			
			human	7.5	0.3	17.01	組織/血液	4.91	60.01	4.91	1.61				308			
			human		0.55	16.3	組織/血液	4.63	56.7	4.64	1.54				999			
			human	4.8	0.55	15.6	組織/空気		1021.0	83.6	27.7				383			
			human		15.6										892			
Xylene	1330-20-7	c(ccc1)C1C1C	rat	8.4	0.2	41.3	組織/血液	2.18	42.32				2.27	0.93	240			
			rat				組織/血液	2.00	51.5				2.68	1.99	472			
			rat	6.49	0.45	46.0	組織/空気	90.9	1859.0	90.9	41.9				385			
			rat	6.49	0.45	46.0	組織/空気	90.39	1859	90.9	41.9				386			
			rat			39.9	組織/空気	79.9	2050			107	79.7		472			
			rat	5.50	0.22	46	組織/空気	90.9	1859.0	90.9	41.9				892			
			rat	5.50	0.22	46.0	組織/空気	90.9	1859.0	90.9	41.9				893			
			rat	6.49	0.45										530			
			human			44.78	組織/血液	2.14	41.28	2.14	0.97				308			
			human				組織/血液	14.67	98.63	6.14	2.79		12.34		602			
			human	5.5	0.22	26.4	組織/空気		1859.0	90.9	41.9				383			
			human	8.4	0.2		組織/空気	113	3035			124	61		440			
			human		0.1	19	組織/空気	279	1874	117	53		235		602			
			human	8.88	0.32	26.4									472			
			human			26.4									436			
			human			26.4									893			
human	8.2											602						
Styrene	100-42-5	c(cccc1)C1C=C	rat				組織/血液	1.18	40.9	1.14				0.86	214			
			rat	8.4	0.4	40.2	組織/血液	3.46	86.47			3.86	1.16		240			
			rat			40	組織/血液	2	87						821			
			human				組織/血液	2.71	93.8	2.6			1.96		214			
			human	6.7	0.36	69.74	組織/血液	2.01	20.64	2.04	0.78				308			
			human			48	組織/血液	2	50						821			
			mouse				組織/血液	1.18	40.9	1.14				0.86	214			
			mouse			40	組織/血液	2	87						821			
Benzene	71-43-2	c1ccccc1	rat	3.22	0.62	17.8	組織/血液		28	1	0.6				110			
			rat	2.17	0.78	17.8	組織/血液	1	28	1	0.6				110			
			rat	3.3	0.6	17.8	組織/血液	0.96	28.03			1.75	0.58		240			
			rat	2.11	0.01	15.0	組織/空気	17.0	500.0	17.0	15.0				385			
			rat	2.50	0.11	15.0	組織/空気	17	500	17	15				386			
			rat	2.11	0.10										530			
			human			15	組織/血液	1.5	30	1.5	1.5				104			
			human	1.2	0.35	7.79	組織/血液	1.41	52.11	1.41	1.93				308			
			Ethyl benzene	100-41-4	c(cccc1)C1CC	rat	6.39	1.04	42.7	組織/空気	83.8	1556.0	60.3	26.0				385
						rat	6.39	1.04	42.7	組織/空気	83.8	1556.0	160.3	26.0				386
rat	7.3	1.39				42.7	組織/空気	83.8	1556.0	60.3	26.0				892			
rat						16.9									73			
human	7.3	1.39					組織/空気	99	2662			108	52.7		440			
human	7.3	1.39	28.0	組織/空気		1556.0	83.8	26.0				383						
Trimethyl benzene	95-63-6	c(ccc1C)C1C1C	human				組織/血液	5	125	5				5	447			

表 3. ラットの生理学パラメータ

パラメータ	値
体重, kg	0.25
肺換気速度, L/hr/kg ^{0.75}	15
心拍出量, L/hr/kg ^{0.75}	15
肝臓への血流量割合	0.25
脂肪への血流量割合	0.09
高血流組織への血流量割合	0.51
低血流組織への血流量割合	0.15
肝臓の容積割合	0.04
脂肪の容積割合	0.07
高血流組織の容積割合	0.05
低血流組織の容積割合	0.75

[出典 : Haddad *et al.* (2000)]

表 4. 単環芳香族 4 物質の分配係数と代謝パラメータ

化学物質	ベンゼン	トルエン	<i>m</i> -キシレン	エチルベンゼン
対空気分配係数				
血液	15	18	46	42.7
肝臓	17	83.6	90.9	83.8
脂肪	500	1021	1859	1556
高血流組織	17	83.6	90.9	60.3
低血流組織	15	27.7	41.9	26
Michaelis-Menten 型代謝パラメータ				
Vmax _c (mg/h/kg ^{0.74})	2.11	3.44	6.49	6.39
Km (mg/L)	0.1	0.13	0.45	1.04

[出典 : Haddad *et al.* (2000)]

図 1. Ramsey & Andersen 型の PBPK モデルの構造

[出典：吉田・吉田, 2018]

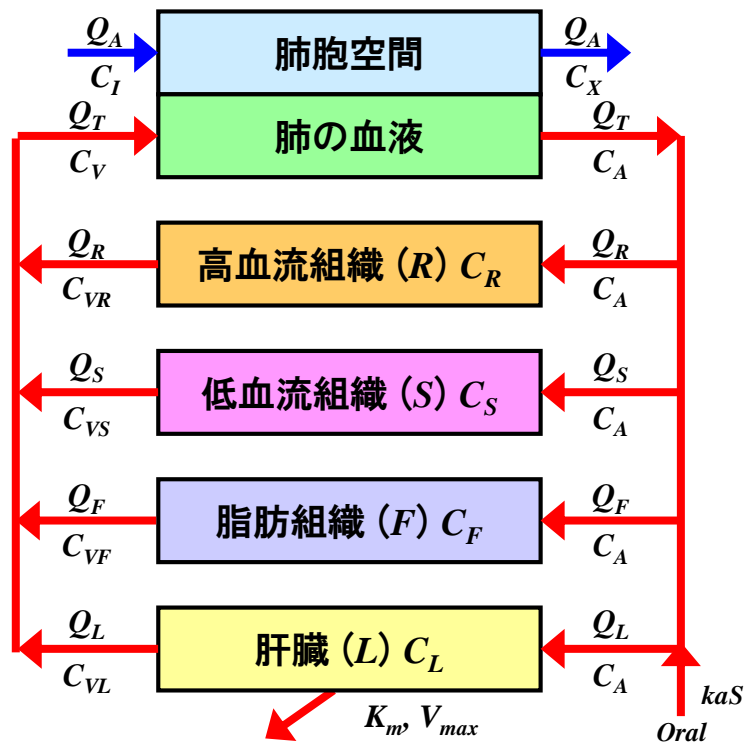
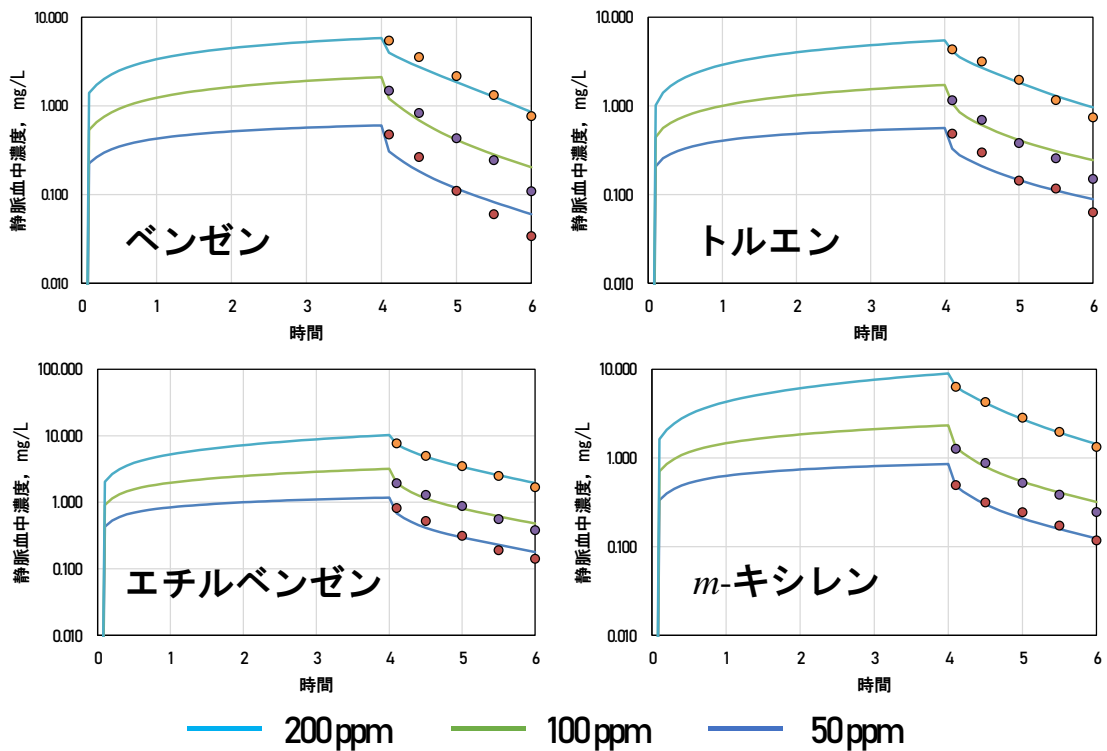


図 2. 吸入曝露後の静脈血中濃度の推定値と測定値の比較

実線：推定値、●：測定値



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	化学物質毒性ビッグデータベースと、インシリコによる毒性予測		IT・ビッグデータと薬学	日本学術協力財団		2019	89-100
山田 隆志	OECDにおけるQSAR、AOPの開発状況		皮膚の安全性・有用性評価法	技術情報協会		2018	151-157

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
Honma M, Kitazawa A, Cayley A, Williams RV, Barber C, Hanser T, Saiakhov R, Chakravarti S, Myatt GJ, Cross KP, Benfenati E, Raitano G, Mekenyan O, Petkov P, Bossa C, Benigni R, Battistelli CL, Giuliani A, Tcheremenskaia O, DeMeo C, Norinder U, Koga H, Jose C, Jeliaskova N, Kochev N, Paskaleva V, Yang C, Daga PR, Clark RD, Rathman J.	Improvement of quantitative structure-activity relationship (QSAR) tools for predicting Ames mutagenicity: outcomes of the Ames/QSAR International Challenge Project.	Mutagenesis	34	3-16	2019
Petkov PI, Schultz TW, Honma M, Yamada T, Kaloyanova E, Mekenyan OG.	Validation of the performance of TIMES genotoxicity models with EFSA pesticide data.	Mutagenesis	34	83-90	2019

Amberg A, Andaya RV, Anger LT, Barber C, Beilke L, Bercu J, Bower D, Briggs A, Cammerer Z, Cross KP, Custer L, Dobson K, Gerets H, Gerets V, Glowienke S, Gomez, S, Van Gompel J, Harvey J, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kemper R, Kenyon M, Kruhlak N, Leavitt P, Miller S, Muster W, Naven R, Nicolette J, Parenty A, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Sasaki JC, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, Weiner S, Welch DS, White A, Wichard J, Woolley D, Myatt GJ.	Principles and procedures for handling out-of-domain and indeterminate results as part of ICH M7 recommended (Q)SAR analyses.	Regul Toxicol Pharmacol.	102	59-64	2019
Mishima M, Hashizume T, Haranosono Y, Nagato Y, Takeshita K, Fukuchi J, and Homma M.	Meeting report, ICH M7 relevant workshop: use of (Q)SAR systems and expert judgment.	Genes and Environment	40	19-25	2018
Tennant RE, Guesné SJ, Canipa S, Cayley A, Drewe WC, Honma M, Masumura K, Morita T, Stalford SA, Williams RV.	Extrapolation of <i>in vitro</i> structural alerts for <i>in vivo</i> mutagenicity to the <i>in vivo</i> endpoint.	Mutagenesis	34	111-121	2019
Amberg A, Anger LT, Bercu J, Bower D, Cross KP, Custer L, Harvey JS, Hasselgren C, Honma M, Johnson C, Jolly R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Leavitt P, Quigley DP, Miller S, Snodin D, Stavitskaya L, Teasdale A, Trejo-Martin A, White AT, Wichard J, Myatt GJ.	Extending (Q)SARs to incorporate proprietary knowledge for regulatory purposes: is aromatic N-oxide a structural alert for predicting DNA-reactive mutagenicity?	Mutagenesis	34	67-82	2019

Morita T, Shigeta Y, Kawamura T, Fujita Y, Honda H, Honma M.	<i>In silico</i> prediction of chromosome damage: comparison of three (Q)SAR models.	Mutagenesis	34	91-100	2019
Benfenati E, Golbama ki A, Raitano G, Rof ncaglioni A, Mangane lli S, Lemke F, Norimes test for mutageni nder U, Lo Piparo E, Honma M, Mangana ro A, Gini G.	A large comparison of integrated SAR/QSAR models of the Ames test for mutagenicity.	SAR QSAR Environ Res.	29	591-611	2018
Myatt GJ, Ahlberg E, Akahori Y, Allen D, Amberg A, Anger LT, Aptula A, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Burden N, Cammerer Z, Cronin MTD, Cross KP, Custer L, Dettwiler M, Dobo K, Ford KA, Fortin MC, Gadd-McDonald SE, Gellatly N, Gervais V, Glover KP, Glowienke S, Van Gompel J, Gutsell S, Hardy B, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Hughes K, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kim MT, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmere r K, Leavitt P, Majer B, Masten S, Miller S, Moser J, Mumtaz M, Muster W, Neilson L, Oprea TI, Patlewicz G, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Ruiz P, Schilter B, Serafimova R, Simpson W, Stavitskaya L, Stidl R, Suarez-Rodriguez D, Szabo DT, Teasdale A, Trejo-Martin A, Valentin JP, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Wooll ey D, Zwickl C, Has selgren C.	<i>In silico</i> toxicology protocols.	Regul Toxicol Pharmacol.	96	1-17	2018

Fukuchi J, Kitazawa A, Hirabayashi K, Honma M.	A practice of expert review by read-across using QSAR Toolbox.	Mutagenesis	34	49-54	2019
Fujita Y, Honda H, Matsumura S, Yamae M, Morita T, Matsuda T, Morita O	A decision tree-based integrated testing strategy for the tailor-made carcinogenicity evaluation of test substances using genotoxicity test results and chemical spaces.	Mutagenesis	34	101-109	2019
Igarashi T, Takashima H, Takabe M, Suzuki H, Ushida K, Kawamura T, Matsumoto M, Iso T, Tanabe S, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A.	Initial hazard assessment of benzyl salicylate: <i>In vitro</i> genotoxicity test and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening test in rats.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	100	105-117	2018
Chesnut M, Yamada T, Adams T, Knight D, Kleinstreuer N, Kass G, Luechtefeld T, Hartung T.	Regulatory acceptance of read-across.	ALTEX	35	413-419	2018
Igarashi T, Serizawa H, Kobayashi K, Suzuki H, Matsumoto M, Iso T, Kawamura T, Inoue K, Ono A, Yamada T, Hirose A.	Initial hazard assessment of 4-benzylphenol, a structural analog of bisphenol F: Genotoxicity tests <i>in vitro</i> and a 28-day repeated-dose toxicity study in rats.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	96	64-75	2018
Yamada T, Tanaka Y, Hasegawa R, Igarashi T, Hirose A.	Male-specific prolongation of prothombin time by industrial chemicals.	Fundam. Toxicol. Sci.	5	75-82	2018
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.	Fundam. Toxicol. Sci.	5	1-11	2018

Kohara A, Matsumoto M, Hirose A, Hayashi M, Honma M, Suzuki T.	Mutagenic properties of dimethylaniline isomers in mice as evaluated by comet, micronucleus and transgenic mutation assays.	Genes Environ.	40	18-27	2018
--	---	----------------	----	-------	------

厚生労働大臣 殿

平成31年3月28日

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部 第四室 室長
(氏名・フリガナ) 山田 隆志 (ヤマダ タカシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

平成31年3月28日

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 変異遺伝部 部長
(氏名・フリガナ) 本間 正充 (ホンマ マサミツ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

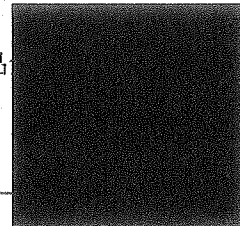
当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 2. 研究課題名 インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部 第三室 室長
(氏名・フリガナ) 森田 健 (モリタ タケシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

平成31年3月28日

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性予測評価部 部長
(氏名・フリガナ) 広瀬 明彦 (ヒロセ アキヒコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

平成31年3月28日

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
3. 研究者名 (所属部局・職名) 薬理部 第三室 室長
(氏名・フリガナ) 石田 誠一 (石田 誠一)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。