

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 31 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

令和 2 年 (2020 年) 3 月

平成 31 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.....	16
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.....	17
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 笠松 俊夫.....	27
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.....	36
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.....	47
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.....	68

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)

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戦略を開発する。

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では、構築した12,140物質より成るAmesデータベースに詳細な試験条件（各菌株の陽性陰性結果、被験物質純度、媒体）を追加入力すると共に、一部の試験結果の再評価を行い、より信頼性が高く、情報量の多いベンチマークデータベースを完成させた。これは、第2回Ames/QSAR国際共同チャレンジプロジェクトに活用される。

代謝予測モデルの改良による*in vivo*遺伝毒性予測性の向上に関する研究では、前年度にデータの妥当性を検証した*in vitro*染色体異常試験（CA）陰性で*in vivo*小核試験陽性（MN）の12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）陽性の4物質について*in vitro/in vivo*の代謝の差異の要因を検証したところ、主な要因として、1) 代謝酵素の発現、2) 試験における暴露時間、が挙げられた。これらの知見を活用して代謝シミュレーションシステム（Tissue Metabolism Simulator System: TIMES）の改良に取り組んだ。

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では、前年度に構築した国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を注意深く選抜し、化学構造、毒性機序に基づいて神経毒性物質をグループ化した。類似物質の情報を解析してカテゴリーの領域を定義し、OECD QSAR Toolboxに実装することにより、神経毒性を予測評価するカテゴリーアプローチの基盤を構築した。

AOP キーイベントに基づくリードアクロスモデルの精度向上に関する研究では、化学物質審査規制法のもとで実施された生殖発生毒性試験を用いて新たなデータベースを作成し、関連するキーイベント候補を抽出して、そのうちひとつについて AOP を開発することに成功し、このアプローチの妥当性を検証することができた。

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）の文献を収集し、分配係数と代謝パラメータ既報値のデータベースを構築した。さらに、分子間相互作用と代謝酵素によりカテゴリー化した分配係数と代謝パラメータの代表値を設定した。これらの代表値を用いて、PBPK モデルでトキシコキネティクスを推定した結果、カテゴリーごとのトキシコキネティクスの特徴把握にモデルが有用であることが示された。

## 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

笠松 俊夫

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

研究員

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

## 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*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変異原性については、これまで我が国で行われた安衛法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13000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。平成31年度は詳細データベースの作成と信頼性の高いデータのみからなるベンチマークデータセットの構築を目指す。（本間）

*In vitro*試験の代謝系（肝S9画分）と*in vivo*試験（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る。この代謝の相違を理解し、これらの知見を考慮した遺伝毒性予測モデルを構築することにより、精緻な*in vivo*遺伝毒性予測を可能にする。（笠松）

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）

さらに、AOP キーイベントに基づくリードアクロスモデルの精度向上については、平成 30 年度は化学物質の主要な標的である肝毒性エンドポイントに関連するキーイベント情報と毒性試験結果による毒性プロファイルから肝毒性予測モデルの作成を行ったが、平成 31 年度は、生殖発生毒性に関するリードアクロスモデルの構築を目指して、毒性試験結果と既知の生殖発生毒性に関する情報を元に、生殖発生毒性に関連するキーイベントと AOP の同定を試みる。(広瀬)

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、文献等から物理化学的および生化学的パラメータを引き続き収集し、一般化学物質のパラメータ既報値に関するデータベースを構築する。収集したヒトのパラメータをカテゴリー化し、各カテゴリーの分配係数（血液/空気および組織/血液）、代謝パラメータ（Vmax と Km）の特徴を解析し、代表値を設定する。代表値を用いて生物学的薬物動力学（PBPK）モデルでヒトの体内での動態を計算し、カテゴリーごとのトキシコキネティクスの特徴を解析することを試みる。(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は平成30年度に終了し、論文化した。合計約25000物質の試験報告書を電子化し、詳細データベースの作成を試みた。また、既存のCGX、ハンセンデータベースと共に試験結果を再評価した。評価が困難な物質に関しては実

際にAmes試験を実施し、結果を検証した。これら作業により信頼性の高いデータのみからなるベンチマークデータセットの構築を目指す。

### 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（笠松）

平成 30 年度に遺伝毒性試験結果の妥当性が検証された物質について代謝に関する情報を収集し、代謝マップを作成した。In vitro/in vivo の代謝の差異をもたらす要因を検証したところ、主な要因として、1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の暴露時間、が考えられた。Ames 陰性・TGR 陽性物質、in vitro CA 陰性・in vivo MN 陽性物質について、どのような要因で説明できるケースかを整理し、得た知見を基に in silico 遺伝毒性予測モデル OASIS TIMES の代謝シミュレータの改良を試みた。

### B.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）

国内外で公開されている信頼性の高い化学物質の反復投与毒性試験データ（HESS、COSMOS、ToxRef、RepDose、食品健康影響評価書等、総計約 2,500物質）を統合した反復毒性試験統合データベース（新規化学物質は除く）から、病理組織学的に神経系（中枢又は末梢）に何らかの異常が見られている物質、および神経系に対する影響の可能性があると考えられる一般状態の変化を有する物質を選抜した。この中から、死亡例あるいは死亡用量でのみ変化の見られているものや、流涎、自発運動低下など他の要因でも生じる不明瞭な変化しか発現していないもの、神経組織の色素沈着や空

胞化など軽度な組織変化が記載されているにもかかわらず一般状態に変化の見られていないものを対象から外した。選抜した物質について、PubMed、Google、PubChem等の検索エンジンを用いて、*in vivo*における神経影響に関する文献や国内外のリスク評価書及び神経毒性の発現機序に関する文献を収集し精査した。毒性発現とリンクする測定または予測可能なキーイベントと部分化学構造を推定するとともに、関連物質の情報からカテゴリーの構造領域を考察した。

#### 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)

既存化学物質点検プログラムで行われてきた生殖毒性反復投与併合試験 (OECD TG-421) および簡易生殖試験 (OECD TG-422) で得られた生殖発生毒性のパラメータをデータベース化すると共に、データマイニングを行うためにデータの標準化を行った。その結果、一意かつ妥当な化学構造394個のデータセットを対象に解析を行うこととした。次に、このデータセットに収録されている試験結果に対する予測能の指標を得るために、Derek NexusとAOPを用いた生殖発生毒性予測のプロトタイプモデルを用いてバリデーションを行った。バリデーションの結果、既存のモデルではカバーできない毒性学的関心領域を特定するために、5種類のデータマイニングを行った。さらに、得られた毒性学的関心領域と関連する構造クラスのうち、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 受容体と生殖毒性の間のシグナルについて、その主要な構造カテゴリーであるニトロ芳香族化合物を調査しAOPの構築を試みた。

#### 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)

昨年度に引き続き、PBPKモデルに必要な物理化学的および生化学的パラメータの既報値を計667の文献から収集した。一般化学物質の分配係数 (血液/空気、組織/血液等) と生化学的パラメータ ( $V_{max}$ 、 $K_m$ 等) を、化学物質の特性情報、対象生物種、出典等の情報と関連付けてまとめ、データベースを構築した。

ヒトの分配係数値を、van der Waals力、双極子-双極子相互作用、水素結合等の分子間相互作用に基づいて4カテゴリーに分類し、血液/空気分配係数については、ヘンリー則定数との相関性、組織/血液分配係数については、オクタノール/水分配係数との相関性を解析するとともに、各カテゴリーの分配係数値の分布範囲も解析した。 $V_{max}$ と $K_m$ については、代謝にCYP2E1が関与する物質とその他の酵素が関与する物質に分類し、CYP2E1が関与する物質について分子構造フラグメント (ベンゼン環、ベンゼン環水素、炭素-炭素二重結合、二重結合炭素に結合する水素、メチル基、メチレン基、メチン基、4級炭素、塩素および臭素) の $V_{max}$ と $K_m$ への寄与を解析した。さらに、CYP2E1が代謝関与する物質とその他の酵素が関与する物質の $V_{max}$ と $K_m$ の値の分布範囲も解析した。

上記の解析で得られた各カテゴリーの分配係数、 $V_{max}$ および $K_m$ の代表値を用いて、ヒトPBPKモデルで吸入曝露中と曝露後の各組織中の濃度-時間曲線を計算し、各カテゴリーのトキシコキネティクス的一般的な特徴を解析した。

## 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）

安衛法Ames試験報告書は平成27年10月までの登録番号27325までの提供を受けた。このうち、昭和61年以前の登録番号2174までの報告書は廃棄され入手できなかった。従って、合計25151の試験報告書をPDF化した。PDF化は株式会社ユートハンズに委託し、令和元年9月に終了した。

PDF化した試験報告書を基に、データベースの作成を試みた。まず、Ames陽性の1549物質の試験結果について主要データ（物質情報、純度、試験条件、菌株および代謝条件下での試験結果）を抽出し、詳細データベースを構築した。さらに陽性1527と陰性16の試験結果について専門家レビューを行って、結果の再評価を行った。その結果、60物質については間違えて陽性、もしくは陰性と判断されていると考えられ、これら試験結果は変更された。

また、ハンセンデータベース等でAmes試験陽性ではあるが試験報告が古く、信頼性に欠け、さらにQSARでは陰性を示す化合物、またはその逆の挙動を示す化合物について平成30年からAmes試験を実施し、結果の検証を行っている。平成31年度は、bis(methoxyethyl)phthalate、2',3',4'-trichloroacetophenoneの2物質を試験した。両物質とも再現性の高い陽性反応が観察された。

### 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（笠松）

平成30年度に試験データの妥当性を確認したAmes陰性・TGR陽性43物質、in vitro CA

陰性・in vivo MN陽性12物質について代謝に関する文献データを検索した。その結果、代謝マップの作成に十分な代謝情報が得られた。代謝マップを作成し、in vitro陰性・in vivo陽性となった主な要因について検証すると1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の暴露時間、が挙げられた。例えば、Ames陰性・TGR陽性物質のメチルオイゲノールは、硫酸転移酵素（SULT）の働きにより反応性の高い求電子物質が産生され、遺伝毒性を示すが、in vitroではSULTの発現が不十分のため、Ames試験では陰性となると考えられる。またin vitro CA陰性でin vivo MN陽性であるジアゼパムは、生体内で継続的な酸化ストレスを与えることが、in vivo陽性結果の原因と示唆される。In vitro試験では暴露時間が短いため、このような持続的なストレスが起こらず陰性結果が得られるものと考えられる。このようなin vitro陰性・in vivo陽性の差異を説明できる代謝情報を使用して、TIMESの代謝シミュレータの改良に取り組んだ。現行のTIMESは、データベースの代謝情報に発生確率を割り当てているが、速度論的因子は考慮されていない。今回、in vitro陰性・in vivo陽性の差異には試験の暴露時間が重要な因子であることが浮き彫りになったことから、代謝シミュレーションに速度論的因子を導入し、新しいモデリングを構築中である。

### C.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）

平成30年度までに統合化した毒性データベースから、神経毒性影響を引き起こす物質を抽出した。病理組織学的に神経系（中枢および末梢）に異常が見られた物質数は23、病理組織学的な神経系の変化はないが、

神経系に対すると思われる一般状態の異常が見られた物質数は70であった。神経毒性と潜在的に関連性を有する可能性がある部分構造をケモタイプとして抽出したところ、神経毒性物質はその物質数に対して構造的多様性が大きいことが判明した。

続いて、神経系に病理変化を引き起こした物質についてその想定される機序を整理した。中枢神経系に変性または壊死を示した物質のカテゴリーとして、チオフェン類、ハロアルカン、ベンジルアルコールおよびその前駆体、ニトロベンゼン類などが同定された。脳の部位特異的に発現する P450 等の代謝酵素によって生成した反応性代謝物による生体分子の機能障害、グルタチオン抱合による細胞内グルタチオンの枯渇と酸化ストレスの誘導などが神経細胞の不可逆的な障害に関連すると考えられた。

一般症状にのみ影響が見られた物質では、フェニルグアニジン類、代謝されて  $\gamma$ -hydroxybutyric acid を生成する物質群のように神経伝達系に作用するカテゴリー、ベンゼンスルホンアミド類のように脳の pH の制御系に作用するカテゴリー、クロロフェノール/ニトロフェノールのようにミトコンドリアの脱共役作用を有するカテゴリーなどが同定された。さらに有機溶剤として用いられている物質のグループ化を試みたところ、脂肪族アルコール、アルキルエーテル、アルコキシアアルコール、アルキルフェノール類がカテゴリーの候補として同定された。

#### 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)

解析対象とした 394 データセットについて、

様々な評価項目を確立されたオントロジーの用語を使用することによって関連付けを行い、他の毒性に続発するのではなく、選択的に生殖発生毒性を引き起こす可能性のある化合物を選択的毒性物質とし、一般毒性の存在下で生殖発生毒性を引き起こす化合物を「非選択的毒性物質」として分類を行った。このデータセットを Derek Nexus と AOP を用いたプロトタイプモデルで検証を行った結果、Derek Nexus に比較して AOP に基づくモデルで感度の上昇が認められたが、この感度上昇は特異性の低下を伴っており、結果的に 2 モデルの確度は同程度であった。この AOP に基づくモデルの感度の上昇の検証と新規の作用機作の存在を探索するために、5 種類のデータマイニング手法を行った。その結果、パターンマイニング (Sherhod *et al.*, 2014) では有意な毒性メカニズムは見つからなかったが、生殖発生毒性の決定樹 (Wu *et al.*, 2013) では 2 種類、Derek Nexus の別の毒性に対する構造アラートでは 2 種類、ToxCast データとの相関マイニングでは 7 種類、フィンガープリントによる QSAR モデルでは 8 種類の作用メカニズム候補を抽出することができた。そのうち、生殖毒性との関連性やデータセットに含まれる物質の数を参考とし、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 受容体と生殖毒性の間のシグナルについて調査し、AOP の作成を試みた。その結果、主要な構造カテゴリーであるニトロ芳香族化合物は、直接 GnRH とは反応しないことが明らかになったが、さらなる調査で、グルタチオンの減少を伴う酸化ストレスで引き起こされる精巣および精子形成障害に繋がる AOP を確立できた。



### 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)

208種の一般化学物質のヒト、ラットおよびマウスの物理化学的および生化学的パラメータの既報値を収集し、化学物質の特性情報、その他情報および出典とともに、化学物質ごとにデータベース化した(延べ1103物質×48データ項目)。

ヒトの血液/空気分配係数とヘンリー則定数の間には負の強い相関が見られ、バラツキは大きいものの全カテゴリーの物質は同じ回帰直線に従う可能性を示した。ヒトの脂肪/血液分配係数とlog D, pH7.4の間には強い正の相関が見られ、同様にバラツキは大きいものの全カテゴリーの物質は同じ回帰直線に従う可能性を示した。一方、肝臓/血液、高血流組織/血液および低血流組織/血液の各分配係数では、log D, pH7.4との間に強い相関は見られなかった。また、分子間の相互作用が強くなるに伴い、血液/空気分配係数は高くなる傾向を、逆に、組織/血液分配係数は低くなる傾向を示した。

VmaxとKmの対数値と10種の分子構造フラグメントの出現数との間には、重回帰分析により有意な決定係数が得られ、log Vmaxには、炭素-炭素二重結合、二重結合炭素に結合する水素、4級炭素および塩素の出現数が、log Kmには、塩素の出現数が有意な寄与すると示唆された。また、代謝にCYP2E1が関与する物質とその他の酵素が関与する物質のVmaxとKm値は同じ分布傾向を示し、両物質カテゴリーの間でVmaxとKmの分布に差異は見られなかった。

各カテゴリーの物質の分配係数、VmaxおよびKmの代表値を用いて、各カテゴリーの物質の典型的な各組織中濃度-時間曲線

をヒトPBPKモデルで推定した結果、カテゴリーごとに推定された最高濃度や濃度の時間変化パターン、曝露停止後の濃度の初期半減期から、カテゴリー間でトキシコキネティクスに違いがあることが示された。

## **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)

作成した12140物質より成る安衛法Ames試験データベースについて、陽性が報告されている物質を中心に試験報告書を確認し、より詳細な試験条件をデータベースに追加入力した。確認の過程で誤りがあれば訂正、曖昧な反応については複数の専門家が確認し、判定を確定させた。最終的には60物質について判定が変更された。

変更となった主な理由は、1) 単純な確認ミスに起因とすると考えられ、これまでのデータベース記載のリストと試験報告書との食い違いがあったもの。2) 試験実施機関の判定基準が様々であるため、現在の判断基準に合っていないこと。3) 試験としての判定は陰性だが、QSAR予測モデル開発の視点から陽性とするのが妥当と判断されたものがある。

この内3)については、国際共同チャレンジプロジェクトにて評価した17のQSAR予測モデルの内、全て、あるいは1つ以外は全てのモデルが陽性と判定した陰性物質(偽陽性物質)について試験報告書を確認し、陽性基準(e.g. 2倍以上のコロニー数増加)には達していないものの、再現性のある増加傾向が認められた場合はQSAR開発の視点からは陽性と区分するのが妥当と判断したものである。近年のQSAR予測モデ

ルは、確かな根拠に基づいて開発され、予測性が大きく向上している。一方、実試験の Ames 試験は試験、あるいは実施機関によるバラツキがあり、必ずしも再現性が担保されたものではない。こうした背景を鑑みるに、QSAR 予測モデルの殆どが陽性と判断したことは妥当性の高い根拠があると考えられ、実試験においても一定の反応が認められれば、その物質を陽性と区分することに合理性がある。今後、更に QSAR 予測モデルのパフォーマンスが向上すれば、実試験よりも QSAR 予測結果が変異原性の判断において重要視される時代が来る可能性がある。本データベースでは陰性と判定された 9,129 物質の再評価がまだ残っている。今後の課題である。

一方、安衛法以外のデータベースの整備も重要である。ハンセン、CGX、ECVAM 等の Ames 試験データベースが存在するが、多くのデータは古く、また詳細な試験報告書が無い場合も多くある。これらデータベースには基本的な化学構造を有する化学物質が多く収載されており、QSAR モデルの開発に重要である。今回、新たに 2 化合物について Ames 変異原性を確認した。更に試験化合物を増やすことによりケミカルスペースの拡大を目指す。

#### 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 (笠松)

*In vitro* 陰性・*in vivo* 陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して代謝マップを作成した結果、発現代謝酵素や代謝物の違いという質的な差異だけでなく、暴露時間差がもたらす代謝物生成量の違いという量的な差異もクローズアップされることとなった。

このことは現行の *in silico* 遺伝毒性予測モデル (OASIS TIMES) に速度論的視点を取り入れた改良の必要性を認識させ、現在、代謝物の生成を時間軸でシミュレートできるようなモデルの改良を進めている。(代謝物を含む) 遺伝毒性物質が DNA やタンパク質などの標的分子と結合し、その結合量が一定量以上になると遺伝毒性を示すと考えることができることから、この一定量を閾値として遺伝毒性の有無を予測するモデルを、まず *in vitro* の Ames/CA 試験について、その次に *in vivo* の TGR/MN 試験について開発できるよう検討を進める。

#### D.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)

国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を選抜し、その神経毒性機序情報を集積した。本研究の成果の一つとして、化学物質の神経毒性機序情報が集積され、化学物質に対する神経系の選択的な脆弱性の理解を深めることが出来たことが挙げられる。

類似物質や共通部分構造をもつ医薬品・農薬関連物質等の毒性データを比較解析することにより、毒性発現に寄与する基本構造と許容される構造的差異を考察してカテゴリーの領域として定義した。これを OECD QSAR Toolbox のカテゴリープロファイラーへカスタムで搭載することにより、数多くの化学物質の中から神経毒性物質を機序に基づいてプロファイリングすることが可能になると期待できる。本研究では、神経毒性ポテンシャルを有する物質をできるだけ見落とさないようにカテゴリー領域を定義したが、毒性にリンクするキーイベントの

*in vitro*試験データ等をより広範囲に収集して物質間で比較解析することにより、カテゴリーの領域をより精緻に定義できるようになると考えられる。一方で、一部のカテゴリーでは、基本構造を持っていても*in vivo*毒性試験では神経毒性影響が認められていないケースがある。分子ターゲットとの作用（トキシコダイナミクス）の違いに加えて、暴露量や体内分布、代謝などに依存するトキシコキネティクスの違いも要因として挙げられる。実際にカテゴリーアプローチを適用する際には、課題設定を明確にすることが重要である。有害作用の類推、NOAELの推計など、目的によって許容される不確実性のレベルが異なり、必要に応じて追加で情報を収集する必要があることに留意する必要がある。

#### 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）

既存化学物質点検プログラムで行った反復投与毒性試験のうち生殖発生毒性項目を解析した結果、知識ベースの予測モデルより、AOPに基づいた予測モデルで感度が上昇したことから、既存の知識ではカバーできていない生殖発生毒性の作用メカニズムを開発できる可能性のあることが示されたと共に、様々な情報源に基づいてデータマイニングすることにより、いくつかの新規の作用メカニズム候補の抽出を行うことができた。そのうちの一つのメカニズムとして、GnRHとニトロ芳香族と生殖毒性の間のシグナルとニトロ芳香族化合物の関連性について調査を行ったが、実際はGnRHとの関連性はなく、むしろ酸化ストレスによる精巣毒性との関連性が浮かび上がった。こ

のことは、構造と生物活性との相関性のみ頼った解析では、間違ったメカニズムを示唆する可能性があることを示したが、更なる解析結果として別のメカニズムを明らかにできたことは、本手法が、生殖毒性に関してのAOPの開発手段として有用であることを示すことができたと考えられる。

#### 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）

血液/空気分配係数がヘンリー則定数と、そして脂肪/血液分配係数がlog D, pH7.4との強い相関性を示したが、各物質の値には大きなバラツキが見られ、ヘンリー則定数やlog D, pH7.4に追加して新たな説明変数を導入して回帰分析を行うことやカテゴリー内の物質をさらに構造やその他の基準で細分化し、分配係数の代表値を決定することを検討する必要があると考えられた。

生化学的パラメータについては、本年度検討した分子構造フラグメントの寄与率から推定法としての可能性が示されたことから、本年度は考慮しなかったフッ素、酸素等も考慮して、CYP2E1以外の酵素が関与する物質も含めて適用範囲の拡大等を検討する必要があると考えられた。

各Categoryの物理化学的および生化学的パラメータには、かなりの分布幅があるため、各Categoryの物質のヒトでの体内動態をより適切に表現するためには、パラメータの分布を考慮するモンテカルロ法による体内動態の推定とその結果の定量的な不確実性分析がより適切と考えられる。

#### **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進めている。また、令和2年度からは新規の国際チャレンジプロジェクトを開始する。*In vivo*遺伝毒性予測性の向上へ向けて*in vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して代謝マップを作成し代謝の差異を検証したところ、主な要因として、代謝酵素の発現と遺伝毒性試験の暴露時間が挙げられた。得られた知見を基に遺伝毒性予測モデルの改良を図った。

反復投与毒性については、国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を選抜し、化学構造、毒性機序に基づいて神経毒性物質をグループ化した。類似物質の情報を解析してカテゴリーの領域を定義し、OECD QSAR Toolboxに実装することにより、神経毒性を予測評価するカテゴリーアプローチの基盤を構築した。

生殖発生毒性について新たなデータベースを作成し、関連するキーイベント候補を抽出して、そのうちひとつについてAOPを開発することに成功し、このアプローチの妥当性を検証することができた。

体内動態予測システムの基盤整備では、PBPKモデルで使用される分配係数と代謝パラメータ値のデータベース化を継続した。その解析より、カテゴリーに分類された物質群毎に各パラメータの推計や代表値が導出できると考えられた。また、医薬品を対象に、既報のデータベースや推計手法より得られるパラメータ値に基づいてPBPKモデルでヒト血漿中濃度を精度よく推計でき、経口曝露時の体内動態推定に必要なパラメータ推計法が利用できる可能性が示唆され

た。

以上のことから本研究は順調に推移している。

## F. その他 -OECDにおける活動-

本研究班は前研究班（平成27-29年度）に引き続き、OECDと連携してその活動に貢献しつつ、最新の国際動向を収集して本研究へフィードバックさせることを目指している。前研究班の分担研究の継続としてエチレングリコールメチルエーテル（EGME）誘導体を化審法化学物質インベントリーからスクリーニングし、その精巢毒性をカテゴリーアプローチにより予測評価するケーススタディを2018年にIATA Case Studies Projectに提出し、専門家レビュー後の2019年に正式に承認された。各国で高懸念物質としてリスト化されるEGMEの類似物質を機序に基づいて主要な毒性を予測した事例として高く評価された。その後、OECDの推薦により同ケーススタディをEU-ToxRiskのワークショップで紹介し、さらに米国ICCVAM Read-Across Work Groupでも同様に紹介した。OECDを中心にして同手法の国際的なガイダンス作成に貢献している。

2019年のQSAR Toolbox Management Group会議では、本分担研究で作成した生殖発生毒性のデータベースを次年度にOECD QSAR Toolboxに提供することを表明し、質の高いデータ提供を歓迎された。すでにQSAR Toolboxに実装されている生殖発生毒性データと合わせて、カテゴリー解析やグルーピングによるリードアクロス予測の適用範囲の拡大が期待される。さらに、本研究班の概要と成果を同会議で紹介した。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る取り組みに対して多くの関心と期待が寄せられた。また、同会議では、欧州化学品庁（ECHA）より、欧州のREACH規制で企業から提出された大規模の毒性データが、近いうちにQSAR Toolboxを介して様々な解析ができるようになることが表明された。本研究班で集積したデータとQSAR Toolboxの新しいデータとを相互利用することにより、毒性と体内動態予測モデルの開発・検証が国際的に進められるようになると期待される。

## G. 健康危険情報

なし

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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—ICH-M7 を踏まえた遺伝毒性物質の許容値の設定に関する科学— *PHARM TECH JAPAN*. 2019, 35, 1461-1469.
- 2) 本間正充. 化学物質の遺伝毒性評価と定量的構造相関 ((Q)SAR) . *ポリ衛協会報*. 2019, 65, 5-25.
- 3) 本間正充. 毒性試験の未来を考える — (定量的) 構造活性相関による化学物質の変異原性評価 — *国立医薬品食品衛生研究所報告*. 2019, 137, 20-31.
- 4) Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Frericks M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ. Genetic toxicology in silico protocol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019, Oct; 107:104403. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403. Epub 2019 Jun 11. PubMed PMID: 31195068.
- 5) Petkov PI, Kuseva C, Kotov S, Honma M, Kitazawa A, Kulkarni S, Schultz TW, Mekenyan OG. Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of evidences: Application to Ames mutagenicity. *Computational Toxicology*. 2019;12, doi.org/10.1016/J.COMTOX.2017.02.004
- 6) 本間正充. 食品中に混在する微量な化学物質の安全性評価 — 定量的構造活性相関 (QSAR) による変異原性化学物質の同定— *日本包装学会誌*. 2020, 29, 27-42.
- 7) Jojima K, Yamada T, Hirose A. Development of a hepatotoxicity prediction model using in vitro assay data of key molecular events. *Fundam. Toxicol. Sci*. 2019, 6, 327-32.

- 8) Inoue K, Suzuki H, Yamada T. Comprehensive toxicity evaluation of cyclopentyl methyl ether (CPME) for establishing a permitted daily exposure level. *Fundam Toxicol Sci.* 2019, 6, 145-165.
- 9) 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), Series on Testing & Assessment. 2019, No. 308. 1-75.
- 10) Patlewicz G, Lizarraga LE, Rua D, Allen DG, Daniel AB, Fitzpatrick SC, Garcia-Reyero N, Gordon J, Hakkinen P, Howard AS, Karmaus A, Matheson J, Mumtaz M, Richarz A, Ruiz P, Scarano L, Yamada T, Kleinstreuer N. Exploring current read-across applications and needs among selected U.S. Federal Agencies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2019, 106, 197-209.
- 11) Tachibana K, Kass GEN, Ono A, Yamada T, Tong W, Doerge DR, Yamazoe Y. A Summary Report of FSCJ Workshop "Future Challenges and Opportunities in Developing Methodologies for Improved Human Risk Assessments". *Food Safety.* 2019, 7, 83-89.
- 12) 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) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2020, 140, 481-484.
- 13) 田邊思帆里, 広瀬明彦, Maurice Whelan, 山田隆志. 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. *YAKUGAKU ZASSHI.* 2020, 140, 485-489.
- 14) Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Tanabe S, Inoue K, Hirose A. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances(V). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* 2019, 137, 66-72.
- 15) Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Kawamura T, Sakuratani S, Ono A, Hirose A. Validation of the statistical parameters and model selection criteria of the benchmark dose methods for the evaluation of various endpoints in repeated-dose toxicity studies. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2019, 6, 125-136.
2. 学会発表
- 1) Improvement of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) Tools for Predicting Ames Mutagenicity. Honma M. 第 47 回欧州環境変異ゲノム学会 (2019 年 5 月、フランス、レンヌ)
- 2) ICH-M7(医薬品中の DNA 反応性不純物の評価と管理)に関するガイドライン, 本間正充, 第 74 回 MMS 研究会定例会 (2019 年 6 月 京都)
- 3) 重大な発がん性物質は変異原性物質である。変異原性物質は *in silico* で予測できる。従って、発がん性物質は *in silico* で予測できる。本間正充, 第 46 回日本毒理学学会学術年会 (2019 年 6 月 徳島)
- 4) Ames/QSAR International Challenge Project. Honma M. 第 6 回アジア環境変異原学会/日本環境変異原学会第 48 回

- 大会 合同大会 (2019年11月 東京)
- 5) StarDropを活用した香料化合物の*in silico*遺伝毒性評価の試み, 笠松俊夫, 北澤愛莉, 田島澄恵, 金子昌弘, 本間正充, 第6回アジア環境変異原学会/日本環境変異原学会第48回大会 合同大会 (2019年11月 東京)
  - 6) Improvement of Ames test database for developing QSAR prediction models. Kasamatsu T, Kitazawa A, Sugiyama K, Suzuki T, Honma M. *59<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology* (March 2020, Anaheim, USA)
  - 7) Case Study on the Use of Integrated Approach to Testing and Assessment for Testicular Toxicity of Ethylene Glycol Methyl Ether (EGME)-Related Chemicals, Yamada, T., Matsumoto, M., Miura, M., Hirose, A. EU-ToxRisk workshop on NAM-supported read-across: from case studies to regulatory guidance in safety assessment (May 2019, Espoo, Finland)
  - 8) Current status of development and improvement of *in silico* approaches for regulatory chemical safety assessment in NIHS. Yamada, T., Honma, M., Hirose, A. 第46回日本毒性学会学術年会 (2019年6月 徳島)
  - 9) 食品用器具・容器包装材料のポジティブリスト化に向けた安全性評価: 脂肪酸類のグループ評価, 磯貴子, 松本真理子, 鈴木洋, 川村智子, 山田隆志, 井上薫, 杉山圭一, 森田健, 本間正充, 広瀬明彦, 第46回日本毒性学会学術大会 (2019年6月 徳島)
  - 10) Development of hepatotoxicity prediction model using *in vitro* assay data of the molecular key events. Yamada, T., Jojima, K., Hirose, A. IUTOX 15th International Congress of Toxicology (July 2019, Honolulu, USA)
  - 11) Development of *in silico* prediction model for skin sensitization using the alternative tests dataset. Suzuki, M., Ambe, K., Tohkin, M., Yamada, T., Ashikaga, T. CBI学会2019年大会 (2019年10月 東京)
  - 12) 化学物質のヒト安全性評価のための*in silico*アプローチの開発と活用, 山田隆志, 内閣府化学物質の安全管理に関するシンポジウムー化学物質の評価・管理に関する手法やツール等の活用状況ー (2019年11月 東京)
  - 13) 生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータの物質群毎の特徴の解析, 明関由里子, 吉田喜久雄, 石田誠一, 山田隆志, 第32回日本リスク学会年次大会 (2019年11月 東京)
  - 14) 化学物質のヒト健康リスク評価に対する*in silico*アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第47回構造活性相関シンポジウム (2019年12月 熊本)
  - 15) Construction of databases of environmental fate and ecotoxicity for the development of environmental risk evaluation system of pharmaceuticals. Hirose, A., Kobayashi, N., Kurimoto, M., Yamamoto, H., Ikarashi, Y., Yamada, T. Society of Risk Analysis 2019 Annual meeting (December 2019, Arlington, USA)
  - 16) Read-across case study on testicular

toxicity of ethylene glycol methyl ether-related substances for the fourth cycle of OECD IATA Case Studies Project. Yamada, T., Matsumoto, M., Kawamura, T., Miura, M., Hirose, A. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2020, Anaheim, USA)

- 17) PDE 設定の基本的考え方, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 18) 水道水中の汚染化学物質に対する亜急性参照値の導出, 松本真理子, 川村智子, 井上薫, 山田隆志, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 19) 化審法既存化学物質のスクリーニング評価における 1,4-ジクロロブタンの有害性評価, 五十嵐智女, 鈴木洋, 牛田和夫, 松本真理子, 井上薫, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 20) Hazard assessment of hydrazine, a possible migration contaminant from drinking water apparatus. Matsumoto, M., Igarashi, T., Inoue, K., Yamada, T., Hirose, A. 5th Congress of the European Societies of Toxicology (September 2019, Helsinki, Finland)
- 21) The network pathways related to epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer and stem cells. Tanabe, S., Quader, S., Ono, R., Aoyagi, K., Hirose, A., Yokozaki, H., Sasaki, H. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019 年 9 月 京都)

- 22) 生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータの物質群毎の特徴の解析, 明関由里子, 吉田喜久雄, 石田誠一, 山田隆志, 第 32 回日本リスク学会年次大会 (2019 年 11 月 東京)

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

なし



平成 31 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 副所長  
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  
研究協力者 北澤 愛莉 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

これまで労働安全衛生法（安衛法）に基づき実施された Ames 試験の結果に基づく 12,140 物質より成るデータベースを作成し、QSAR ツールの開発を手掛けている事業者がこのデータベースを学習データとして提供し、QSAR による Ames 試験結果の予測性向上に寄与してきた（第 1 回 Ames/QSAR 国際共同チャレンジプロジェクト，実施期間：2014～2017 年）。しかしながら、これまでに提供できたのは化学構造と陰性陽性の結果のみであった。今回、試験報告書の入手が可能となったことから、陽性結果が報告されている物質についてはより詳細な試験条件（各菌株の陽性陰性結果，被験物質純度，媒体）をデータベースに追加入力すると共に、誤りがあれば訂正、曖昧な反応については複数の専門家が確認し、判定を確定させた。またこのプロジェクトで殆どのインシリコ予測モデルにて陽性と判定された陰性（偽陽性）物質についても、試験報告書を確認し、一部の判定を修正した。更新されたデータベースは、より信頼性が高く、情報量の多い学習データとして、第 2 回 Ames/QSAR 国際共同チャレンジプロジェクトに活用される。また、安衛法データベース以外の既存のハンセンデータベースの改定作業も行った。今回、2 つの QSAR モデルで結果が相反する 2 化合物について実際に Ames 試験を実施し、試験結果を確認した。

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においてインシリコ手法を用いて医薬品不純物の変異原性の有無を評価することが受け入れられるなど、実試験に依らないインシリコ手法による安全性確認（Ames試験結果予測）が広がりつつあり、その予測モデルの性能と信頼性の向上は重要性を増している。

化学構造と試験結果のQSARに基づくこれらのインシリコ予測モデルは、既存のAmes試験結果を学習データとして開発されているが、多くの利用可能なAmes試験結果は質・量ともに限定されている。日本では安衛法に基づき、過去50年にわたり、国内の事業場で使用される年間100kg以上の新規化学物質については、Ames試験が実施され、登録されてきている。現行の安衛法試験ガイドラインはOECDのテストガイドラインTG471と実質同等であり、原則GLP条件下で実施されていることから、極めて信頼性の高いものである。このような登録数が数万に及ぶ信頼性の高いAmes試験のデータベースは世界でも稀であり、変異遺伝部では厚生労働省安全衛生部より得た登録物質の構造とAmes試験結果（判定によりClass A：強い陽性、Class B：陽性、Class C：陰性）のリストから、QSAR予測モデル開発に活用

できる12,140物質を抽出してデータベース化した。これをAmes/QSAR国際共同チャレンジプロジェクトとして12のQSARベンダーに3つのフェーズに分割して提供することで、それぞれのQSARベンダーが開発する予測モデル（計17モデル）の予測性能が向上した（Honma *et al.*, 2019）。

今回、厚生労働省安全衛生部から登録物質のAmes試験報告書が入手できるようになったことから、単に陽性陰性の結果だけでなく、予測モデル開発に役立つと思われる試験の詳細条件（被験物質の純度、媒体、試験菌株毎の判定結果と代謝活性化の有無）を試験報告書から抽出し、データベースに追加入力すると共に、試験結果のリストと試験報告書内容の整合性を確認、また曖昧なデータについては専門家の確認を得て再判定した。こうして更に信頼性を高め、かつ詳細なデータを整備し、提供することにより、更に予測性の高いインシリコ予測モデルの開発に寄与することを目的とする。

## B. 研究方法

### B-1 詳細Ames試験データベースの作成

厚生労働省安全衛生部から提供された試験報告書は、外部委託によりスキャンされPDF化されたものについて確認した。登録物質については、安衛法官報通し番号（Serial No.）や安衛法官報公示整理番号などが割り当てられているが、本業務においては受付番号（Registration No.）をベースに取り扱った。

追加入力項目として、1) 被験物質の純度、2) 試験に使用した媒体、3) 標準5菌株（TA100, TA1537, WP2uvrA, TA98, TA1537）それぞれの判定と代謝活性化の有無を設定、

データベース内のClass A：強い陽性（比活性>1,000 コロニー/mg）、Class B：陽性（Class A 以外の陽性）の受付番号から相当する試験報告書の該当箇所を確認し、データベースに入力した。但し各菌株の判定は基本的には通常報告書に記載されている比活性表に依った。古い年代（概ね平成2年度以前）の試験報告書など比活性表がないものについては、個々のデータから比活性を算出し判定した。

データベースのClass C物質（即ちAmes試験陰性物質）については、量的に膨大で確認には相当の時間を要すること、かつ上記追加入力項目の情報の有用性が低いことから基本的には今回確認対象としなかったが、前回の国際共同チャレンジプロジェクトにて評価した17のQSAR予測モデルの内、全て、あるいは1つ以外は全てのモデルが陽性と判定した陰性物質（偽陽性物質）については試験報告書を確認し、その判定が妥当であるかを検証した。

解釈が容易でない、リストと試験報告書の内容が合わない、その他、専門家の確認を仰いだほうが良いと判断したケースについては、Ames試験に精通した所内の専門家が参加する場を設けて、議論・確認をし、同意を得た上で、判定結果をデータベースに入力した。

**B-2 Ames試験の実施による試験結果の確認**  
ハンセンデータベースに記載の以下の2化合物についてAmes試験を実施した。

- ① bis(methoxyethyl)phthalate (Cas# 117-82-8)
- ② 2',3',4'-trichloroacetophenone (Cas# 13608-87-2)

Ames試験は全て外部委託により受託試

験機関が実施した。OECD試験ガイドラインTG471 に準拠し、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames Test）を実施した。本試験はアミノ酸要求性のサルモネラ菌と大腸菌の株を用いて点変異を検出し、被験物質がDNAに影響を与えるか否かの判定する試験である。試験は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成8年3月22日付、衛化第29号生活衛生局長通知）に準拠し、医薬品医療機器法施行規則第43条「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施した。

（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 試験報告書確認と詳細条件の入力

年度の古い受付番号2174以下の試験報告書（概ね昭和61年以前）は、厚生労働省安全衛生部に問い合わせたが所在が確認できず、入手不可であった。

入手できた試験報告書の内、確認したのは陽性物質1549（Class A: 628, Class B: 921）と、先に記した前回プロジェクトの偽陽性物質であった16物質について陰性との判定を見直した。再評価物質のまとめを表1に示す。

データベースに追加入力した内容を例示する（表2）。追加入力項目についての入力方針は以下の通りである。

#### ① 被験物質の純度（Purity）

試験報告書記載の数値(%)を入力。但し、>と≥の区別をしなかった。

#### ② 試験に使用した媒体（Solvent）

実質的に同一と考えられる媒体は試験報告書の記載に関わらず統一するよ

うにした(例:脱水DMSO等はDMSOに、注射用水、蒸留水等はH<sub>2</sub>Oに)。

### ③標準5菌株それぞれの判定と代謝活性化の有無(S9+/-)

試験報告書記載の比活性表の値に基づき、どのClassに相当するか判定し、試験間でClassが異なる場合は試験間で一番高い比活性値に基づきClassを選択した。

当初は比活性表に数値の記載があれば、その菌株は陽性で見做し、該当するClassを入力していたが、作業を進める内に、例えば予備試験と本試験の2試験があり、どちらかの一方で陽性反応が確認された場合、比活性表には数値が記載されているが、確認試験にて再現性が確認されず、受託試験機関が最終的に陰性と結論付けているようなケースが散見された。このような場合、比活性表の記載そのままにClass分類するのは不適切であることから、以降は以下のスキームに従って判定するようにした(図1)。本スキーム確立前の入力箇所も後日再確認を行い、入力内容を見直した。

### C-2 専門家による試験結果の再評価

試験報告書確認とデータ入力と合わせて、国立衛研のAmes試験に通じた専門家による試験結果の再評価を行い、判定を確定させた。対象はClass A化合物628物質、Class B化合物が921物質、Class C化合物が16物質であった。内、それぞれ26、18、16物質の判定が変更された(表1)。再判定結果と、判定結果の理由を表3に示す。

最終化されたデータベースは、令和2年3月16日に2回目のAmes/QSAR国際共同チャレンジプロジェクト実施のアナウンスと共

に参加を希望するQSARベンダーに学習データとして提供された。

### C-3 Ames試験の実施とデータベースの改定

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等については実際に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・改良を行っている。表4は令和元年度に行った2つの化合物の特徴とAmes試験結果を示す。両化合物はハンセンデータベースに収載され、Ames試験陽性と評価されているが、詳細な試験報告書の入手はできなかった。2つともDerek Nexusでは陰性、Case Ultraでは既存の陽性(Known positive)とされている。この陽性はハンセンデータベースの結果を示しているものと推察される。しかしながら、Case UltraでのQSARによる陽性確率はそれぞれ、12.4%、11.3%と低く、陽性結果には疑問が残る。

Ames試験を実施したところ、bis(methoxyethyl)phthalate は *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA1537 並びに *Escherichia coli* WP2 uvrAの-S9において用量依存的、且つ再現性の高い陽性反応が観察され、陽性と判定された。最大比活性値は33.8 (TA98, -S9)であった。2',3',4'-trichloroacetophenone は *Salmonella typhimurium* TA100及び*Escherichia coli* WP2 uvrAの+S9において、用量依存的、且つ再現性の高い陽性反応が観察され、陽性と判定された。最大比活性値は13,306 (TA100, +S9)であった。以上のことから両物質のAmes変異原性が確認された。

### D. 考察

変異遺伝部で作成した 12,140 物質より成る安衛法 Ames 試験データベースについて、陽性が報告されている物質を中心に試験報告書を確認し、より詳細な試験条件をデータベースに追加入力した。確認の過程で誤りがあれば訂正、曖昧な反応については複数の専門家が確認し、判定を確定させた。最終的には 60 物質について判定が変更された (表 1)。

変更となった主な理由は、1) 単純な確認ミスに起因とすると思われ、これまでのデータベース記載のリストと試験報告書との食い違いがあったもの。2) 試験実施機関の判定基準が様々であるため、現在の判断基準に合っていないこと。3) 試験としての判定は陰性だが、QSAR 予測モデル開発の視点から陽性とするのが妥当と判断されたものがある。

1) は数多くのデータを取り扱う上でどうしても生じるものであり、多面的に確認していくことが重要である。当事者による確認には限界があり、継続的な (可能であれば第 3 者による) データのチェックが必要である。

2) については安衛法自体が 50 年に及ぶ歴史があり、試験に対する要求事項も変遷してきている。実際に昭和～平成初期の試験報告書を確認すると、データは 1 試験のみの記載で再現性や用量の妥当性がはっきりしないものが数多くあった。現行の安衛法ガイドラインは基本的には OECD TG471 と同等であるが、それでも試験機関毎に判定基準が異なることがしばしば認められ、特に欧米の試験機関はバックグラウンドのコロニー数が比較的少ない菌株 (*Salmonella typhimurium* TA1535 や TA1537 など) には、

日本で標準的な 2 倍よりも 3 倍以上のコロニー数増加でもって陽性と判断しているところが多い。もちろん安衛法の登録時に当局が審査し、日本の基準に基づいて判定しているが、改めて確認すると解釈が容易でないケースがしばしばあった。更にこれまでは (再現性と用量依存性を併せ) 概ね 2 倍以上のコロニー数増加の有無を陽性の判断基準としてきたが、近年の International Workshop on Genetic Toxicology Testing (IWGT) では、(例えば) 2 倍という基準を機械的に当てはめるのは必ずしも生物学的に妥当とは言えない、と議論されている (Levy *et al.*, 2019)。次に述べる QSAR 予測モデル開発の視点からも、より適切な陽性の判断基準は何かを絶えず自答していかなければならないと考える。

3) は、前回の国際共同チャレンジプロジェクトにて評価した 17 の QSAR 予測モデルの内、全て、あるいは 1 つ以外は全てのモデルが陽性と判定した陰性物質 (偽陽性物質) について試験報告書を確認し、陽性基準 (e.g. 2 倍以上のコロニー数増加) には達していないものの、再現性のある増加傾向が認められた場合は QSAR 開発の視点からは陽性と区分するのが妥当と判断したものである。近年の QSAR 予測モデルは、確かな根拠に基づいて開発され、予測性が大きく向上している。一方、実試験の Ames 試験は試験、あるいは実施機関によるバラツキがあり、必ずしも再現性が担保されたものではない。こうした背景を鑑みるに、QSAR 予測モデルの殆どが陽性と判断したことは妥当性の高い根拠があると考えられ、実試験においても一定の反応が認められれば、その物質を陽性と区分することに合理性が

ある。今後、更に QSAR 予測モデルのパフォーマンスが向上すれば、実試験よりも QSAR 予測結果が変異原性の判断において重要視される時代が来る可能性がある。本データベースでは陰性と判定された 9,129 物質の再評価がまだ残っている (表 1)。今後の課題である。

一方、安衛法以外のデータベースの整備も重要である。ハンセン、CGX、ECVAM 等の Ames 試験データベースが存在するが、多くのデータは古く、また詳細な試験報告書が無い場合も多くある。これらデータベースには基本的な化学構造を有する化学物質が多く収載されており、QSAR モデルの開発に重要である。今回、新たに 2 化合物について Ames 変異原性を確認した。更に試験化合物を増やすことによりケミカルスペースの拡大を目指す。

## E. 結論

12,140 物質からなる安衛法 Ames 試験データベースを再評価し、詳細化と精緻化を行った。さらに、他の既存の Ames 試験データベースの精緻化も行った。将来的にはこれらデータベースは統合され、ベンチマークデータセットとして QSAR モデルの開発と改良に利用されることを期待する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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—ICH-M7 を踏まえた遺伝毒性物質の許容値の設定に関する科学— *PHARM TECH JAPAN*. 2019, 35, 1461-1469.
- 2) 本間正充. 化学物質の遺伝毒性評価と定量的構造相関 ((Q)SAR) . *ポリ衛協*

会報. 2019, 65, 5-25.

- 3) 本間正充. 毒性試験の未来を考える — (定量的) 構造活性相関による化学物質の変異原性評価 — *国立医薬品食品衛生研究所報告*. 2019, 137, 20-31.
- 4) Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Frericks M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ. Genetic toxicology in silico protocol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019, Oct; 107:104403. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403. Epub 2019 Jun 11. PubMed PMID: 31195068.
- 5) Petkov PI, Kuseva C, Kotov S, Honma M, Kitazawa A, Kulkarni S, Schultz TW, Mekenyan OG. Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of evidences:

Application to Ames mutagenicity.

*Computational Toxicology*. 2019;12,  
doi.org/10.1016/J.COMTOX.2017.02.004

- 6) 本間正充. 食品中に混在する微量な化学物質の安全性評価— 一定量の構造活性相関 (QSAR) による変異原性化学物質の同定— *日本包装学会誌*. 2020, 29, 27-42.

2. 学会発表

- 1) Improvement of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) Tools for Predicting Ames Mutagenicity. Honma M. 第 47 回欧州環境変異ゲノム学会 (2019 年 5 月、フランス、レンヌ)
- 2) ICH-M7(医薬品中の DNA 反応性不純物の評価と管理)に関するガイドライン, 本間正充, 第 74 回 MMS 研究会定例会 (2019 年 6 月 京都)
- 3) 重大な発がん性物質は変異原性物質である。変異原性物質は *in silico* で予測できる。従って、発がん性物質は *in silico* で予測できる。本間正充, 第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019 年 6 月 徳島)
- 4) Ames/QSAR International Challenge Project. Honma M. 第 6 回アジア環境変異原学会、第 48 回日本環境変異原学会 (2019 年 11 月 東京)
- 5) 化学物質のヒト健康リスク評価に対する *in silico* アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第 47 回構造活性相関シンポジウム (2019 年 12 月 熊本)

G. 知的財産権の出願・登録状況

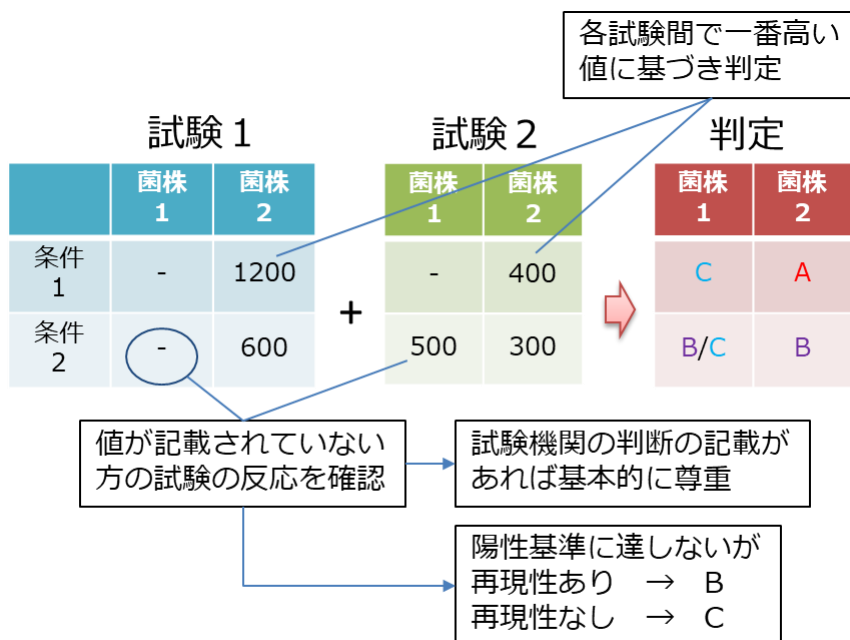
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表 1 安衛法 Ames 試験データベースの再評価のまとめ (令和 2 年 3 月現在)

	A	B	C	Total	Note
Original chemicals (I)	672	1085	10383	12140	
Study report unavailale (II)	44	164	1238	1446	
Re-evaluation possible (III= I-II)	628	921	9145	10694	
Re-evaluation completed (IV)	628	921	16	1565	
Re-evaluation has not be done (III-IV)	0	0	9129	9129	Re-evaluation will be continued.
Corrected	26	18	16		
Increase or decrease by correction	-23	15	2	-6	Not Assingend:6
New training data set (March 11, 2020)	649	1100	10385	12134	

表 2 入力したデータ例

Serial Id	ANEI No.	Registration No.	Ames Result	CAS#	Chemical Name	Structure	Mol Weight	Formula	ANEL Phase	Purity (%)	Solvent	-SR								+SR				
												TA100	TA1535	WPZuvA	T468	TA1537	TA100	TA1535	WPZuvA	T468	TA1537			
21594 (4) 988		2285	A	87269-99-6	N-(2-benzoyl-1-ethoxycarbonyl)ethylamine	<chem>CC(=O)OCC(=O)N(Cc1ccccc1)C</chem>	293.319	C19H19NO5	1	98.3	DMSO	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	
22284 (4) 992		2286	A	15121-89-8	3-benzoylacrylic acid ethyl ester	<chem>CCOC(=O)C=C(C(=O)O)c1ccccc1</chem>	204.225	C12H12O3	1	95.1	DMSO	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C



上記による判断が容易でない場合 → 専門家による確認

図 1 比活性表による判定スキーム (例)



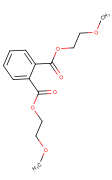
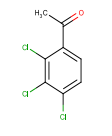
表3 再評価によって判定が変更された物質一覧

Serial Id	Registration No.	Result before review		Result after review	Reasons
2298	2477	A	→	B	It is weak response, which does not reach to class A.
2914	3193	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
3137	3326	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
3202	3327	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
3466	3711	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
4945	5378	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
5274	5835	C	→	A	5176 and 5274 exchanged the results incorrectly.
5176	5834	A	→	C	5176 and 5274 exchanged the results incorrectly.
6393	6738	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
8871	9321	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
10459	11048	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
12179	12810	A	→	B	It is weak response, which does not reach to class A.
12535	12996	C	→	A	The study report was positive, which reach to class A.
14751	15469	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
17469	18336	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
19136	20330	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
19398	20768	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
19330	20837	C	→	B	The study report was negative. But, weak and reproducible responses were confirmed by expert judgement.
2082	2234	A	→	NA	Non-organic, Gas-phase treatment. The result can not be assigned.
2484	2410	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
2362	2469	A	→	B	It is weak response, which does not reach to class A.
2472	2583	A	→	B	It is weak response, which does not reach to class A.
2434	2608	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
2466	2643	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
2696	2760	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
2732	2765	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
2695	2767	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
2763	2988	A	→	NA	Unorthodox protocol. The result can not be assigned.
2759	3022	A	→	B	It is weak response, which does not reach to class A.
2931	3207	B	→	NA	Ambiguous result. The result can not be assigned.
3319	3445	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
3223	3469	A	→	B	It is weak response, which does not reach to class A.
3130	3635	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
3497	3743	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
3669	3876	A	→	B	It is weak response, which does not reach to class A.
3643	3915	A	→	NA	Ambiguous result. The result can not be assigned.
3857	4146	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
3934	4161	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
4391	4740	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
4466	4749	A	→	C	The study report was positive. But, the response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
5161	5390	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
5252	5643	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
5683	5984	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
5676	6001	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
5924	6240	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
8161	8461	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
9837	10580	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
10154	10596	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
10373	11080	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
10951	11483	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
11884	12477	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
12143	12530	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
12263	13236	B	→	NA	Reactive mixture. The result can not be assigned.
15410	16274	A	→	C	15409 and 15410 exchanged the results incorrectly.
15409	16275	C	→	A	15409 and 15410 exchanged the results incorrectly.
16589	17471	A	→	B	It is weak response, which does not reach to class A.
16134	17623	B	→	NA	Lower purity, ambiguous result. The result can not be assigned.
18254	19589	B	→	C	The study report was positive. But, the weak response was confirmed to be meaningless by expert judgement.
22336	23970	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.
22628	24173	A	→	B	Gas-phase treatment. The result was positive, but cannot be classified to A.

NA: Not Assigned

Peach: Up-dated on '20 Mar 04  
Aqua: Up-dated on '19 Sep 25

表 4 2 化合物の Ames 試験結果

Id	Structure	Mol Weight	CAS#	Chemical_name	Hansen Ames result	Derek NX result	reasoning overview	Case Ultra GT1_BMUT result	CASE Ultra GT1_BMUT Probability (%)	Ames結果	結果詳細
5864		282.292	117-82-8	bis(methoxyethyl)phthalate	Positive	INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Known Positive	12.4	陽性	<p>本被験物質は代謝活性化非存在下のSalmonella typhimurium TA98及びTA1537並びにEscherichia coli WP2 uvrAにおいて、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超え、かつ陰性対照の平均値の2倍以上に増加させた。また、その増加に用量反応性が認められ、用量設定試験及び本試験により、試験結果の再現性が確認された。最大比活性値は、本試験における代謝活性化存在下のSalmonella typhimurium TA98において、33.8 (5000 µg/plate)を示した。</p> <p>一方、陽性対照は、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、全ての試験において背景データの変動範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある要因についても、何ら認められなかった。</p>
6336		223.48	13608-87-2	2,3,4-trichloroacetophenone	Positive	INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Known Positive	11.3	陽性	<p>本被験物質は代謝活性化存在下のSalmonella typhimurium TA100及びEscherichia coli WP2 uvrAにおいて、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超え、かつ陰性対照の平均値の2倍以上に増加させた。また、その増加に用量反応性が認められ、用量設定試験、本試験及び確認試験により、試験結果の再現性が確認された。最大比活性値は、本試験における代謝活性化存在下のSalmonella typhimurium TA100において、13306 (9.77 µg/plate)を示した。</p> <p>一方、陽性対照は、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、全ての試験において背景データの変動範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある要因についても、何ら認められなかった。</p>

平成 31 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

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	笠松 俊夫	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部	研究員
研究協力者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所	副所長
研究協力者	Petko Petkov	ブルガス大学 数理化学研究所	研究員
研究協力者	Hristiana Ivanova	ブルガス大学 数理化学研究所	研究員
研究協力者	Elena Kaloyanova	ブルガス大学 数理化学研究所	研究員
研究協力者	Ovanes Mekenyan	ブルガス大学 数理化学研究所	教授

研究要旨

*In silico* による *in vivo* 遺伝毒性予測技術の高度化・実用化を図るため、*in vitro* と *in vivo* で遺伝毒性試験結果が異なる物質に着目し、その差異となる要因を解析して、それらの知見を反映した遺伝毒性予測モデルの構築を目指した。*In vitro* の Ames 試験陰性でかつ *in vivo* げっ歯類トランスジェニック動物突然変異 (TGR) 試験陽性、あるいは *in vitro* 染色体異常 (CA) 試験陰性でかつ *in vivo* 小核 (MN) 試験陽性と報告されている物質の内、前年度にデータの妥当性が検証された Ames(-)/TGR(+) の 4 物質、CA(-)/MN(+) の 12 物質に関して、代謝に関する文献データを収集し、代謝マップを作成した。それぞれの物質について *in vitro/in vivo* の代謝の差異をもたらす要因を検証したところ、主な要因として、1) 代謝酵素の発現、2) 試験における暴露時間、が挙げられた。これらの知見を活用して代謝シミュレーションシステム (Tissue Metabolism Simulator System: TIMES) の改良に取り組んだ。現行の TIMES 遺伝毒性予測モデルは、データベースの代謝情報に発生確率を割り当てているが、速度論的因子は考慮されていない。今回、*in vitro* 陰性・*in vivo* 陽性の差異には試験の暴露時間が重要な因子であることが浮き彫りになったことから、代謝シミュレーションに速度論的因子を導入し、新しいモデリングを構築中である。

A. 研究目的

近年、*in vitro* 遺伝毒性試験、特に Ames 試験結果に対する *in silico* 予測モデルの開発が進み、(医薬品規制調和国際会議) ICH の M7

ガイドラインでは、遺伝毒性の判定に *in silico* 手法を用いることが許容されるなど、高い精度で遺伝毒性を予測することが可能

になってきている。

この*in silico*予測手法の発展を、より精緻な*in vivo*遺伝毒性、ひいてはヒトの健康影響の予測に繋げていくには、化学物質の遺伝子への反応性を理解するに留まらず、臓器特異性や評価物質に起こる代謝の種類やそのレベルの相違を理解し、それらの知見を反映させる仕組みが必要である。

本研究では*in vitro*と*in vivo*の代謝の違いが予測結果に与える影響に着目する。一般に*in vitro*遺伝毒性試験では、げっ歯類の肝ミクロソーム画分(S9)に補酵素を添加した代謝活性化系が用いられるが、必ずしも生体で起きる代謝を十分に反映しているわけではない。代謝酵素(特に第2相)発現の不足/欠損、また生体と比較した場合の代謝レベルの相違が*in vivo*とは異なる結果をもたらす可能性がある。

そこで*in vitro*遺伝毒性試験陰性で*in vivo*遺伝毒性試験が陽性となる物質について、これら物質の*in vitro/in vivo*代謝情報を収集、分析することで、*in vivo*特異的陽性の要因を把握する。こうして得られた*in vitro/in vivo*の代謝の違いに関する知見を代謝予測シミュレータTIMESに反映させ、Mode of Action (MoA)に基づく精緻な*in vivo*遺伝毒性予測を可能にすることを目的とした。

## B. 研究方法

まず*in vivo*特異的陽性物質を抽出する上で、利用する実データの妥当性・適切性が重要となるため、平成30年度は、既存の各種データベースから*in vitro* 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) 陽性となっている物質、及び*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物質を探索し、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。その結果、Ames陰性/TGR陽性物質は3物質 (Cyproterone acetate、Tamoxifen、Oxazepam)、*In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質は12物質 (Thioacetamide、1,1,2,2-Tetrachloroethane、CI Solvent yellow 14、C.I. Direct black 38、Urethane、Chlordiazepoxide、Procabazine hydrochloride、Diazepam、Atrazine、Amphetamine、Dimethylvinyl chlorideおよびSalicylazosulfapyridine) が今後の本研究に活用すべきデータとして抽出された\*。

本年度は、これらの物質について代謝情報を収集し、代謝マップを作成、*In vitro/in vivo*の代謝の差異をもたらす要因を検証した。その結果、主な要因として、1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の暴露時間、が浮かび上がった。Ames陰性・TGR陽性物質、*in vitro* CA陰性・*in vivo* MN陽性物質について、どのような要因で説明できるケースかを整理し、得た知見を基に*in silico*遺伝毒性予測モデル(TIMES)の改良を試みた。

\*新たに実施された遺伝毒性試験情報より、Ames陰性/TGR陽性物質として、Methyl eugenolを追加、計4物質とした。

(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*陰性・*in vivo*陽性の要因

平成30年度に試験データの妥当性を確認したAmes陰性/TGR陽性の4物質、*In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性の12物質について代謝に関する文献データを検索し、代謝マップ

の作成に十分な代謝情報を得た。代謝マップを作成し、*in vitro*陰性・*in vivo*陽性となった主な要因について検証すると1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の暴露時間、が挙げられた(表1A、1B)。

*In vitro*と*in vivo*の系における代謝酵素発現の違いは遺伝毒性の原因となる活性体(アラート構造)の出現の差異をもたらす可能性があり、また試験における暴露時間が異なると*in vitro*及び*in vivo*で生じる代謝産物の量が影響を受け、最終的に試験結果に影響を及ぼす可能性がある。今回検証したほとんどの物質における*in vitro*陰性・*in vivo*陽性となった要因は、「代謝酵素の発現」の差異に関連していると考えられた。

### C-2 Ames陰性/TGR陽性物質

Ames陰性/TGR陽性の4物質の内、3物質(Methyl eugenol、Cyproterone acetate、Tamoxifen)では*in vitro*と*in vivo*の系における代謝酵素発現の違いが*in vitro*と*in vivo*の試験結果の矛盾に繋がっていると考えられた。*In vivo*の系では第2相の硫酸転移酵素(SULT)の活性が高いことが、これら物質の*in vivo*TGRデータが陽性であることの原因とされる。

例えば、Methyl eugenolは、SULTの働きにより反応性の高い求電子物質が産生され、遺伝毒性を示すが、*in vitro*ではSLUTの発現が不十分なため、Ames試験では陰性となると考えられる。Ames試験においても、SULTの発現を補うと陽性結果が得られることが報告されている。これらの知見をもとにTIMESで、*in vitro*及び*in vivo*でのMethyl eugenolの代謝をシミュレーションしたところ、文献情報と一致する代謝マップが得られた(図1A、1B)。Methyl eugenolの*in vivo*代

謝マップに存在する第2相反応の代謝物(囲み)は、*in vitro*では得られない。この反応性代謝物が*in vivo*TGR試験結果が陽性であることの原因であり、TIMESによる*in vivo*TGR試験の予測が陽性であることと一致する。

### C-3 *In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質

*In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質については12物質中8物質が、それぞれの系における代謝酵素発現の違いにより、矛盾する試験結果を得たものと考えられた。*In vitro/in vivo*間の代謝物の安定性の違いや第1相代謝物の一部が*in vivo*代謝系に特異的であることが、これら物質の*in vivo* MNデータが陽性であることの原因と考えられる。

例えば、C.I. Direct black 38は*in vivo* MN試験結果が陽性であるが、これは*in vivo*特異的な反応性代謝物である4-aminobiphenylを生成するためである(図2)。*In vitro*ではげっ歯類肝ミクロソームS9代謝系のアズレダクターゼ酵素活性が低いために、この代謝産物が生成せず、*in vitro* CA試験が陰性という結果に繋がっていると考えられる。

### C-4 遺伝毒性試験の暴露時間

一方で、一部の物質については、*in vitro*陰性・*in vivo*陽性となった要因は、「遺伝毒性試験の暴露時間」の差異に関連していると考えられた。OECDガイドラインによれば*in vitro*のAmes試験及びCA試験の代謝活性化条件での暴露時間はそれぞれ48時間、6時間である。一方、*in vivo*TGR試験は動物への反復投与試験であり、28日間の連日投与を伴う。*in vivo* MN試験については末梢血を対象とした場合、単回投与後の試料採取は最大72時間が許容されている。このように*in vivo*遺伝毒性試験の方がより試験期間が長く、さらに*in vivo*では第1相水酸化反応が顕著で

あるため、代謝物による酸化的遺伝子損傷が起こりやすい。

例えば、*in vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質であるジアゼパムは、標的臓器の骨髄で有意な活性酸素種の生成が報告され、酸化ストレスが*in vivo*陽性結果の原因と示唆される。*In vitro*試験では暴露時間が短いため、このような持続的なストレスが起こらず陰性結果が得られたと考えられる。

こうして収集した遺伝毒性試験結果と対応する代謝情報をTIMESに反映させると同時に、今回明らかとなった*in vitro*陰性・*in vivo*陽性となる要因の一つ、「遺伝毒性試験の暴露時間」を反映すべく、代謝シミュレーションに速度論的因子を導入することを検討した。

#### C-5 代謝シミュレータへの速度論因子の導入

TIMESはトキシコキネテックスとトキシコダイナミクスとを組み合わせる単一のモデリングプラットフォームとしたソフトウェアであり、トキシコキネテックス部分では代謝情報に基づく代謝物の予測が行われ、トキシコダイナミクス部分である毒性メカニズムに基づく警告構造（アラート）と照合される。その結果、親化合物、親化合物と代謝物、または代謝物のみが遺伝毒性を示す（あるいは示さない）と判定される。現行のTIMESでは代謝物の予測に速度論的な概念が含まれていない。これまでに収集した代謝情報から、起こり得る（酵素的反応と非酵素的反応から成る）生体内変換反応をリスト化（変換表）し、各変換反応に対して、文献情報や専門家知識また実験データを再現できるように計算された発生確率が割り当てられる。

3,3-Dimethyl-1-(4-methylphenyl)triazene をモデル化合物として、この発生確率を実験で求められた速度論的データを用いて再評価した。遺伝毒性試験の暴露時間も考慮した時間の関数とし、シミュレーションを行った結果を図3A, 3Bに示す。代謝マップ自体は非速度論的なシミュレーション（図3A）と速度論的なそれ（図3B）とよく似ているが、唯一の違いは速度論的なシミュレーションで見出されたDNA付加体の生成（図3Bにて強調表示）である。このDNA付加体の生成が遺伝毒性試験での陽性原因となると考えられるが、最終的に陽性に至るかどうかの判定には生成量も加味しなければならず、陽性となる閾値を設定する必要がある。このモデルリングについては、各種データと突き合わせて整合性を確認し、適用化合物を広げるべく、引き続き検討中である。

#### D. 考察

*In vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して代謝マップを作成した結果、1) 代謝酵素の発現、と2) 遺伝毒性試験の暴露時間、の相違が浮かび上がった。*In vitro*の代謝活性化（げっ歯類肝ミクロソームS9）系に、代謝酵素、特に第2相代謝酵素の発現が不足、あるいは欠如していることが知られていたが、*In vitro*陰性・*in vivo*陽性の原因となることが改めて確認された。今回実施したような信頼性の高い*In vitro/in vivo*遺伝毒性試験のデータの収集と検証を通じて、*in vivo*特異的な代謝活性化を受けやすい物質や構造が特定されれば、*in silico*手法による予測性の向上に繋がることが期待できる。

*In vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異のもう一つ

の主因、遺伝毒性試験の暴露時間の相違については、現行の*in silico*遺伝毒性予測モデルに速度論的視点を取り入れた改良の必要性を認識させた。試験プロトコル上の暴露時間の違いによって陽性・陰性が分かれるのは、本来、本質的な問題ではないのかもしれないが、この課題をきっかけに速度論的な考えを取り込んだ精緻なシミュレーションができるようになることが、将来ヒト健康リスクを評価する際、対象物質への暴露形態や期間に合わせて臨機応変な予測をする上で役立つはずである。現在、代謝物の生成を時間軸でシミュレートできるようモデリングを進めている。(代謝物を含む) 遺伝毒性物質がDNAやタンパク質などの標的分子と結合し、その結合量が一定量以上になると遺伝毒性を示すと考えることができることから、この一定量を閾値として遺伝毒性の有無を予測するモデルを、まず*in vitro*のAmes/CA試験について、その次に*in vivo*のTGR/MN試験について開発できるよう検討を進めている。

## E. 結論

*In vivo*遺伝毒性予測性の向上へ向けて*in vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して代謝マップを作成し代謝の差異を検証したところ、主な要因として、1) 代謝酵素の発現と2) 遺伝毒性試験における暴露時間、の相違が浮かび上がった。得られた知見を基に代謝シミュレータTIMESの改良を図り、*in vivo*特異的な代謝を反映できるようにすると同時に、速度論的因子を導入した新しいモデリングを構築中である。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - 1) StarDropを活用した香料化合物の*in silico*遺伝毒性評価の試み, 笠松俊夫, 北澤愛莉, 田島澄恵, 金子昌弘, 本間正充, 第6回アジア環境変異原学会/日本環境変異原学会第48回大会 合同大会 (2019年11月 東京)
  - 2) 化学物質のヒト健康リスク評価に対する*in silico*アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第47回構造活性相関シンポジウム (2019年12月 熊本)
  - 3) Improvement of Ames test database for developing QSAR prediction models. Kasamatsu T, Kitazawa A, Sugiyama K, Suzuki T, Honma M. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology (March 2020, Anaheim, USA)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表 1A *In vitro/in vivo* の試験結果差異の検証 (Ames 陰性/TGR 陽性物質)

#	CAS	Chemical name	<i>in vitro</i> Ames data	<i>in vivo</i> TGR data	Factor affecting metabolic difference
1	10540-29-1	Tamoxifen	Negative	Positive	Enzyme expression
2	427-51-0	Cyproterone acetate	Negative	Positive	Enzyme expression
3	93-15-2	Methyl eugenol	Negative	Positive	Enzyme expression
4	604-75-1	Oxazepam	Negative	Positive	Durations of tests

表1B *In vitro/in vivo* の試験結果差異の検証 (*In vitro* CA陰性/*in vivo* MN陽性物質)

#	CAS	Chemical name	<i>in vitro</i> CA data	<i>in vivo</i> MNT data	Factor affecting metabolic difference
1	62-55-5	Thioacetamide	Negative	Positive	Enzyme expression
2	79-34-5	1,1,2,2-Tetrachloroethane	Negative	Positive	Enzyme expression
3	51-79-6	Urethane	Negative	Positive	Enzyme expression
4	1937-37-7	C.I. Direct black 38	Negative	Positive	Enzyme expression
5	58-25-3	3H-1,4-Benzodiazepin-2-amine,7-chloro-N-methyl-5-phenyl-,4-oxide	Negative	Positive	Enzyme expression
6	513-37-1	2,2-dimethylvinyl chloride	Negative	Positive	Enzyme expression
7	599-79-1	Sulfasalazine	Negative	Positive	Enzyme expression
8	366-70-1	Procarbazine hydrochloride	Negative	Positive	Enzyme expression
9	439-14-5	Diazepam	Negative	Positive	Durations of tests
10	1912-24-9	Atrazine	Negative	Positive	Durations of tests
11	300-62-9	Amphetamine	Negative	Positive	Durations of tests
12	842-07-9	1-Phenylazo-2-naphthol (CI Solvent yellow 14)	Negative	Positive	Durations of tests



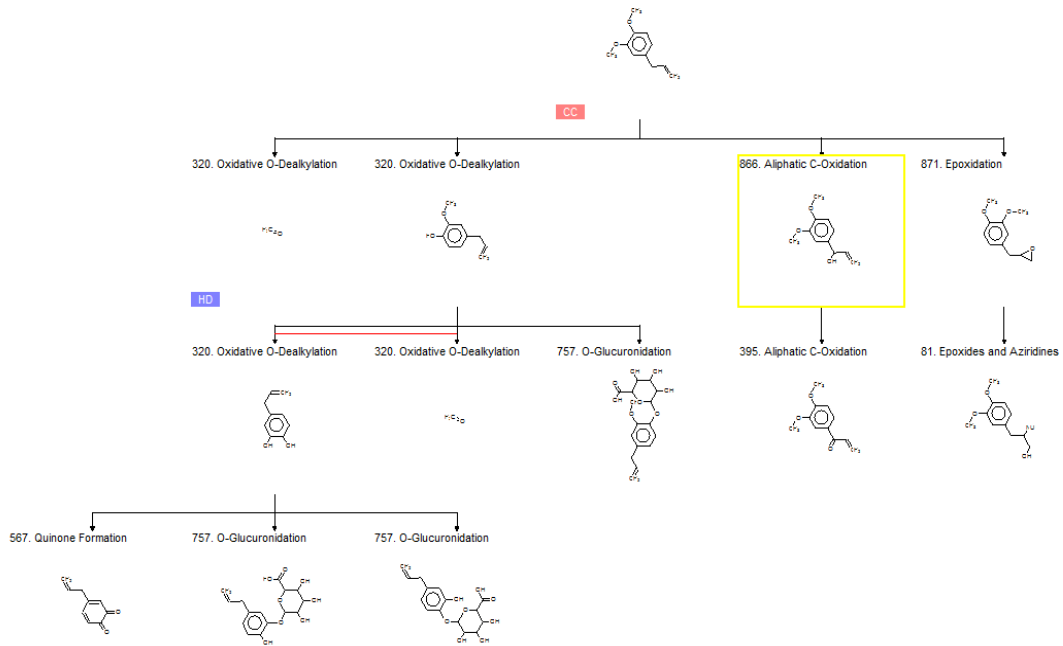


図1A *In vitro*におけるMethyl eugenolのラットS9/マイクロソーム代謝マップのシミュレーション

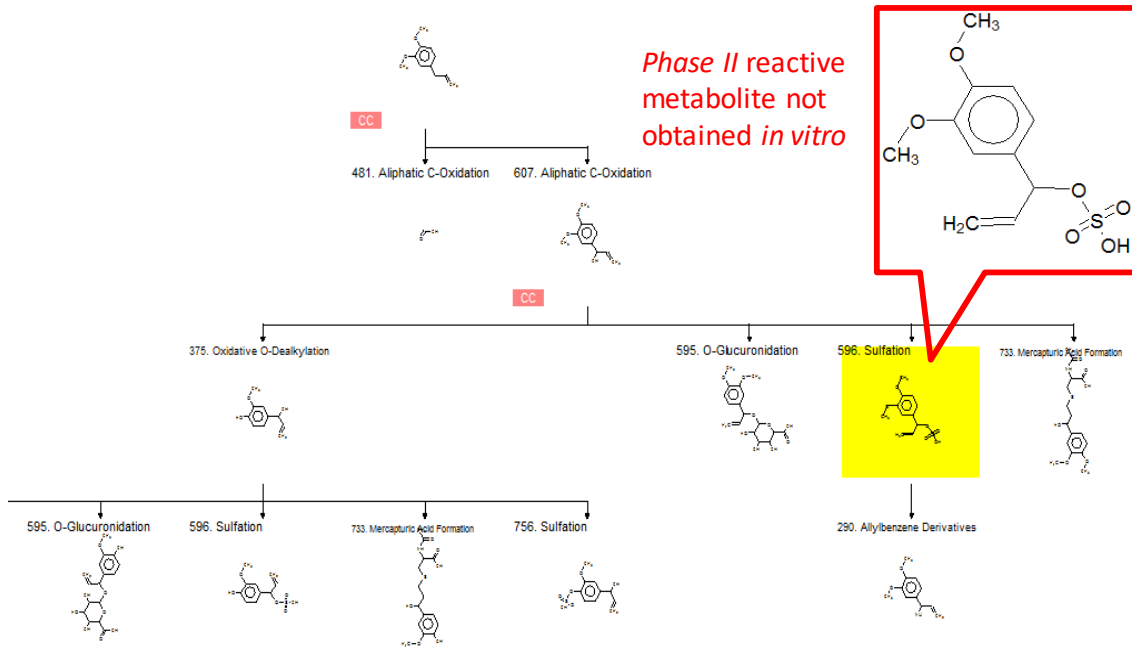


図1B *In vivo*におけるMethyl eugenolの代謝マップのシミュレーション

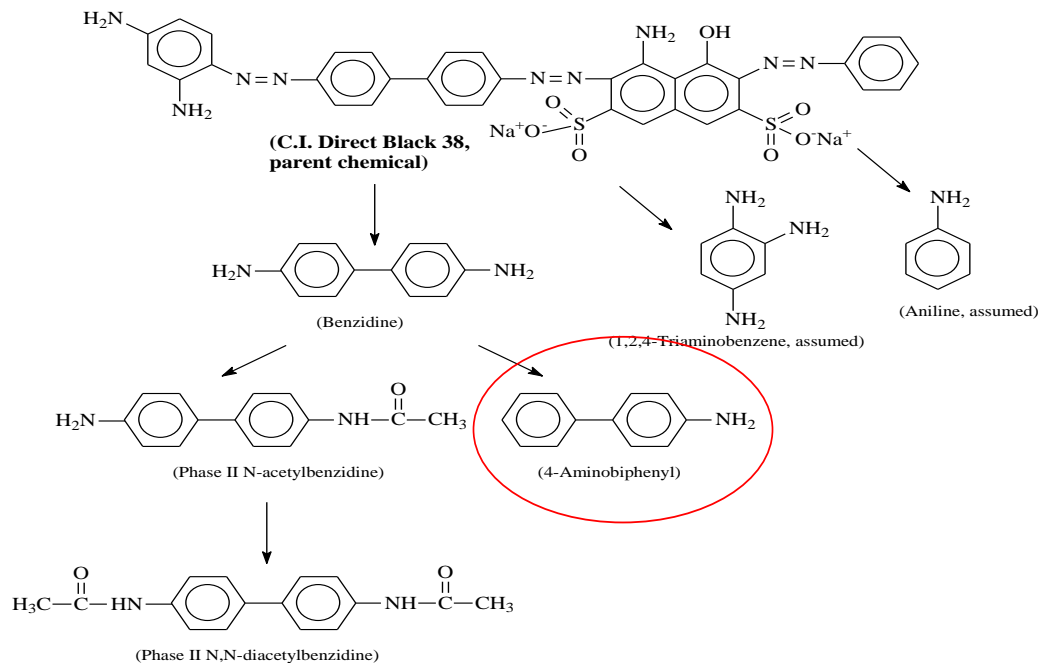


図2 ハムスターにおける C.I. Direct black 38 の代謝系路

### Non-kinetics metabolic simulator

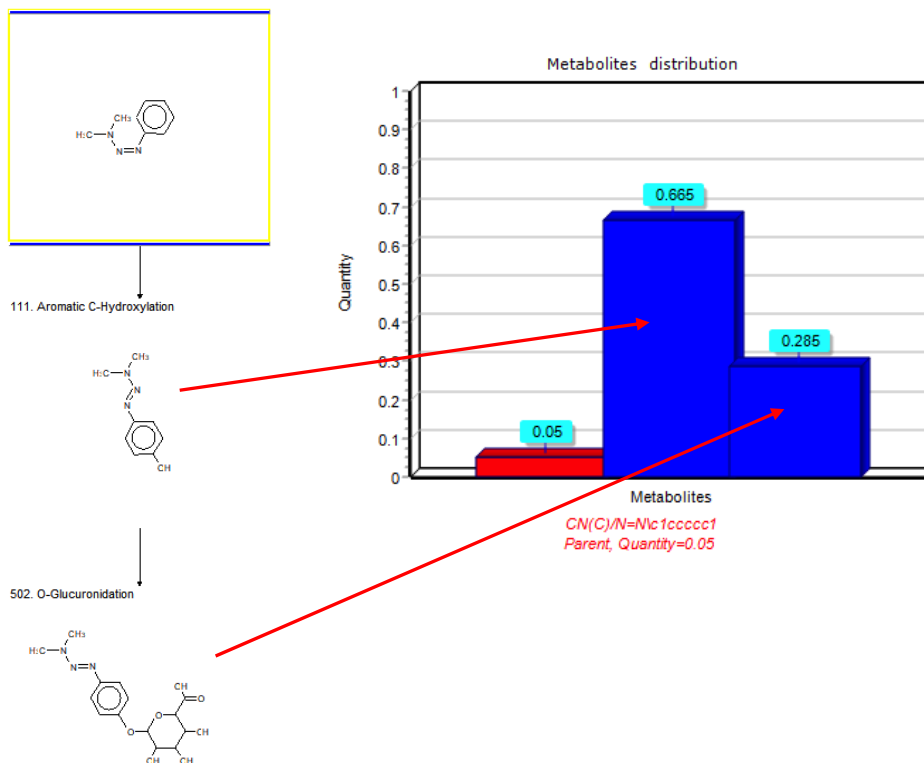


図3A 非速度論的な *in vitro* 肝 S9 代謝シミュレータによるシミュレーションにおける 3,3-Dimethyl-1-(4-methylphenyl)triazene の親化合物と代謝物量

## Kinetics metabolic simulator

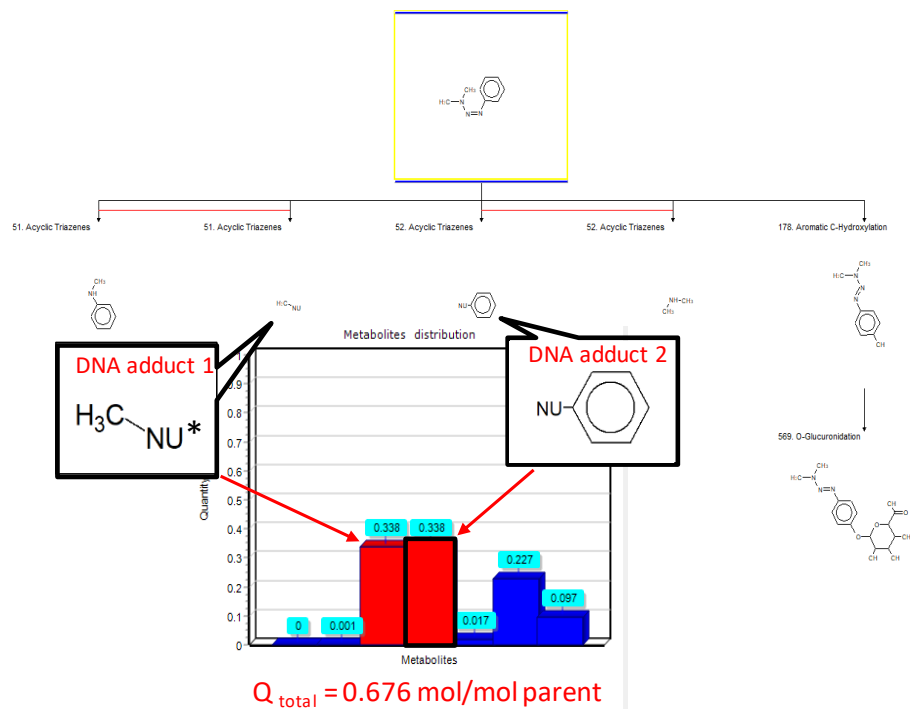


図 3B 速度論的な *in vitro* 肝 S9 代謝シミュレータによるシミュレーションにおける 3,3-Dimethyl-1-(4-methylphenyl)triazene の親化合物と代謝物量 (Nu は求核剤)

平成 31 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

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	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	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	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	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	井上 美香	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	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、インシリコ手法の高度化と実用化に基づいた評価ストラテジー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。神経毒性は有害性評価における重要な毒性エンドポイントのひとつであるが、機序に基づき多様な物質をカバーする毒性予測モデルはこれまでほとんどない。そこで本研究では、国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を選抜し、毒性専門家のレビューによる確認後にその神経毒性機序情報を集積することにより、化学物質に対する神経系の選択的な脆弱性を体系的に整理した。さらに、化学構造と毒性機序に基づいて神経毒性物質をグループ化し、類似物質の情報を取り入れてその領域を定義して、OECD QSAR Toolbox のカテゴリープロファイラーに実装することにより、神経毒性を予測・評価するカテゴリーアプローチを適用するための基盤を構築した。

A. 研究目的

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、今後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している。今年度は、神経毒性を対象に、カテゴリーアプローチを適用するための基盤を構築する。神経毒性は、有害性評価における重要なエンドポイントの一つである。化学物質審査規制法の有害性評価では、神経毒性影響が認められる場合にはその重篤性を考慮して有害性評価値を算出する際に不確実係数が追加される。詳細な神経毒性試験が実施されることは限られており、神経毒性は反復投与毒性試験の結果に基づいて評価されることが多い。しかし、その限られた測定項目から神経毒性影響を評価するのは困難である場合が多いとされる。評価支援ツールとしての既存の毒性予測モデルは、肝毒性などに対して開発・改良が精力的に進められているが、神経毒性にはほとんど対応できていない。したがって、神経毒性のカテゴリーアプローチを確立することは、類似物質の試験データや想定される機序を含めた統合的なヒト安全性評価のサポートや評価の一貫性の担保のために重要である。構築したカテゴリーをその根拠となった毒性データベースとともに OECD

QSAR Toolbox などを実装することにより、リードアクロスによるデータギャップ補完も含めて評価の効率化・精緻化に寄与すると期待される。

そこで、昨年度構築した国内外で公開されている反復投与毒性試験データを統合したデータベースを活用して神経毒性物質を選抜し、毒性専門家のレビューの後、化学構造と毒性機序に関する情報の収集と解析を行ってカテゴリーを構築し、OECD QSAR Toolbox のカテゴリープロファイラーに実装出来るようその領域を定義した。

## B. 研究方法

国内外で公開されている信頼性の高い化学物質の反復投与毒性試験データ (HESS、COSMOS、ToxRef、RepDose、食品健康影響評価書等、総計約 2,500 物質) を統合した反復毒性試験統合データベース (新規化学物質は除く) から、病理組織学的に神経系 (中枢又は末梢) に何らかの異常が見られている物質、および神経系に対する影響の可能性があると考えられる一般状態の変化を有する物質を選抜した。この中から、死亡例あるいは死亡用量でのみ変化の見られているものや、流涎、自発運動低下など他の要因でも生じる不明瞭な変化しか発現していないもの、神経組織の色素沈着や空胞化など軽度な組織変化が記載されているにもかかわらず一般状態に変化の見られていないものを対象から外した。選抜した物質について、PubMed、Google、PubChem 等の検索エンジンを用いて、*in vivo* における神経影響に関する文献や国内外のリスク評価書及び神経毒性の機序に関する文献を収集・精査した。毒性発現とリンクする測定可能なキーイベ

ントと部分化学構造を推定するとともに、関連物質の情報からカテゴリーの構造領域を考察した。

(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 統合データベースから選抜した神経毒性物質

平成 30 年度までに統合化した毒性データベース(公開毒性データ 2,500 物質相当)から、神経毒性影響を引き起こす物質を選抜した。病理組織学的に神経系(中枢および末梢)に異常が見られた物質数は 23 であった。病理組織学的な変化はないが、神経系に対すると思われる一般状態の異常が見られた物質は、HESS および食品健康影響評価書の毒性情報のレビューにより、約 1,200 物質から 70 物質が得られた。その化学構造を比較解析することにより、神経毒性と潜在的に関連性を有する可能性がある部分構造をケモタイプとして抽出した(図 1)。神経毒性物質は、その物質数に対して構造的多様性が大きいことを示唆している。

### C-2 神経系に病理変化を発現した物質とその想定される機序およびカテゴリーの構築

チオフェン(CAS: 110-02-1)は小脳に壊死を引き起こす。医薬品開発における忌避構造として知られており、肝臓ではシトクロム P450 (P450) によって酸化され、毒性代謝物が生成する(Dansette *et al.*, 1992)。P450 が発現する小脳でも肝臓と同様の代謝活性化を受け、壊死を引き起こすと考えられている。またチオフェン誘導体の構造を持つ医薬品等においても同様の代謝活性化

が報告されており、神経系に毒性発現する可能性があると推測される(Cohen *et al.*, 2017)。

1,2-ジクロロエタン(107-06-2)は、小脳壊死を引き起こす。当物質は P450 により酸化的に代謝される経路と Glutathione S-transferase (GST) による GSH 抱合を経る経路があることが報告されている(Jean *et al.*, 1992)。生じた反応性代謝物は生体高分子と付加体を形成し、肝毒性が発現すると考えられている。P450 や GST が発現する小脳においても同様の機序が推測される。また GSH の枯渇による酸化ストレスも毒性発現に寄与すると提唱されている(Zhang *et al.*, 2019)。同鎖長の Cl 以外のハロゲン置換体も同様の機序で毒性発現すると考えられる。1-クロロ 3-ブロモプロパン(109-70-6)は中枢神経系の特に海馬において病理組織学的変化を引き起こす。その類似物質である 1-ブロモプロパン(106-94-5)は、海馬や小脳に毒性影響を引き起こし、その機序の一部として GSH の枯渇による酸化ストレス誘導やタンパク質のスルフヒドリル(SH)基の酸化などが提唱されている(Wang *et al.*, 2002)。1-クロロ 3-ブロモプロパンも GSH 抱合を受けると考えられることから同様の機序が関与する可能性がある(Jones and Welis, 1981)。また同鎖長の種々のハロゲン置換体も同様の機序で神経系に毒性発現するポテンシャルを有すると考えられる。

ベンジルアルコールは海馬歯状回に壊死を引き起こす。代謝されて生じるベンズアルデヒドは、Glutathione Peroxidase を効率的に阻害することによって、活性酸素分子種(ROS)産生を誘導する(Tabatabaie and Floyd, 1996)。ベンズアルデヒドは、トルエン暴露による中枢神経系の ROS 産生のトキ

シカントとして関わっている強い証拠がある (Mattia *et al.*, 1993)。ベンズアルデヒドの類似物質であるフェニルアセトアルデヒドも同酵素活性をやや弱いながら阻害する (Tabatabaie and Floyd, 1996)。以上より、代謝によりベンジルアルコールまたは $\alpha$ -ヒドロキシエチルベンゼンを生成する物質は神経毒性ポテンシャルを有すると考えられる。

ニトロベンゼン (98-95-3) は、小脳において海綿状病変を引き起こす。精巣毒性や血液毒性と比較して、中枢神経系への毒性機序はほとんど調べられていない。構造類似の 1,3-ジニトロベンゼンは、小脳に病理組織学的変化を引き起こす。中枢神経毒性のモデル物質として、ニトロ基の還元を介した代謝活性化 (Romero *et al.*, 1995, Hu *et al.*, 1997)、ROS 産生 (Ray *et al.*, 1992, Romero *et al.*, 1995, Hu *et al.*, 1999)、細胞内タンパク質の酸化的損傷などを引き起こすことが示されている。ニトロベンゼンの還元的代謝は肝臓や精巣で認められていることから、1,3-ジニトロベンゼンと部分的に類似した神経毒性機序を持つ可能性がある。

アクリルアミド (79-06-1) は主に末梢神経系で軸索変性を引き起こす。アクリルアミドは弱い求核剤であり、神経タンパク質の SH 基と反応することが知られている (LoPachin *et al.*, 2012)。一つの機序として、座骨神経細胞の軸索における微小管輸送システムおよび神経末端における小胞膜融合に係るタンパク質への作用と機能障害が示唆されている (Harris *et al.*, 1994)。統合データベース中のアクリルアミド誘導体 (79-39-0, 924-42-5) でも類似した神経毒性症状が認められており、短鎖の N-アルキル置換体を含

めて類似のメカニズムが介在すると考えられる。

毒性機序を精査したものの不確実性がやや大きいと考えられた神経毒性カテゴリー/物質を以下に列挙する。エマメクチン (155569-91-8) は、脳/脊髄神経細胞の空胞化、脊髄/座骨神経の変性を引き起こす。マクロライド系物質は、主にイオンチャンネル型 GABA 受容体を活性化するエビデンスが数多くある。ツジヨン (76231-76-0) は、脳においてうっ血・出血を引き起こす。近年の研究では、ツジヨンとイオンチャンネル型 GABA 受容体との相互作用が確認されている (Hold *et al.*, 2000)。リン酸トリス(2-クロロエチル) (115-96-8) は、中枢神経系で壊死を引き起こす。高用量で投与した場合、脳コリンエステラーゼを阻害する。またリン酸トリメチル (512-56-1) もコリンエステラーゼ阻害を示す。亜リン酸トリメチルは、神経障害標的エステラーゼの阻害活性が報告されている。しかし、神経伝達系のチャンネルへの作用や酵素の可逆的な阻害が神経細胞の不可逆的な病理組織学的変化につながるかどうかは不明な点が残る。ジエタノールアミン (111-42-2) は中枢および末梢神経繊維の変性と脱ミエリン化を引き起こす。ジエタノールアミンの暴露により種々の細胞のコリン代謝が攪乱されることが *in vitro* で示されている。しかし、コリン代謝攪乱が *in vivo* における病理組織学的変化に寄与しているかについて十分な証拠は不足していると考えられた。

### C-3 神経系への影響と考えられる一般状態の変化を引き起こす物質とその想定される機序およびカテゴリーの構築

ジトルイルグアニジン (97-39-2) は、経

口投与 30 分後から振戦、自発運動低下、緩徐呼吸を引き起こす。ジフェニルグアニジン (102-06-7) は、試験データに基づく神経毒性の判定では *equivocal* としたが、高用量で類似した症状が観察される。ジフェニルグアニジンをリード化合物とした構造活性相関研究から、ジフェニルグアニジンのシリーズは抗てんかん活性を持つ  $\text{Na}^+$ チャンネルブロッカーとして報告されている (Reddy *et al.*, 1998)。テトロドトキシンやサキシトキシンのようなグアニジン構造を持つ天然毒素も神経の  $\text{Na}^+$ チャンネルを可逆的に阻害することがよく知られている。グアニジン構造を持つ化合物には種々の生物活性が報告されていることに留意する必要はあるが (Saczewski and Balewski, 2009)、多様なグアニジン化合物が  $\text{Na}^+$ チャンネル阻害を介した神経毒性ポテンシャルを有する可能性がある。

1,4-ブタンジオール (110-63-4) 暴露により、昏睡、自発運動低下などが観察される。1,4-ブタンジオールは、生体内で連続した酸化反応により  $\gamma$ -hydroxybutyric acid に変換され、中枢神経系の  $\text{GABA}_B$  受容体に拮抗的に作用することを示す数多くの証拠がある (Carai *et al.*, 2002)。代謝されて 1,4-ブタンジオール、 $\gamma$ -hydroxybutyric acid を生成する物質は昏睡作用のポテンシャルを持つと考えられる。

本研究で解析に用いた統合データベースは食品安全委員会の食品健康影響評価書由来の農薬の反復投与毒性試験データが含まれている。カーバメート系殺虫剤はアセチルコリンエステラーゼ (AChE) を可逆的に阻害すること、有機リン系殺虫剤は AChE を不可逆的に阻害することはよく知られて

いる。

ベンゼンスルホンアミドおよびその環アルキル置換体 (98-10-2, 88-19-7) は、経口投与 15 分後から活動性低下が観察される。 $\text{SO}_2\text{NH}_2$  部分と炭酸脱水酵素 (Carbonic Anhydrase; CA) の  $\text{Zn}^{2+}$  とスレオニン残基の間の相互作用を通じて CA と複合体を形成し、CA 酵素活性を可逆的に阻害する (Supuran, 2007)。CA は脳内において  $\text{CO}_2$  と  $\text{HCO}_3^-$  の相互変換を触媒することによってこのバランスを積極的に制御し、適切な pH の維持に関わっている。いくつかの臨床的に成功した抗てんかん薬が効果的な CA 阻害活性を示している (Bhushan Mishra *et al.*, 2018)。CA 阻害をターゲットとした構造活性相関研究 (Khadikar *et al.*, 2005) から、幅広いベンゼンスルホンアミド誘導体は CA 阻害を介して、様々な神経生理学的/神経病理学的影響を引き起こすと考えられる。

クロロフェノールの暴露により振戦、痙攣や中枢神経系の depression などが観察される。クロロフェノールは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の脱共役作用を示す数多くの報告がある。クロロフェノールの酸化的リン酸化の脱共役は塩素化の増加と共に増大すると考えられている (ATSDR, 1999)。2,4-ジニトロフェノールもミトコンドリアの脱共役作用により中枢系に抑制的影響を示すことが知られている (ATSDR, 2019)。他のニトロフェノール誘導体も同様の作用を持つと推測される。

欧州化学品庁 ECHA は、2017 年に有機溶剤の麻酔作用と神経毒性の関連について総説を公開しており、反復投与毒性試験で神経毒性影響を示す物質をレビューしてリスト化している (ECHA, 2017)。この神経毒性



物質リストと本研究に用いた統合データベースから同定された臨床徴候的に神経毒性影響を示した物質リストを比較することにより、化学構造と物理化学的性状の観点から類似する物質のグループ化を試みたところ、脂肪族アルコール、アルキルエーテル、アルコキシアルコール、アルキルフェノール、アルキルベンゼン類がカテゴリーの候補として同定された。それらの神経毒性機序として、膜構造への影響や近年では GABA 受容体への作用などが提唱されているが、いまだ不明な点が多い (ECHA, 2017)。

その他、メタクリル酸エステル、アントラキノ、脂肪族ニトリル、アニリン、二級・三級アミン、シラノール骨格を持つ物質などがカテゴリーの候補として挙げられたが、カテゴリー化の根拠となる機序に関する情報は見つからなかった。

#### D. 考察

神経毒性は有害性評価における重要な毒性エンドポイントのひとつであるが、これまで機序に基づいた毒性予測モデルはほとんどない。知識ベースの構造活性相関モデルとして知られる DEREK Nexus も神経毒性物質を検出する感度は極めて低い。そこで本研究では、国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を選抜し、それらを化学構造と想定される毒性機序に基づいてグループ化し、その領域を定義して、カテゴリーアプローチを適用するための基盤の構築を試みた。

反復投与毒性試験の統合データベースから神経毒性物質を抽出するために、病理組織および一般状態の神経毒性学的変化に着

目した。多くのケースでは確認のため元の報告書を精査した。しかし、海外の公開データベース由来で元の報告書が入手できず、詳細情報が得られないことも多かった。さらにルーチンの一般状態観察のみで詳細観察や FOB (Functional observational Battery) 等を実施していないケースも多いことから、神経毒性として判定することが困難な物質も多く、それらは今回の解析には含めなかった。神経毒性物質の抽出においては、他の *in vivo* 試験や関連物質の評価書等の情報収集を追加で実施した。

神経の病理組織学的変化は一般に不可逆的であり重篤であると考えられている。その機序として、主に神経系の部位特異的に発現する代謝酵素により生成した反応性代謝物の生体分子への攻撃と機能損傷、あるいはグルタチオン抱合・枯渇による SH タンパク質への攻撃と酸化ストレス誘導、神経細胞に機能維持に重要なタンパクとの付加体形成などが挙げられた。一方、臨床学的な変化に関わる機序として、神経系のチャンネルや酵素の拮抗的阻害、ミトコンドリアの脱共役、膜系への影響など可逆的な作用と考えられるものが挙げられた。また、医薬品や農薬と共通する分子標的への作用が多く介在することが示された。本研究の成果の一つとして、化学物質の神経毒性機序情報が集積され、化学物質に対する神経系の選択的な脆弱性の理解を深めることが出来たことが挙げられる。

類似物質や共通部分構造をもつ医薬品・農薬関連物質等の毒性データを比較解析することにより、毒性発現に寄与する基本構造と許容される構造的差異を考察してカテゴリーの領域として定義した (表 1)。これ

を OECD QSAR Toolbox のカテゴリープロファイラーへカスタムで搭載することにより、数多くの化学物質の中から神経毒性物質を機序に基づいてプロファイリングすることが可能になると期待できる (図 2)。本研究では、神経毒性ポテンシャルを有する物質をできるだけ見落とさないようにカテゴリー領域を定義したが、毒性にリンクするキーイベントの *in vitro* 試験データ等をより広範囲に収集して物質間で比較解析することにより、カテゴリーの領域をより精緻に定義できるようになると考えられる。一方で、一部のカテゴリーでは、基本構造を持っていても *in vivo* 毒性試験では神経毒性影響が認められていないケースがある。分子ターゲットとの作用 (トキシコダイナミクス) の違いに加えて、暴露量や体内分布、代謝などに依存するトキシコキネティクスの違いも要因として挙げられる。実際にカテゴリーアプローチを適用する際には、課題設定を明確にすることが重要である。有害作用の類推、NOAEL の推計など、目的によって許容される不確実性のレベルが異なり、必要に応じて追加で情報を収集する必要があることに留意する必要がある。

## E. 結論

本研究では、国内外で公開されている信頼性の高い反復投与毒性試験データを統合したデータベースから神経毒性物質を選抜した。その神経毒性機序情報を集積して体系的に整理することにより、化学物質に対する神経系の選択的な脆弱性の理解を深めることが出来た。さらに、化学構造と毒性機序に基づいて神経毒性物質をグループ化し、類似物質の情報を取り入れてその領域を定

義して、OECD QSAR Toolbox のカテゴリープロファイラーに実装することにより、カテゴリーアプローチを適用するための基盤を構築した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Jojima K, Yamada T, Hirose A. Development of a hepatotoxicity prediction model using *in vitro* assay data of key molecular events. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2019, 6, 327-32.
- 2) Inoue K, Suzuki H, Yamada T. Comprehensive toxicity evaluation of cyclopentyl methyl ether (CPME) for establishing a permitted daily exposure level. *Fundam Toxicol Sci.* 2019, 6, 145-165.
- 3) 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), Series on Testing & Assessment. 2019, No. 308. 1-75.
- 4) Patlewicz G, Lizarraga LE, Rua D, Allen DG, Daniel AB, Fitzpatrick SC, Garcia-Reyero N, Gordon J, Hakkinen P, Howard AS, Karmaus A, Matheson J, Mumtaz M, Richarz A, Ruiz P, Scarano L, Yamada T, Kleinstreuer N. Exploring current read-across applications and needs among selected U.S. Federal Agencies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2019, 106, 197-209.
- 5) Tachibana K, Kass GEN, Ono A, Yamada T, Tong W, Doerge DR, Yamazoe Y. A

- Summary Report of FSCJ Workshop "Future Challenges and Opportunities in Developing Methodologies for Improved Human Risk Assessments". *Food Safety*. 2019, 7, 83-89.
- 6) 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) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2020, 140, 481-484.
  - 7) 田邊思帆里, 広瀬明彦, Maurice Whelan, 山田隆志. 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. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2020, 140, 485-489.
2. 学会発表
- 1) Case Study on the Use of Integrated Approach to Testing and Assessment for Testicular Toxicity of Ethylene Glycol Methyl Ether (EGME)-Related Chemicals, Yamada, T., Matsumoto, M., Miura, M., Hirose, A. EU-ToxRisk workshop on NAM-supported read-across: from case studies to regulatory guidance in safety assessment (May 2019, Espoo, Finland)
  - 2) Current status of development and improvement of *in silico* approaches for regulatory chemical safety assessment in NIHS. Yamada, T., Honma, M., Hirose, A. 第46回日本毒性学会学術年会 (2019年6月 徳島)
  - 3) 水道水中の汚染化学物質に対する垂急性参照値の導入, 松本真理子, 川村智子, 井上薫, 山田隆志, 広瀬明彦, 第46回日本毒性学会学術年会 (2019年6月 徳島)
  - 4) 食品用器具・容器包装材料のポジティブリスト化に向けた安全性評価: 脂肪酸類のグループ評価, 磯貴子, 松本真理子, 鈴木洋, 川村智子, 山田隆志, 井上薫, 杉山圭一, 森田健, 本間正充, 広瀬明彦, 第46回日本毒性学会学術大会 (2019年6月 徳島)
  - 5) Development of hepatotoxicity prediction model using *in vitro* assay data of the molecular key events. Yamada, T., Jojima, K., Hirose, A. IUTOX 15th International Congress of Toxicology (July 2019, Honolulu, USA)
  - 6) Hazard assessment of hydrazine, a possible migration contaminant from drinking water apparatus. Matsumoto, M., Igarashi, T., Inoue, K., Yamada, T., Hirose, A. 5th Congress of the European Societies of Toxicology (September 2019, Helsinki, Finland)
  - 7) Development of *in silico* prediction model for skin sensitization using the alternative tests dataset. Suzuki, M., Ambe, K., Tohkin, M., Yamada, T., Ashikaga, T. CBI 学会 2019年大会 (2019年10月 東京)
  - 8) 化学物質のヒト安全性評価のための *in silico* アプローチの開発と活用, 山田隆志, 内閣府化学物質の安全管理に関するシンポジウムー化学物質の評価・管理に関する手法やツール等の活用状況ー (2019年11月 東京)
  - 9) 生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータの物質群毎の特徴の解析, 明関由里子, 吉田喜久雄, 石田誠一, 山田隆志, 第32回日本リスク学会年次大会 (2019年11月 東京)
  - 10) 化学物質のヒト健康リスク評価に対す

る *in silico* アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第 47 回構造活性相関シンポジウム (2019 年 12 月 熊本)

- 11) Construction of databases of environmental fate and ecotoxicity for the development of environmental risk evaluation system of pharmaceuticals. Hirose, A., Kobayashi, N., Kurimoto, M., Yamamoto, H., Ikarashi, Y., Yamada, T. Society of Risk Analysis 2019 Annual meeting (December 2019, Arlington, USA)
- 12) Read-across case study on testicular toxicity of ethylene glycol methyl ether-related substances for the fourth cycle of OECD IATA Case Studies Project. Yamada, T., Matsumoto, M., Kawamura, T., Miura, M., Hirose, A. *59<sup>th</sup> Annual Meeting of Society of Toxicology* (March 2020, Anaheim, USA)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

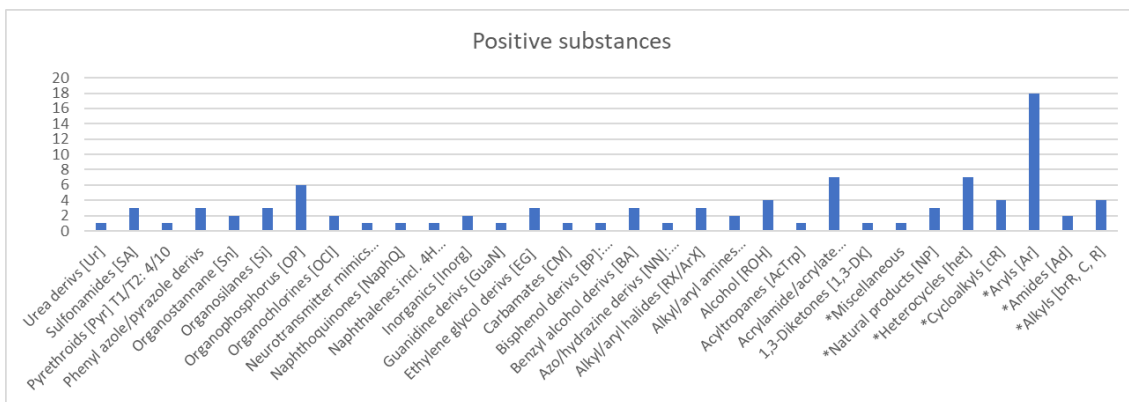

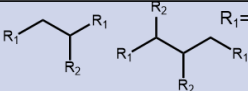
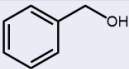
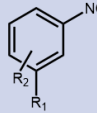
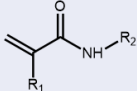
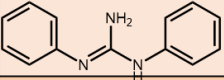
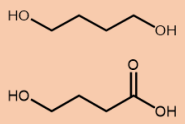
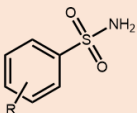
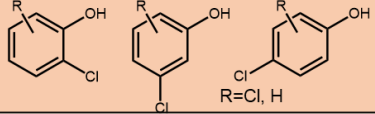
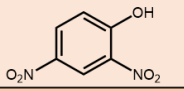
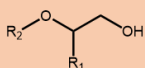
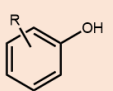



図1 選抜した神経毒性物質のケモタイプによる分類

The screenshot displays the OECD QSAR Toolbox 4.4 interface. The main window shows a 'Filter endpoint tree' with a 'Custom' profile selected. A 'Custom category profiler' window is open, displaying a 'List of new categories for neurotoxicity' for the chemical 'benzenesulfonamide, benzenesulfonamide (category profile)'. The interface includes various toolbars, a document pane, and a main data table with columns for 'Structure', 'Additional ids', 'CAS Number', 'CAS-SMILES relation', 'Chemical name(s)', 'Composition', 'Molecular formula', 'SMILES', 'Parameters', 'Physical Chemical Properties', 'Environmental Fate and Transport', 'Ecotoxicological Information', and 'Human Health Hazards'.

図2 構築した新規の神経毒性カテゴリーの OECD QSAR Toolbox への実装

表 1 構築・精緻化した化学物質の新規の神経毒性カテゴリー

Category	Core structure / structural boundary	Possible measurable key events leading to neurotoxicity
<b>Pathological changes</b>		
Thiophene	 (core structure)	Metabolic activation by P450s in CNS Damaging macromolecules
Haloalkane	 $R_1=Cl, Br; R_2=Cl, Br, H$	Metabolic activation by P450s/GST in CNS GST depletion / induction of oxidative stress
Benzyl alcohol	 + its precursors	Inhibition of Glutathione peroxidase by the aldehyde metabolite in CNS Induction of oxidative stress
Nitrobenzene	 $R_1=NO_2, NH_2, H$	Metabolic activation by nitroreductase in CNS Damaging macromolecules
Acrylamide	 $R_1=H, CH_3$ $R_2=H, C_nH_{2n+1}, C_nH_{2n}OH (n=1 \text{ or } 2)$	React with sulfhydryl groups of neural proteins at peripheral nervous system and CNS
<b>Behavioral changes</b>		
Phenyl guanidine	 (core structure)	Inhibition of sodium channel
1,4-Butandiol	 + the corresponding precursors	Competitive inhibition of GABA by $\gamma$ -hydroxybutyric acid in CNS
Benzenesulfonamide	 $R=CH_3, NH_2$	Competitive inhibition of carbonic anhydrase in CNS
Chlorophenol	 $R=Cl, H$	Mitochondrial uncoupling of oxidative phosphorylation in CNS
Nitrophenol	 + its esters	Mitochondrial uncoupling of oxidative phosphorylation in CNS
Aliphatic alcohol	$R-OH$ $R$ =straight or branched alkyl (C3-4)	Not clear (interaction with membrane/interference of GABA in CNS)
Alkyl ether	$R_1-O-R_2$ $R_1$ =straight or branched alkyl (C3-4) $R_2$ =straight or branched alkyl (C1-4)	
Alkoxyalcohol	 $R_1=H, CH_3$ $R_2=C_nH_{2n+1} (n=1,2)$	
Alkylphenol	 $R=C_nH_{2n+1} (n=1-4;$ chain length, C1-2; substitution #, 1-3)	
Alkylbenzene	 $R=Cl, C_nH_{2n+1} (n=1-2;$ chain length, C1-2; substitution #, 1-2)	

平成 31 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

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	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	Susanne Stalford	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Adrian Fowkes	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Alun Myden	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Emma Hill	ラーサ研究所		研究員

研究要旨

平成 31 年度は、生殖発生毒性に関するリードアクロスモデルの構築を目指して、毒性試験結果と既知の生殖発生毒性に関する情報を元に、生殖発生毒性に関連するキーイベントや毒性発現経路（AOP）の同定を試みた。既存化学物質点検プログラムで行われてきた各毒性のパラメータをデータベース化し、収録されている試験に対する予測能の指標を得るために、Derek Nexus と AOP に基づく生殖発生毒性予測のプロトタイプモデルを用いてバリデーションを行った。その結果、Derek Nexus に比較して AOP に基づくモデルで感度の上昇が認められたが、特異性の低下も伴っており、結果的には 2 つのモデルの確度は同程度であった。この AOP に基づくモデルの感度の上昇を検証するため、新規の作用機作の存在を探索するために、5 種類のデータマイニング手法を行った。パターンマイニング法 (Sherhod *et.al.*, 2014) では有意な毒性メカニズムは見つからなかったが、発生生殖毒性の決定樹 (Wu *et.al.*, 2013) では 2 種類、Derek Nexus の他の毒性に対する構造アラートの解析では 2 種類、ToxCast データとの相関マイニングでは 7 種類、フィンガープリントによる QSAR モデルでは 8 種類の作用メカニズム候補を抽出することができた。そのうち、ニトロ芳香族化合物に関連する作用メカニズムとして、グルタチオンの減少を伴う酸化ストレスで引き起こされる精巣および精子形成障害が原因となる雄性生殖能の低下を示す AOP を同定することができ、リードアクロスモデルの性能向上にむけて今回の AOP の開発手法が有用であることが示された。

## 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、今年度から生殖発生毒性に関するリードアクロスモデルの構築を目指し、毒性試験結果と既知の生殖発生毒性に関する情報を元に、生殖発生毒性に関連するキーイベントや AOP の同定を試みることを目的として研究を行った。

## B. 研究方法

### B-1 生殖発生毒性試験データの抽出とケミカルスペース解析

既存化学物質点検プログラムで行われてきた反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(OECD TG-421) および簡易生殖発生毒性試験(OECD TG-422) で得られた生殖発生毒性のパラメータをデータベース化した。また、Lhasa の生殖発生毒性データセットとの重複やケミカルスペースの解析を行った。

### B-2 生殖発生毒性試験データの標準化

データマイニングへの取り組みの促進(関連する評価項目のグループ化など)を行う為、評価項目については、データセット内でエンドポイントツリーとしてまとめ、オントロジーとの関係性を調査した。

### B-3 試験結果の分類法

データセットのマイニングを支援すべく、

化合物をその試験結果に従って分類するためのルールを策定した。

### B-4 *In silico* モデルのバリデーション

分類された試験結果に従って、Derek Nexus (v6.0.1)、AOP の枠組みを基礎とした研究のプロトタイプモデル(Myden *et al.*, 2018)を用いて、予測性能の評価を行った。

### B-5 データマイニングと知識抽出

Derek Nexus と AOP を用いた発生毒性予測のプロトタイプモデルでは十分にカバーされなかった毒性学的懸念領域の抽出について以下の5つの方法を適用した。

- パターンマイニング (Sherhod *et al.*, 2014)
- 生殖発生毒性の決定樹 (Wu *et al.*, 2013)
- Derek Nexus (他のアラートを用いる手法)
- ToxCast データ (US EPA, 2015) との相関マイニング (Sipes *et al.*, 2011)
- ChEMBL 統計モデルを用いたバイオフィンガープリント法

### B-6 AOP の作成の試行

抽出した毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連に対する蓋然性、今回のデータセットに含まれる物質の数から、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)受容体と生殖毒性の間のシグナルについて調査し、AOP の作成を試みた。

(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 生殖発生毒性試験データの抽出とケミカルスペース解析



既存化学物質点検プログラムのデータに含まれる 394 の化合物のうち、105 の化合物が Lhasa の生殖発生毒性データセットに存在した。また、他の情報源との重複を検討したところ、試験型についてより詳細な情報を提供しているデータセット (Lhasa の DARTDB および ToxRefDB 等) との重複と比較して、化合物分類を目的とした要約データセット (FDA および NTP など) との重複が大きかった。

表 1 データセットの化合物のうち、他の生殖発生毒性のデータセットに存在する化合物の数

データセット	物質数	Dataset summary
All datasets	105	Combination of the datasets listed below
FDA	50	Mining dataset curated and supplied by the FDA <sup>[8]</sup>
Lhasa Limited	7	Curated dataset of studies published in the literature
NTP	94	A dataset obtained from the NTP with a binary classification for developmental toxicity
ToxRefDB	7	A database containing repeat dose studies including DART studies <sup>[9]</sup>
Wu et al	9	Training set for an expert rule-based prediction system for DART <sup>[10]</sup>

また、データによって占有される化学空間領域を検討するため、提供されたデータセットを Lhasa Limited 社が高い信頼性を有しているデータセットと比較した (図 1)。プロットは、主成分解析によって 2 次元に縮小し、Morgan フィンガープリント[RDkit]によって決定されたケミカルスペース内の化合物を表す。青色の密度プロットは、Lhasa の生殖発生毒性データセットのうち FDA と ToxRefDB 由来のケミカルスペース領域で、赤色の点は、今回のデータセットの 394 の構造を表す。今回のデータセットには、

生殖発生毒性作用が比較的知られている化学空間領域を占めているものもあれば、比較的密度の低い化学空間領域を占めているものもあることがわかった。このプロット図から、ケミカルスペースには生殖発生毒性傾向に関する情報が多い領域が 2 箇所あることが示唆される (図 1: 領域 A および B)。この 2 領域の化合物の例を検証すると、領域 A に含まれる化合物の典型例は、小化合物、非環式化合物および脂肪族化合物であるが、領域 B では芳香族基が多いことが示された。

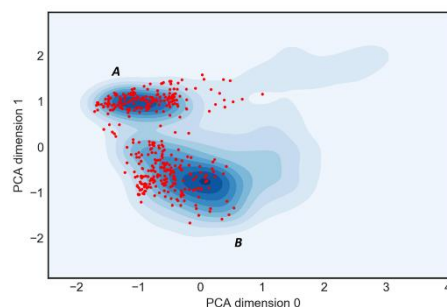


図 1 既存化学物質点検プログラムの生殖発生毒性データと Lhasa Limited 社が所有する既存の生殖発生毒性データセット中の化合物との関係

## C-2 生殖発生毒性試験データの標準化

TG-421 と TG-422 試験結果のさまざまな評価項目とその結果を抽出し、データセット内の他の評価項目と関連付けた。これらの抽出された評価項目をデータセット内の他の評価項目と関連付けるため、小規模な評価項目集を作成した (表 2)。これらの用語は、EBI の Ontology Lookup Service や哺乳類表現型オントロジーなどの既存のオントロジーから入手した。このような方法で評価項目を構成することで、データマイニングへの取り組みのためのネットワーク図を作成した (図 2)。

表 2 評価項目集の作成 (サンプル)

Observation	Preferred term	Parent endpoint	From
Abnormal estrus cycle	Abnormal estrus	Female fertility toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0009016
No. of mated pairs↓	Mating behaviour	Mating behavioural toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/GO_0007617
No. of copulated pairs↓	Abnormal copulation	Fertility toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0009697
Copulation index↓	Abnormal copulation	Fertility toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0009697
No. of pregnant females↓	Abnormal pregnancy	Fertility toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0009661
Fertility index↓	Reduced fertility	Fertility toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0001921
Pairing days until copulation↑	Mating behaviour	Mating behavioural toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/GO_0007617
Abnormal estrus cycle	Abnormal estrus	Female fertility toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0009016
No. of dams with live pups↓	Embryonic lethality	Embryo/foetal lethality	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0008762
Gestation length↑	Long gestation period	Female fertility toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0002293
No. of corpora lutea↓	Decreased corpora lutea number	Female fertility toxicity	http://purl.obolibrary.org/obo/MP_0002680



図 2 評価項目とオントロジーとの関連性を表すネットワーク図

### C-3 試験結果の分類

データセットのマイニングのために化合物をその試験結果に従って分類するためのルールを策定した。これらのルールの目的は、他の毒性に続発するのではなく選択的

に生殖発生毒性を引き起こす可能性のある化合物を特定することである。これらの物質を「選択的毒性物質」とした。また、全身毒性の存在下で生殖発生毒性を引き起こす化合物を「非選択的毒性物質」とした。利用可能なデータおよび用量選択のための試験計画書を考慮して、最高試験用量 (HTD) は親動物に全身毒性が認められる用量に相当すると仮定した。その結果以下のルールを用いて化合物の各評価項目の結果を分類した。

- 評価項目の最小作用量(LOEL) < HTD  
⇒ 「選択的毒性物質」
- 評価項目の LOEL = HTD  
⇒ 「非選択的毒性物質」
- 評価項目の LOEL が観測されない  
⇒ 「非毒性物質」

394 物質の分類結果は表 3 のようになった。

表 3 分類後の各評価項目の毒性物質数

評価項目	選択的毒性物質	非選択的毒性物質	非毒性物質
母動物	39	102	253
児動物	33	117	244

### C-4 In silico モデルのバリデーション

上記分類に基づき、現時点で生殖発生毒性を予測可能な予測モデル Derek Nexus (v6.0.1) と AOP の枠組みを基礎とした研究のプロトタイプモデル (Myden *et.al.*, 2018) を用いて、モデルの検証を行った。母動物および出生児の評価項目について、Derek Nexus および AOP に基づくモデル (Lhasa AOP Model) のバリデーションを行った (図 4)。各評価項目に対して関連するモデルを選択した。例えば、出生児の評価項目についてバリデーションを行う場合は、催奇形性およ

び発生毒性モデルを用いた。また、バリデーション基準を作成するために、非選択的毒性物質も陽性物質に含む「包含 (Included) シナリオ」と、含めない「除外 (Excluded) シナリオ」の2つに分けて評価した。

表 4&図 4. 児動物の評価項目のモデル性能

非選択的毒性物質	Model	Total	TP	FP	TN	FN
Excluded	Derek Nexus	277	2	13	231	31
Excluded	AOP model	277	11	62	182	22
Included	Derek Nexus	394	6	13	231	144
Included	AOP model	394	40	62	182	110

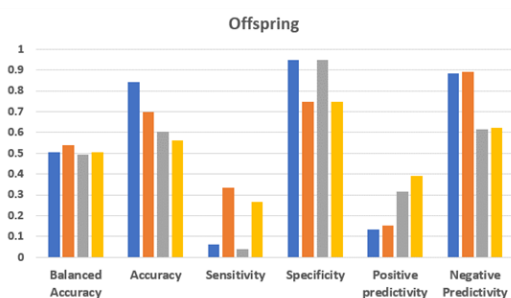
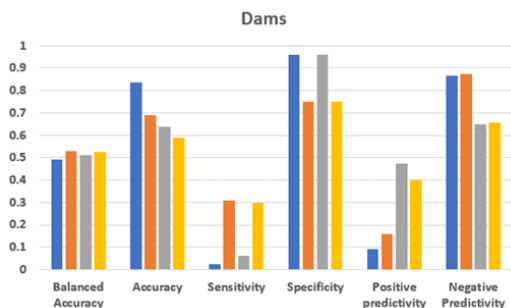


表 5&図 5. 母動物の評価項目のモデル性能

非選択的毒性物質	Model	Total	TP	FP	TN	FN
Excluded	Derek Nexus	292	1	10	243	38
Excluded	AOP model	292	12	63	190	27
Included	Derek Nexus	394	9	10	243	132
Included	AOP model	394	42	63	190	99



バリデーションの結果、母動物および児動物の評価項目、ならびに非選択的毒性物

質を包含するか否かについて、モデルの性能には同様の傾向が認められた。Derek Nexus と比較して、AOP Model で感度の上昇が認められた。この AOP Model における感度上昇は、特異性において同様の低下を伴っており、結果的に両モデルの確度は同程度で均衡していた。AOP Model における感度の上昇は、Derek Nexus と比べて化合物の作用機序の予測に用いられる構造アラートの範囲がより広いことによって生じると考えられた。

### C-5 データマイニングと知識抽出

*In silico* モデルでは十分にカバーされない毒性学的関心領域を特定し、新規の発生毒性および受胎能毒性を予測できるモデルの開発を支援するために、母動物および出生児の評価項目の結果を用いて、5つの手法を用いて、関心領域とその所見の特定を試みた。

- パターンマイニング (Sherhod *et al.*, 2014)

アルゴリズムによって予測結果をデータセット内の各化合物の試験値と比較した後、モデルによってカバーされなかった毒性物質の構造的特徴を特定できるが、特定されたパターンを検証した結果、各グループによって裏付けられた一連の化学物質が異なっていたことより、この手法では新しいパターンを見いだせなかった。

- 生殖発生毒性の決定樹 (Wu *et al.*, 2013)

特徴的なルールに基づく構造アラートを用いて生殖発生毒性を予測できるモデルで、このモデルを用いて、上記の *in silico* モデルがカバーしていない2つの関心領域を特定できた (表 6)。

- Derek Nexus (他のアラートを用いる手法)

Derek Nexus に含まれる他の毒性の評価項目を予測する構造アラートを用いて、プロファイリングを行った結果、生殖発生毒性に関連すると思われるトキシコフォアとメカニズムを2つ特定した(表6)。

- ToxCast データとの相関マイニング (Sipes *et al.*, 2011)

今回のデータの評価項目の分類結果と ToxCast の生物活性値との相関関係を、Sipes らが報告した方法を用いて検討した。統計的検定およびルールを用いた。In vivo における有害転帰を予測可能な生物活性試験および標的領域を7種特定できた(表7)。

- バイオフィンガープリントモデル

ChEMBL から提供を受けた統計モデルを用いて、選択的毒性物質のバイオフィンガープリントを作成した。既に AOP に基づくモデルとして掲載されている標的タンパクを除外し、残った標的についていくらかでも生殖発生毒性と関連性のある標的を特定するために検証を行った。その結果8つの標的タンパクを同定した(表8)。

### C-6 AOP の作成の試行

以上解析によって、今回検証したデータセットの様々な化学物質について、潜在的な生殖発生毒性の因果関係として化学的分類といくつかの生物学的標的を特定することができたが、これらの標的について、新たな AOP を作成することができるかどうかについて検証した。まず、生殖毒性との関連性やデータセットに含まれる物質の数を参考とし、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)受容体と生殖毒性の間のシグナル

について調査し、AOP の作成を試みた。

このシグナルは、QSAR 予測によって GnRH 受容体と相互作用すると見なされた一群の化合物に基づいているが、これらの化合物に関する生物活性データベースを検索した結果、化合物は GnRH 受容体のリガンドではないことが判明した。これらの化合物の中に多数含まれるニトロベンゼン類が、ChEMBL の GnRH 受容体モデルのトレーニングセットの活性化化合物の部分構造として含まれることが QSAR 予測の根拠になっていると考えられた。しかし、これらニトロベンゼン類は、データセットの中で生殖発生毒性との関連性を示すことは示されていないので、さらなる文献調査を行った結果、これらの化合物が既知の毒性機序を有する精巣毒性に関連することが示された。そこで、この知見を網羅するように調査を行い、ニトロ芳香族類が酸化ストレスによって雄の生殖毒性を引き起こすという AOP を作成した。この AOP の概要は以下の様になった。

グルタチオン(GSH)は、共有結合による求電子性生体異物化合物の除去および活性酸素種(ROS)のクエンチングの基質となるトリペプチドである(Forman *et al.*, 2009)。ROS は、シグナル変換における二次メッセンジャーとしての作用、およびイオン輸送、免疫学的宿主防衛、転写およびアポトーシスに関与するプロセスの媒介を含む一連の正常な生物学的機能に対して重要である(Ray *et al.*, 2012; van Gelder *et al.*, 2010)。内在性 ROS は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化から生成し、そこで重要な役割を演じることができる(Ray *et al.*, 2012)。しかしながら、過剰な ROS は、精巣毒性および精子

形成障害を含む広範囲の毒性転帰の原因に関与する酸化ストレス状態をもたらす可能性がある (Creasy *et al.*, 2018; van Gelder *et al.*, 2010)。過剰な ROS および酸化ストレスは、ニトロ芳香族類などの外因性化合物によって促進される可能性がある (Creasy *et al.*, 2018; Kovacic *et al.*, 2001) (図 6)。

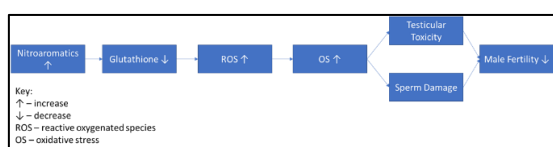


図 6. ニトロ芳香族類による雄の生殖毒性の AOP のキーイベントの関係

#### ニトロ芳香族の増加 → GSH の減少

ニトロ芳香族類は、代謝されて GSH と反応することができる官能基を形成する (Kovacic *et al.*, 2014)。GSH とニトロ芳香族間の芳香族求核置換反応 (SNAr 反応) はアール化合物の置換様式に依存している (Ruzza *et al.*, 2013)。さらに、GSH の二量化は ROS の処理のための酵素反応産物であるため、GSH の二量化は ROS を産生する生体外異物によって促進される可能性がある (Nimse *et al.*, 2015)。

#### GSH の減少 → ROS の増加

GSH は、過剰 ROS の生成に対する細胞の最も重要な防御機構である (Nimse *et al.*, 2015)。したがって、化学的損傷から生じる GSH の過剰な枯渇は ROS の増加を引き起こし得る。GSH との結合の前に、生体外異物がフリーラジカル中間体に転換を受けることが多い (Wells *et al.*, 2009)。この GSH との結合に加え、これらのフリーラジカルの中間体自体が追加の ROS を生成することができる。したがって、生体外異物の代謝による GSH の枯渇によって過剰な ROS が生成す

る。

#### ROS の増加 → 酸化ストレス

ROS は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化、並びにイオン輸送、免疫宿主防御、転写およびアポトーシスに関与するプロセスなどの多数の生物学的プロセスに重要である (Ray *et al.*, 2012; van Gelder *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2017)。ROS は主に、酸化的リン酸化においてミトコンドリアで生成する (Ray *et al.*, 2012)。酸化ストレスは、ROS と抗酸化防御の不均衡と定義される (Betteridge *et al.*, 2000)。したがって、酸化還元ホメオスタシスを維持するシステムが崩壊する点まで ROS が増加すると酸化ストレスが生じる可能性がある。

#### 酸化ストレス → 精巣毒性

ROS は DNA、タンパク質および脂質と共有結合し、細胞構成要素への損傷および細胞シグナル伝達障害を引き起こす可能性がある (Creasy *et al.*, 2018; van Gelder *et al.*, 2010)。酸化ストレスは多数の経路を介して毒性をもたらす得るため、毒性の正確な機序を解明することは簡単ではないが、生殖毒性を有する多数の化合物群は、その毒性に寄与すると考えられる酸化ストレスを引き起こすことが知られている (Kovacic *et al.*, 2001; Creasy *et al.*, 2018)。ニトロ芳香族化合物は酸化ストレスを引き起こすことができ (Kovacic *et al.*, 2014)、精巣毒性も誘発する。

#### AOP と関連するニトロ芳香族化合物の例

- 2-sec-ブチル-4,6-ジニトロフェノール (ジノセブ)

ジノセブが齧歯類に投与された試験の検証では、ジノセブはラットへの様々な反復経口投与試験で精子数の減少、精巣萎縮等の精巣毒性物質であるとされている

(Matsumoto *et al.*, 2008)。

- 4,6-ジニトロ-*o*-クレゾール (DNOC)  
総説論文では、DNOC はジノセブより弱い精巣毒性物質であると結論されている (Matsumoto *et al.*, 2008)。

- 2,4-ジニトロフェノール (DNP)  
総説論文で、DNP は精巣毒性物質ではないが、その理由は、迅速な体内クリアランスに起因すると結論されている (Matsumoto *et al.*, 2008)。

- トリニトロトルエン (TNT)  
ラットにおける TNT の影響を調べた 13 週間の食餌試験から、TNT は最高用量での精巣萎縮、精細管上皮の変性、間質性ライディッヒ細胞の過形成などの病理変化が示された。低用量でも精子、精子細胞および精母細胞の減少などが認められた (Levine *et al.*, 1984)。

- ニトロベンゼン (NB)  
ラットにおける NB の単回投与試験では、肝臓と精巣がこの化合物の主な標的臓器であると結論され、高用量ほど精細管の損傷が認められ、精母細胞の破壊と精巣上体の数の減少が認められた (Bond *et al.*, 1981)。

- 1,3-ジニトロベンゼン (1,3-DNB)  
ラットへの 8 週間の飲水曝露により、精巣萎縮に加え、精子形成の低下と精細管の脱落、崩壊、16 週間では精巣の重量減少が認められた (Cody *et al.*, 1981)。また、1,3-DNB は、ミトコンドリアグルタチオン濃度を低下させることも明らかにされている (Creasy *et al.*, 2018)。

- 2,6-ジニトロトルエン (2,6-DNT)  
イヌとラットを用いた 13 週間の試験では、精巣萎縮および精子形成の低下が生じた (Rickert *et al.*, 1984)。

- 2,4-ジニトロトルエン (2,4-DNT)  
ラットとイヌへ 13 週間曝露で精巣萎縮と精子形成障害が認められた (Rickert *et al.*, 1984)。

- 3-メチル-4-ニトロフェノール (PNMC)  
マウスへの 100 mg/kg の単回腹腔内投与で精細管に著しい損傷を示した (Bu *et al.*, 2012)。さらに、円形生殖細胞の 40% 損失、長い精子の非検出、精巣萎縮も認められた。これらの所見もグルタチオン濃度の低下と同時に認められ、酸化防止剤 (ケルセチン) の同時投与によって、毒性やグルタチオン減少が緩和された。

#### D. 考察

既存化学物質点検プログラムで行った反復投与毒性試験のうち生殖発生毒性項目を解析した結果、知識ベースの予測モデルより、AOP に基づいた予測モデルで感度が情報したことから、既存の知識ではカバーできていない生殖発生毒性の作用メカニズムを開発できる可能性のあることが示された。これらの毒性メカニズム候補となる生物活性標的と関連する化合物群の調査を深めていくことができれば、新規の AOP 開発と共にリードアクロスアプローチや将来的な生殖発生予測モデルの性能向上に寄与できるものと考えられた。そこで、これらの生物活性標的のうち、生殖発生毒性との関連性やデータセットに含まれる物質の数を参考とし、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 受容体と生殖毒性の間のシグナルとニトロ芳香族化合物の関連性について調査を行ったが、実際は GnRH との関連性は見いだせなかった。しかし、ニトロ芳香族化合物群と今回のデータセットの解析による選択毒性



物質との関連性が高いことから、さらなる調査を進めて結果、酸化ストレスによる精巣毒性との関連性が浮かび上がった。このことは、構造と生物活性との相関性のみ relied 解析では、間違っ たメカニズムを示唆する可能性があることを示したが、さらなるデータマイニングで生物反応と構造との関連性を抽出することが可能であることも示している。更に、今回の解析結果として別のメカニズムを明らかにできたことは、今回のアプローチは新たな AOP の開発手段として妥当であったことを示すと共に、生殖毒性に関して、さらなる AOP の開発の余地があることも示唆したものと考えられる。

## E. 結論

生殖発生毒性に関するリードアクロスモデルの構築を目指して、毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元に、発生毒性に関連するキーイベントや AOP の同定を試みた。既存化学物質点検プログラムで行われてきた各毒性のパラメータをデータベース化し、収録されている試験に対する予測能の指標を得るために、Derek Nexus と AOP に基づく発生毒性予測のプロトタイプモデルを用いてバリデーションを行った。その結果、Derek Nexus に比較して AOP に基づくモデルで感度の上昇が認められたが、特異性の低下も伴っており、結果的には 2 つのモデルの確度は同程度であった。この AOP に基づくモデルの感度の上昇を検証するため、新規の作用機作の存在を探索するために、5 種類のデータマイニング手法を行った。パターンマイニング法 (Sherhod *et.al.*, 2014) では有意な毒性メカニズムは見

つからなかったが、生殖発生毒性の決定樹 (Wu *et.al.*,2013) では 2 種類、Derek Nexus の他の毒性に対する構造アラートの解析では 2 種類、ToxCast データとの相関マイニングでは 7 種類、フィンガープリントによる QSAR モデルでは 8 種類の作用メカニズム候補を抽出できた。そのうち、ニトロ芳香族化合物に関連する作用メカニズムとして、グルタチオンの減少を伴う酸化ストレスで引き起こされる精巣および精子形成障害が原因となる雄性生殖能の低下を示す AOP を同定することができ、リードアクロスモデルの性能向上にむけて今回の AOP の開発手法が有用であることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Tanabe S, Inoue K, Hirose A. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances(V). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* 2019, 137, 66-72.
- 2) Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Kawamura T, Sakuratani S, Ono A, Hirose A. Validation of the statistical parameters and model selection criteria of the benchmark dose methods for the evaluation of various endpoints in repeated-dose toxicity studies. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2019, 6, 125-136.
- 3) Jojima K, Yamada T, Hirose A. Development of a hepatotoxicity prediction model using in vitro assay data of key molecular events. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2019, 6, 327-32.

- 4) 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) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2020, 140, 481-484.
2. 学会発表
- 1) PDE 設定の基本的考え方, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 2) 水道水中の汚染化学物質に対する亜急性参照値の導出, 松本真理子, 川村智子, 井上薫, 山田隆志, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 3) 食品用器具・容器包装材料のポジティブリスト化に向けた安全性評価: 脂肪酸類のグループ評価, 磯貴子, 松本真理子, 鈴木洋, 川村智子, 山田隆志, 井上薫, 杉山圭一, 森田健, 本間正充, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 4) 化審法既存化学物質のスクリーニング評価における 1,4-ジクロロブタンの有害性評価, 五十嵐智女, 鈴木洋, 牛田和夫, 松本真理子, 井上薫, 広瀬明彦, 第 46 回日本毒性学会学術大会 (2019 年 6 月徳島)
- 5) Hazard assessment of hydrazine, a possible migration contaminant from drinking water apparatus. Matsumoto, M., Igarashi, T., Inoue, K., Yamada, T., Hirose, A. *5th Congress of the European Societies of Toxicology* (September 2019, Helsinki, Finland)
- 6) Construction of databases of environmental fate and ecotoxicity for the development of environmental risk evaluation system of pharmaceuticals. Hirose, A., Kobayashi, N., Kurimoto, M., Yamamoto, H., Ikarashi, Y., Yamada, T. *Society of Risk Analysis 2019 Annual meeting* (December 2019, Arlington, USA)
- 7) 化学物質のヒト健康リスク評価に対する *in silico* アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第 47 回構造活性相関シンポジウム (2019 年 12 月 熊本)
- 8) Read-across case study on testicular toxicity of ethylene glycol methyl ether-related substances for the fourth cycle of OECD IATA Case Studies Project. Yamada, T., Matsumoto, M., Kawamura, T., Miura, M., Hirose, A. *59th Annual Meeting of Society of Toxicology* (March 2020, Anaheim, USA)
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



表 6 専門的なルールに基づくシステムの構造アラートの使用に関連して特定された  
化学的分類

Compound class <sup>a</sup>	Numbers of Chemicals in DB and Scores <sup>b</sup>	Biological plausibility	<i>In silico</i> model knowledge	Recommendation(s)
<b>Anthraquinones (DART decision tree)</b>	3 compounds Signal: Dams = 0.5 Offspring = 0.67	Chemicals such as these can inhibit type II topoisomerase and thus disrupt DNA synthesis and repair.	Putative AOP linking genetic instability to developmental toxicity. These compounds were not captured by the current research model.	AOP for type II topoisomerase inhibition leading to DART.  AOP network linking DART to genetic instability.
<b>Perfluoro-carboxylic acids and perfluoro-sulphonic acids (DART decision tree)</b>	5 compounds Signal: Dams = 0.2 Offspring = 0.5	Chemicals such as these are associated with DART which may be driven by disruption to the endocrine system.	No model in the AOP-based approach captures compounds of this type.	Mode of action analysis for compounds within this class. Synthesise structural alert or AOP accordingly.
<b>Alerting for mitochondrial toxicity (Derek Nexus)</b>	33 compounds Signal: Dams = 0.46 Offspring = 0.40	Mitochondria are essential for cell survival and therefore their perturbation of could lead to a variety of toxic outcomes.	Disruption to mitochondrial function is not a key event described in the AOP-based approach.	Synthesise an AOP network for mitochondrial toxicity and link to DART endpoints if appropriate.
<b>Quaternary ammonium salts (Derek Nexus)</b>	6 compounds Signal: Dams 0.42 Offspring 0.33	Possible mechanisms of action include disruption to membrane integrity or uncoupling/inhibition of oxidative phosphorylation.	No Lhasa model for predicting the DART effects of compounds within this class.	MOA analysis for quaternary ammonium salts. Synthesise structural alert or AOP accordingly.

- a. Method used to identify chemical class of concern is given in parentheses.  
b. The signal for each endpoint is the average score for compounds captured by the feature described where compounds are assigned values according to the following rules: Selective toxicant = 1, non-selective toxicant = 0.5 and non-toxicant = 0.

表7 データセットと ToxCast 試験結果との相関マイニングによって、  
生殖発生毒性傾向が潜在すると特定されたタンパク質標的

Compound class <sup>a</sup>	Numbers of Chemicals in DB and Scores <sup>b</sup>	Biological plausibility	<i>In silico</i> model knowledge	Recommendation(s)
<b>Pregnane X receptor (ATG_PXRE_CIS_up')</b>	Endpoint = Offspring Non-selective toxicants = excluded Signal = 0.18 (17 compounds)	Pregnane X receptor is involved in foetal liver metabolism. However, mouse knockout data indicates that the receptor is not required for normal development or reproduction.	Pregnane X receptor is not described in the AOP-based approach.	Investigate pregnane X receptor as a potential MIE for reproductive toxicity.
<b>Matrix metalloproteinase 9 (BSK_KF3CT_MM_P9_down)</b>	Endpoint = Offspring Non-selective toxicants = included Signal = 0.36 (11 compounds)	Matrix metalloproteinases breaks down extracellular matrix proteins and are required for cell differentiation and growth.	Matrix metalloproteinases are not described in the AOP-based approach.	Investigate matrix metalloproteinases as potential MIE for developmental toxicity AOPs.
<b>SMAD1(ATG_BRE_CIS_up)</b>	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = excluded Signal = 0.4 (5 compounds)	SMADs (mothers against dpp) are signal transducers in multiple signaling pathways.  Knockout of SMAD genes result in embryo lethality in mice.	SMAD1 is not described in the AOP-based approach.	Investigate SMADs for potential roles developmental toxicity AOPs.
<b>Histone deacetylases (BSK_3C_HLADR_down)</b>	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = included Signal = 0.38 (8 compounds)	Histone deacetylases have roles in key cellular processes. AOP leading to testicular toxicity is described on the AOPwiki.	The broad family of histone deacetylases is described in AOP-based approach.	Create an AOP network for histone deacetylases inhibition leading to DART endpoints.
<b>Chemokine ligand 2 (BSK_3C_MCP1_down)</b>	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = included Signal = 0.43 (7 compounds)	Chemokines act as growth factors.	Chemokine signaling is not described in the AOP-based approach.	Create an AOP network for disruption of chemokine signaling leading to developmental toxicity.
<b>Vascular cell adhesion molecule 1 (BSK_hDFCGF_VCAM1_down)</b>	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = included Signal = 0.50 (8 compounds)	Inhibition in the placenta has been linked with restricted foetal growth.	Vascular cell adhesion molecules are not described in the AOP-based approach.	Investigate disruption to vascular cell adhesion molecules leading to reproductive toxicity.
<b>P-selectin (BSK_4H_Pselectin_down)</b>	Endpoint = Dams Non-selective toxicants = included Signal = 0.44 (9 compounds)	P-selectin is involved in angiogenesis.	P-selectin is not described in the AOP-based approach.	Investigate disruption of P-selectin leading to reproductive toxicity. Implement models as appropriate.

- ToxCast assay identified as being predictive for adverse outcome is given in parentheses.
- The endpoint and method for compound classification using the donated dataset. The signal is the average score for active compounds in the ToxCast assay (IC<sub>50</sub> < 10 μM), where compounds are assigned values according to the following rules: Selective toxicant = 1, non-selective toxicant = 0.5 and non-toxicant = 0.
- Values were calculated using compounds which were present in both the aggregated Lhasa Limited DART dataset and the ToxCast assay dataset. Molecules in the Lhasa Limited dataset had a binary classification for DART and compounds were classified as active in the ToxCast assay if they were more potent than 10 μM. Prevalence is the ratio of compounds classified as a toxicant and the positive predictive value (PPV) is the ratio of compounds predicted as active in the *in vitro* assays which are classified also classified as toxicants in the Lhasa Limited dataset.

表 8 QSAR モデルを用いて、選択的毒性物質をフィンガープリント法でプロファイリングすることにより、生殖発生毒性との関連が潜在すると特定されたタンパク質標的

Compound class	Numbers of Chemicals in DB and Scores <sup>a</sup>	Biological plausibility	<i>In silico</i> model knowledge	Recommendation(s)
<b>Lanosterol synthase</b>	8 compounds Signal: Offspring = 0.188, Dams = 0.188	Part of the cholesterol biosynthesis pathway.	Lanosterol synthase is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with Lanosterol synthase. Implement models as appropriate.
<b>P2X purinoceptor 2</b>	14 compounds Signal: Dams = 0.11 Offspring = 0.18	Marketed pharmaceuticals show no DART effects	P2X purinoceptor 2 is not described in the AOP-based approach.	Curate relevant DART data for marketed pharmaceuticals targeting P2X purinoceptor 2
<b>G-protein coupled receptor 84</b>	2 compounds Signal: Dams = 0.5 Offspring = 0.5	The receptor plays a role during eye development in <i>Xenopus</i> .	G-protein coupled receptor 84 is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with G-protein coupled receptor 84. Implement models as appropriate.
<b>Serine/threonine-protein kinase WEE1</b>	1 compound Signal: Dams = 1 Offspring = 1	The kinase acts as a negative regulator of entry into mitosis (G2 to M transition). Mouse knockout data also highlights developmental toxicity issues.	Serine/threonine-protein kinase WEE1 is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with serine/threonine-protein kinase WEE1. Implement models as appropriate.
<b>Cannabinoid CB2 receptor</b>	11 compounds Signal: Dams = 0.273 Offspring = 0.227	The receptor plays a role in supporting female fertility.	Cannabinoid CB2 receptor is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with cannabinoid CB2 receptor. Implement models as appropriate.
<b>Tyrosine kinase non-receptor protein 2</b>	1 compound Signal: Dams and Offspring = 1	The kinase is involved in signal transduction.	Tyrosine kinase non-receptor protein 2 is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with tyrosine kinase non-receptor protein 2. Implement models as appropriate.
<b>Somatostatin receptor 3</b>	1 compound Signal: Dams = 1 Offspring = 0.5	Pharmaceuticals targeting the receptor are classified as pregnancy category C and disrupt for female fertility.	Somatostatin receptor 3 is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with somatostatin receptor 3. Implement models as appropriate.
<b>Gonadotropin-releasing hormone receptor</b>	12 compounds Signal: Dams = 0.25 Offspring = 0.292	Drugs targeting the receptor are contraindicated for use during pregnancy.	Gonadotropin-releasing hormone receptor is not described in the AOP-based approach.	Investigate DART liabilities associated with gonadotropin-releasing hormone receptor. Implement models as appropriate.

- a. The values represent the signal for each target. The signal is calculated as the average score for compounds predicted to interact with the target, where compounds are assigned values according to the following rules: Selective toxicant = 1, Non-selective toxicant = 0.5 and Non-toxicant = 0.

平成 31 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

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 松本 さおり 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

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の生成量等に大きく依存するため、無影響濃度や無影響量等の有害性指標を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となる。昨年度に引き続き、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に関する情報も考慮して、より適切な判断が可能となることを目指して、PBPK モデルに必要な物理化学的および生化学的パラメータの既報値を収集し、ヒト、ラット、マウスの血液/空気および組織/血液分配係数、代謝の  $V_{max}$ 、 $K_m$  等のデータベース (DB) を構築した。DB 化したヒトの既報値を用いて、分子間相互作用に基づく 4 カテゴリーに属する物質の血液/空気および組織/血液分配係数の特徴を解析するとともに、ヒトでの第 I 相の代謝に関与する酵素でカテゴリー化された物質の  $V_{max}$  と  $K_m$  の特徴についても解析した。さらに、比較的データ数が多い 3 カテゴリーの物質の分配係数、 $V_{max}$  および  $K_m$  の分布から代表値を設定し、Ramsey & Andersen type のヒト PBPK モデルを用いてカテゴリーごとの体内動態の特徴を推定可能なことを確認した。今後は、既報値がない物質の物理化学的および生化学的パラメータの推定精度の向上についてさらに検討するとともに、確率論に基づいた定量的不確実性分析が可能な PBPK モデルによるカテゴリーごとの体内動態の推定について検討が必要と考えられる。

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化学物質の健康リスクの評価実施が大きな課題となっている。一方

で、動物福祉の観点から動物毒性試験削減の流れも着実に進んでいる。

定量的構造活性相関 (QSAR) に加えて、カテゴリーアプローチが、実験動物を用い

ずに、短期間で多数の物質の推定が可能のため、近年、代替法として有害性評価での活用が検討されている。この手法は、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、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ため、同一カテゴリーの物質であっても無影響濃度 (NOEL) 等の有害性指標を推定する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) モデルにより推定した内部曝露指標の情報をカテゴリーアプローチに含めることにより、より適切な量-反応評価が可能となることを目指す。

本年度は、PBPK モデルによる一般化学物質の体内動態推定に必要な物理化学的パラメータ (血液/空気、組織/空気および組織/血液分配係数) と生化学的パラメータ (代謝に関する  $V_{max}$ 、 $K_m$ ) の既報値を昨年度に引き続き収集し、ヒト、ラットおよびマウスに対するパラメータの既報値のデータベース (DB) を構築した。さらに、収集したヒトの血液/空気および組織/血液分配係数の特性を、分子間相互作用に基づくカテゴリーごとに解析するとともに、 $V_{max}$  と  $K_m$  についても第 I 相の代謝に関与する酵素に基づいて分類し、それらの特性を解析した。これらの解析により決定されたカテゴリーごとの各パラメータの代表値を用いて PBPK モデルで推定し、カテゴリーごとのトキシコキネティクスの特徴を比較した。

## B. 研究方法

### B-1 PBPK モデルパラメータ値の DB

収集した 667 文献から、PBPK モデルに必要な物理化学的および生化学的パラメータの既報値を抽出した。

昨年度に抽出した既報値も含めて、物質の分配係数 (血液/空気、組織/空気、組織/血液 : 組織 = 肝臓、脂肪、脳、腎臓 等 10 組織) と生化学的パラメータ ( $V_{max}$ 、 $K_m$ 、代謝 1 次速度定数、経口吸収速度定数 等) を、化学物質の特性情報、対象生物種、出典等の情報と関連付けてまとめ、DB を構築した。

### B-2 ヒト PBPK モデルパラメータの解析

ヒトでの分配係数の既報値がある化学物質を、その物質と周囲の媒体に働く分子間相互作用に基づいて、Category I、IIA、IIB および III の 4 つに分類した (表 1)。血液/空気分配係数については、空気/水間の化学物質の分配指標であるヘンリー則定数 [ $\text{Pa} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ ] との相関性、組織/血液分配係数については、疎水性の分配指標である  $\text{pH} 7.4$  のオクタノール/水分配係数 ( $\log D, \text{pH} 7.4$ ) との相関性を解析するとともに、各カテゴリーに属する化学物質の各分配係数の値の分布範囲についても解析した。

生化学的パラメータの  $V_{max}$  [ $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{kg}$ ] と  $K_m$  [ $\mu\text{M}$ ] については、第 I 相の代謝に CYP2E1 が主に関与する物質とその他の酵素 (アルコール脱水素酵素、アルカンモノオキシゲナーゼ等) が関与する物質に分類した。CYP2E1 が関与する物質については分子構造フラグメントの  $V_{max}$  と  $K_m$  への寄与を次式で解析した。

$$\log M = \sum_i C_i \cdot f_i$$

ここで、 $M$  は  $V_{max}$  または  $K_m$ 、 $C_i$  と  $f_i$  は

それぞれ、分子構造フラグメントの寄与率と出現数である。分子構造フラグメントとしては、ベンゼン環、ベンゼン環水素、炭素-炭素二重結合、二重結合炭素に結合する水素、メチル基、メチレン基、メチン基、4級炭素、塩素、臭素の数を選択し、 $C_i$ を重回帰分析により決定した。さらに、CYP2E1が代謝関与する物質とその他の酵素が関与する物質の  $V_{max}$  と  $K_m$  の値の分布範囲についても解析した。

### B-3 各カテゴリーに属する物質のヒトのトキシコキネティクスの特徴把握

上記の B-2 の解析で得られた Category I、IIA および IIB に属する物質の物理化学的パラメータ（空気/血液および組織/血液分配係数）と生化学的パラメータ（ $V_{max}$  と  $K_m$ ）の代表値（中央値を採用）を用いて、肺、肝臓等の 6 組織コンパートメントで構成される Ramsey & Andersen type のヒト PBPK モデルで吸入曝露中と曝露後の各組織の濃度-時間曲線を計算し、各カテゴリーのトキシコキネティクスの一般的な特徴を解析した。計算の条件は以下の通りである。

- ・ 体重：70 kg
- ・ 吸入曝露濃度：100 ppm
- ・ 曝露時間：4 時間
- ・ 濃度計算時間：8 時間

なお、Category IIIについては、物質数が少なく、代表値の設定が難しいため、上記の解析は行わなかった。

（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

### C-1 PBPK モデルパラメータ値の DB

計 667 文献から 208 の一般化学物質のヒ

ト、ラットおよびマウスの物理化学的および生化学的パラメータの値を収集した。これらの情報は、図 1 のように左から、化学物質の特性情報、理化学的および生化学的パラメータ値、そしてその他情報および出典の順に、化学物質ごとに DB 化した（延べ情報数：1103 行×48 列）。

化学物質の特性情報としては、物質No.、Data No.、名称、CAS.No.、SMILES、分子量、LogD, pH7.4、LogP、血漿タンパク質に非結合の割合 (fu)、pKa、水素結合ドナー数、水素結合アクセプター数、総極性表面積を掲載した。SMILES は基本的に U.S. EPA の EPI Suite、分子量、LogD, pH7.4、LogP、血漿タンパク質に非結合の割合 (fu) および pKa については U.S. NTP の Integrated Chemical Environment (ICE)、水素結合ドナー数、水素結合アクセプター数および総極性表面積については、U.S. NIH の PubChem の各公開データベースから値を得た。

物理化学的および生化学的パラメータに関する情報としては、対象生物種、血液/空気分配係数、肝臓、脂肪、高血流、低血流、脳、腎臓、骨髄、皮膚、筋肉、肺の各組織への対空気および対血液分配係数、Michaelis-Menten 型の代謝の  $V_{max}$ 、 $K_m$ 、その他の代謝の 1 次速度定数の値をそれらの値の単位、種類（測定値、推定値、他文献からの引用値等）とともに掲載した。

その他情報としては、消化管吸収速度定数の値、単位および種類を掲載した。さらに、プルダウンメニューにより組織/血液分配係数の組織/空気分配係数への変換、 $V_{max}$  と  $K_m$  の単位変更に伴う値の変換が容易に行えるようにし、使いやすさにも配慮した。

### C-2 ヒト PBPK モデルパラメータの解析

PBPK モデルに必要な一般化学物質の物理化学的および生化学的パラメータの既報値を2年に亘って収集し、200物質超の情報を得た。これまでにヒトPBPKモデルが適用された一般化学物質の多くは、労働者の健康リスクの観点から、脂肪族および芳香族の炭化水素類、ハロゲン化炭化水素類、アルコール・ケトン・エステル・エーテル類等の揮発性の非水溶性および水溶性の溶剤であり、脂肪族と芳香族炭化水素類、フッ素化合物を除くハロゲン化炭化水素類が該当するCategory Iの既報値が最も多く、次いでフッ素化炭化水素類、エーテル類、ケトン類が該当するCategory IIAの既報値が多く、アルコール類が該当するCategory IIBやカルボン酸等が該当するCategory IIIの物質は少なかった。

Category I~IIIの計156物質のヒトの血液/空気分配係数[-]とヘンリー則定数の間には負の強い相関が見られ、バラツキは大きいものの全てのCategoryの物質は同じ回帰直線に従う可能性が示唆された。同様に計126物質のヒトの脂肪/血液分配係数[-]とlog D, pH7.4[-]の間には強い正の相関が見られ、同様にばらつきは大きいものの各Categoryの物質は同じ回帰直線に従う可能性が示唆された。一方、計131物質の肝臓/血液、計122物質の高血流組織/血液および計148物質の低血流組織/血液の各分配係数[-]では、log D, pH7.4[-]との間に強い相関は見られなかった。

血液/空気分配係数は、Category I、IIA、IIBと分子間の相互作用が強くなるに伴い、最小、最大および中央値は高くなる傾向を示し、一方、肝臓/血液、脂肪/血液、高血流組織/血液および低血流組織/血液の各分配係

数では、分子間の相互作用が強くなるに伴い、これらの値は低くなる傾向を示した(表2)。また、Category IIIの各分配係数値の分布は、Category IIBと同様の傾向を示した。

一般化学物質の代謝はほぼ全てのヒトPBPKモデルにおいて、VmaxとKmを用いて表現されている。これらのパラメータが既知の物質の中で、CYP2E1が主たる第I相の代謝に関与する物質の多くはCategory Iに該当し、残りの一部の物質はCategory IIAに該当した。VmaxとKmの対数値と10種の分子構造フラグメントの出現数との間には、重回帰分析により0.81と0.73の補正付き決定係数が得られ、log Vmaxには、炭素-炭素二重結合、二重結合炭素に結合する水素、4級炭素および塩素の出現数が、log Kmには、塩素の出現数が有意な寄与すると示唆された。さらに、代謝にCYP2E1が関与する物質とその他の酵素が関与する物質のVmaxとKmの値の分布は同じ傾向を示し、CYP2E1関与物質とその他の代謝酵素関与物質の間でVmaxとKmの分布に差異は見られなかった。

### C-3 カテゴリーに属する物質のヒトのトキシコキネティクスの特徴把握

各Categoryの化学物質の分配係数、VmaxおよびKmの分布の代表値(中央値)を用いて、Category I、IIAおよびIIBに属する物質のヒトの各組織中濃度-時間曲線をPBPKモデルで推定した結果、内部曝露指標の推定に重要と考えられる血液、肝臓および高血流組織中の濃度変化は、Category IとIIAでは濃度や変化パターンが比較的類似しているのに対し、Category IIBでは違いが大きかった(図2)。また、曝露停止後の濃度の初期半減期もCategory IとIIAで類似

しており、Category IIB よりも短い傾向を示し、Category 間でトキシコキネティクスの違いがあることを示唆した。

#### D. 考察

血液/空気分配係数がヘンリー則定数と、そして脂肪/血液分配係数が  $\log D$ , pH7.4 との強い相関性を示したが、データ数が多く疎水性相互作用の寄与が大きい Category I と II の物質に大きなばらつきが見られ、ヘンリー則定数や  $\log D$ , pH7.4 に加えて新たな説明変数を追加して回帰分析を行うことや Category I や IIA 内の物質をさらに構造あるいはその他の基準で細分化し、その中で傾向分析やリードアクロスにより、分配係数を推定する手法を検討する必要があると考えられた。

生化学的パラメータについては、分子構造フラグメントの寄与率から推定する方法の可能性が示されたことから、本年度は考慮しなかったフッ素、酸素等のフラグメントも考慮して、CYP2E1 以外の酵素が関与する物質も含めて、さらに適用範囲の拡大等を検討する必要があると考えられた。

各 Category の物理化学的および生化学的パラメータの分布には、かなりの幅があるため、各 Category の化学物質のヒトでの吸入曝露後の体内動態をより適切に表現するためには、パラメータの統計分布を考慮できるモンテカルロ法による体内動態の推定と結果の定量的不確実性分析がより適切と考えられる。今後、モンテカルロシミュレーションが可能な PBPK モデルの構築とその不確実性分析への適用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既報値の DB を構築するとともに、DB を用いて、分子間相互作用と代謝に関与する酵素に基づいてカテゴリー化し、ヒトの物理化学的および生物学的パラメータの特徴を明らかにした。さらに、それらを用いて体内動態の特徴を推定できる可能性を確認した。今後は構築した DB の情報を活用し、カテゴリーをさらに適切に細分化する等し、パラメータ値を精緻化することを検討する必要があると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) 生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータの物質群毎の特徴の解析, 明関由里子, 吉田喜久雄, 石田誠一, 山田隆志, 第32回日本リスク学会年次大会 (2019年11月 東京)
- 2) 化学物質のヒト健康リスク評価に対する *in silico* アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第 47 回構造活性相関シンポジウム (2019年12月 熊本)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



表 1 血液/空気および組織/血液分配係数の分類のための Category

Category	Main interaction	Characteristics			Chemicals
		Hydrogen Bond Donor	Hydrogen Bond Acceptor	Ionization	
I	van der Waals Force	×	×	×	Aromatics, Aliphatics, Chlorinated hydrocarbons etc.
IIA	van der Waals Force Dipole-Dipole Interaction	×	○	×	Ethers, Esters, Fluorinated hydrocarbons etc.
IIB	van der Waals Force Dipole-Dipole Interaction Hydrogen Bond	○		×	Alcohols
III	Ion-Ion Interaction	○		○	Acids

表 2 各 Category の物質の分配係数値の分布範囲

	Category I	Category IIA	Category IIB	Category III
(血液/空気分配係数)				
最大値	420	3800	33000	8000
中央値	8.8	9.1	1100	—
最小値	0.06	0.08	380	6100
(肝臓/血液分配係数)				
最大値	21	10	1.6	1.3
中央値	3.2	1.7	1.1	1.1
最小値	0.42	0.12	0.80	0.66
(脂肪/血液分配係数)				
最大値	510	150	2.0	0.77
中央値	60	23	0.57	0.34
最小値	2.1	0.23	0.11	0.32
(高血流組織/血液分配係数)				
最大値	21	10	1.5	1.3
中央値	3.3	1.8	1.2	1.1
最小値	0.42	0.12	0.80	1.1
(低血流組織/血液分配係数)				
最大値	31	33	1.3	1.3
中央値	1.9	1.4	0.67	0.50
最小値	0.08	0.31	0.33	0.50

# 図1 作成したPBPKモデルパラメータのデータベース

(化学物質に関する情報の部分)

Chemical No	Data No.	Chemical	CAS No	SMILES	分子量	OPERA LogD <sub>7.4</sub>	OPERA LogP	OPERA fu	OPERA pKa	OPERA pKa <sub>Basic</sub>	Number of Hydrogen Bond Donor	Number of Hydrogen Bond Acceptor	TPSA Å <sup>2</sup>	対象生物種	血中/空気分配係数
157	43	Tetrachloroethylene	127-18-4	C=C(Cl)(Cl)Cl	163.875	3.37	3.37	0.0234			0	0	0	Mouse	20.0
157	44	Tetrachloroethylene	127-18-4	C=C(Cl)(Cl)Cl	163.875	3.37	3.37	0.0234			0	0	0	Human	10.3
157	45	Tetrachloroethylene	127-18-4	C=C(Cl)(Cl)Cl	163.875	3.37	3.37	0.0234			0	0	0	Rat	18.9
157	46	Tetrachloroethylene	127-18-4	C=C(Cl)(Cl)Cl	163.875	3.37	3.37	0.0234			0	0	0	Mouse	16.9
158	1	Allyl chloride	107-05-1	C=C(C)Cl	76.008	1.761	1.761	0.473			0	0	0	Rat	17.3
158	2	Allyl chloride	107-05-1	C=C(C)Cl	76.008	1.761	1.761	0.473			0	0	0	Rat	17.3
158	3	Allyl chloride	107-05-1	C=C(C)Cl	76.008	1.761	1.761	0.473			0	0	0	Human	2.66
158	4	Allyl chloride	107-05-1	C=C(C)Cl	76.008	1.761	1.761	0.473			0	0	0	Rat	74.1
159	1	Dibromomethane	74-95-3	BrCBr	171.852	1.784	1.784	0.343			0	0	0	Rat	74.1
159	2	Dibromomethane	74-95-3	BrCBr	171.852	1.784	1.784	0.343			0	0	0	Rat	74.1
159	3	Dibromomethane	74-95-3	BrCBr	171.852	1.784	1.784	0.343			0	0	0	Rat	74.1
159	4	Dibromomethane	74-95-3	BrCBr	171.852	1.784	1.784	0.343			0	0	0	Human	19.9
159	5	Dibromomethane	74-95-3	BrCBr	171.852	1.784	1.784	0.343			0	0	0	Rat	161
160	1	Bromofom	75-25-2	C(Br)(Br)Br	249.763	2.434	2.434	0.339			0	0	0	Human	102.3
160	2	Bromofom	75-25-2	C(Br)(Br)Br	249.763	2.434	2.434	0.339			0	0	0	Rat	187
160	3	Bromofom	75-25-2	C(Br)(Br)Br	249.763	2.434	2.434	0.339			0	0	0	Rat	198.1
160	4	Bromofom	75-25-2	C(Br)(Br)Br	249.763	2.434	2.434	0.339			0	0	0	Rat	119
161	1	1,2-Dibromoethane	106-93-4	BrCCBr	185.868	2.057	2.057	0.427			0	0	0	Rat	119
161	2	1,2-Dibromoethane	106-93-4	BrCCBr	185.868	2.057	2.057	0.427			0	0	0	Rat	119
161	3	1,2-Dibromoethane	106-93-4	BrCCBr	185.868	2.057	2.057	0.427			0	0	0	Human	24.8
161	4	1,2-Dibromoethane	106-93-4	BrCCBr	185.868	2.057	2.057	0.427			0	0	0	Rat	...
161	5	1,2-Dibromoethane	106-93-4	BrCCBr	185.868	2.057	2.057	0.427			0	0	0	Rat	...
162	1	n-Propyl bromide	106-94-5	BrCCC	121.973	2.124	2.124	0.656			0	0	0	Rat	11.7
162	2	n-Propyl bromide	106-94-5	BrCCC	121.973	2.124	2.124	0.656			0	0	0	Human	7.08
162	3	n-Propyl bromide	106-94-5	BrCCC	121.973	2.124	2.124	0.656			0	0	0	Rat	11.7
162	4	n-Propyl bromide	106-94-5	BrCCC	121.973	2.124	2.124	0.656			0	0	0	Human	7.08
162	5	n-Propyl bromide	106-94-5	BrCCC	121.973	2.124	2.124	0.656			0	0	0	Rat	5.95
162	6	n-Propyl bromide	106-94-5	BrCCC	121.973	2.124	2.124	0.656			0	0	0	Human	2.57
163	1	Isopropyl bromide	75-26-3	BrC(C)C	121.973	2.132	2.132	0.4			0	0	0	Rat	5.95
163	2	Isopropyl bromide	75-26-3	BrC(C)C	121.973	2.132	2.132	0.4			0	0	0	Human	2.57

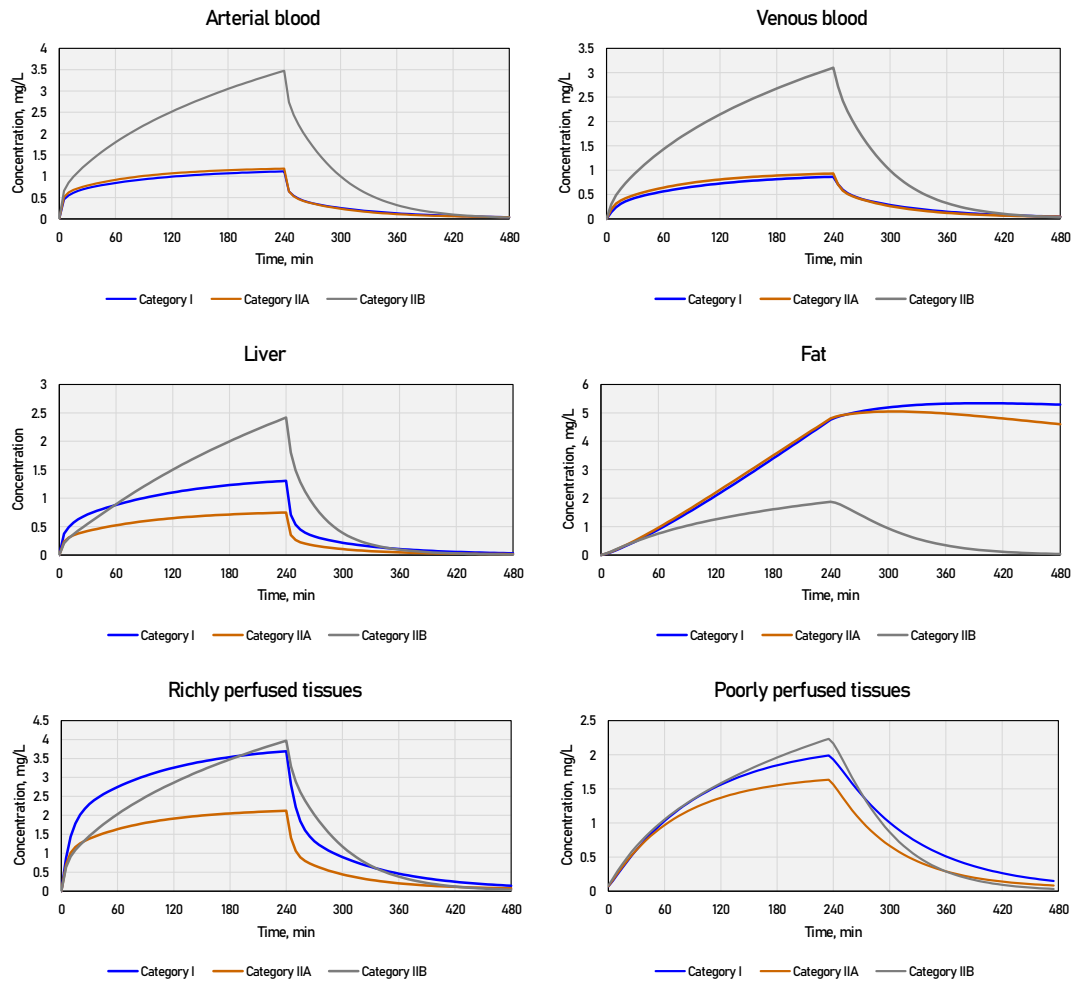
(分配係数およびVmax、Kmに関する部分)

種類	組織への分配係数										Vmax		Km		値の種類
	肝臓	脂肪	高血球	低血球	脳	腎臓	骨髄	皮膚	筋肉	肺	値	単位	値	単位	
組織/血液	2.4	75.0	2.2	3.3							Vmax	0.20 mg/h/kg	0.75	2.0 mg/L	他文献からの引用値
組織/空気	70.3	2300.0	70.3						20.0		Vmax	3.5 mg/h		0.30 mg/L	実験データにフィッティング
組織/空気	70.3	2300.0	70.3						20.0		Vmax	0.068 mg/h		0.30 mg/L	実験データにフィッティング
組織/空気	70.3	2060.0							20.0		Vmax	0.11 mg/h		0.40 mg/L	実験データにフィッティング
組織/血液	38.9	101.0							11.0						
組織/血液	2.2	5.8							0.6						他文献からの引用値
組織/空気	38.9	101.0			7.60	12.3			11.0						他文献からの引用値+推計
組織/空気	3.84	55.5			3.90	2.71			3.26						他文献からの引用値+推計
組織/空気	68.1	792.0							40.5						測定値
組織/空気	68.1	792.0							40.5						測定値
組織/空気	68.1	792.0							40.5						測定値
組織/空気	68.1	792.0			63.7	105.0			40.5						他文献からの引用値+推計
組織/空気	27.6	435.0			25.6	17.0			19.9						他文献からの引用値+推計
															測定値
															測定値
組織/空気	210.3	4129.0	210.3	115.1		173.4					Vmax	10.4 mg/h/kg		0.42 mg/L	測定値
組織/空気	119.0	1219.0			83.3	139.0			45.6						測定値
組織/空気	119.0	1219.0			83.3	139.0			45.6						他文献からの引用値+推計
組織/空気	38.5	578.0			33.0	21.6			25.4						他文献からの引用値+推計
															測定値
															測定値
組織/空気	8.17	236.0							4.21						測定値
組織/空気	8.17	236.0							4.21						測定値
組織/空気	8.41	128.0			15.9	27.7			4.21						他文献からの引用値+推計
組織/空気	4.41	158.0			6.93	4.26			5.30						他文献からの引用値+推計
組織/空気	5.38	80.0			9.75	16.9			4.12						他文献からの引用値+推計
組織/空気	4.41	158.0			4.63	2.93			3.65						他文献からの引用値+推計
									4.12						測定値

(その他情報および出典の部分)

種類	代謝1次速度定数				消化管吸収速度定数				Authors	Year
	値	単位	体積補正係数	値の種類	値	単位	値の種類			
kl	2.0		0.25	他文献からの引用値	0.3	1/h	他文献からの引用値	Clewell, H. J., Gentry, P. R., Kester, J. E., Andersen, M. E.	2005	Evaluation of p
kl	2.73	1/h		実験データにフィッティング				Ward, R. C., Travis, C. C., Hetrick, D. M., Andersen, M. E., and Gargas, M. L.	1988	Pharmacokinetic
kl	0	1/h		実験データにフィッティング				Ward, R. C., Travis, C. C., Hetrick, D. M., Andersen, M. E., and Gargas, M. L.	1988	Pharmacokinetic
kl	1.84	1/h		実験データにフィッティング	0.6	1/h	実験データにフィッティング	Ward, R. C., Travis, C. C., Hetrick, D. M., Andersen, M. E., and Gargas, M. L.	1988	Pharmacokinetic
								Gargas, M. L., Burgess, R. J., Voisard, D. E., Cason, G. H., and Andersen, M. E.	1989	Partition coeff
								DeJongh, J., Verhaar, H. J. K., Hermens, J. L. M.	1997	A quantitative f
								Moulenberg, C. J. W., Vijverberg, H. P. M.	2000	Empirical Rela
								Moulenberg, C. J. W., Vijverberg, H. P. M.	2000	Empirical Rela
								Gargas, M. L., Seybold, P. G., and Andersen, M. E.	1988	Modeling the t
								Gargas, M. L., Clewell, H. J., and Andersen, M. E.	1986	Metabolism of
								Gargas, M. L., Burgess, R. J., Voisard, D. E., Cason, G. H., and Andersen, M. E.	1989	Partition coeff
								Moulenberg, C. J. W., Vijverberg, H. P. M.	2000	Empirical Rela
								Moulenberg, C. J. W., Vijverberg, H. P. M.	2000	Empirical Rela
								Beliveau, M., and Krishnan, K.	2000	Empirical Rela
								Batterman, S., Zhang, L., Wang, S., and Fraunblau, A.	2002	Partition coeff
								Beliveau, M., Charest-Tardif, G., and Krishnan, K.	2001	Blood: air parti
								da Silva, M. L., Charest-Tardif, G., Krishnan, K., and Tardif, R.	1999	Influence of or
								Gargas, M. L., Burgess, R. J., Voisard, D. E., Cason, G. H., and Andersen, M. E.	1989	Partition coeff
								Moulenberg, C. J. W., Vijverberg, H. P. M.	2000	Empirical Rela
								Moulenberg, C. J. W., Vijverberg, H. P. M.	2000	Empirical Rela
								Moulenberg, C. J. W., Vijverberg, H. P. M.	2000	Empirical Rela
								Moulenberg, C. J. W., Vijverberg, H. P. M.	2000	Empirical Rela
								Gargas, M. L., Burgess, R. J., Voisard, D. E., Cason, G. H., and Andersen, M. E.	1989	Partition coeff
								Gargas, M. L., Burgess, R. J., Voisard, D. E., Cason, G. H., and Andersen, M. E.	1989	Partition coeff

図2 吸入曝露中および曝露後のヒトの血液と組織中での濃度変化の比較



## 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
なし							

## 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
Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Briglio A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Friedrichs M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ.	Genetic toxicology in silico protocol.	Regul Toxicol Pharmacol	107	doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403.	2019

Petkov PI, Kuseva C, Kotov S, Honma M, Kitazawa A, Kulkarni S, Schultz TW, Mekenyan OG.	Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of evidence: Application to Ames mutagenicity.	Computational Toxicology	12	doi.org/10.1016/J.COMTOX.2017.02.004	2019
本間正充	化学物質の遺伝毒性評価と定量的構造相関 (Q) SAR)	ポリ衛協会報	65	5-25	2019
本間正充	毒性試験の未来を考える — (定量的) 構造活性相関による化学物質の変異原性評価 —	国立医薬品食品衛生研究所報告	137	20-31	2019
本間正充	食品中に混在する微量な化学物質の安全性評価 — 定量的構造活性相関 (QSAR) による変異原性化学物質の同定 —	日本包装学会誌	29	27-42	2020
Jojima K, Yamada T, Hirose A.	Development of a hepatotoxicity prediction model using in vitro assay data of key molecular events.	Fundam. Toxicol. Sci.	6	327-32	2019
Inoue K, Suzuki H, Yamada T.	Comprehensive toxicity evaluation of cyclopentyl methyl ether (CPME) for establishing a permitted daily exposure level.	Fundam. Toxicol. Sci.	6	145-165	2019
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), Series on Testing & Assessment.	308	1-75	2019

Patlewicz G, Lizarraga L E, Rua D, Allen DG, Daniel AB, Fitzpatrick SC, Garcia-Reyero N, Gordon J, Hakkinen P, Howard AS, Karmaus A, Matheson J, Mumtaz M, Richarz A, Ruiz P, Scarano L, Yamada T, Kleinstreuer N.	Exploring current read-across applications and needs among selected U.S. Federal Agencies.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	106	197-209	2019
Tachibana K, Kass GEN, Ono A, Yamada T, Tong W, Doerge DR, Yamazoe Y.	A Summary Report of FSCJ Workshop "Future Challenges and Opportunities in Developing Methodologies for Improved Human Risk Assessments".	Food Safety	7	83-89	2019
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) に基づいた化学物質の安全性評価へ向けたチャレンジ.	YAKUGAKU ZASSHI	140	481-484	2020
田邊思帆里, 広瀬明彦, Maurice Whelan, 山田隆志.	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.	YAKUGAKU ZASSHI	140	485-489	2020
Matsumoto M, Iso T, Igarashi T, Tanabe S, Inoue K, Hirose A.	Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances(V).	Bull. Natl Inst. Health Sci.	137	66-72	2019
Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Kawamura T, Sakuratani S, Ono A, Hirose A.	Validation of the statistical parameters and model selection criteria of the benchmark dose methods for the evaluation of various endpoints in repeated-dose toxicity studies.	Fundam. Toxicol. Sci.	6	125-136	2019

厚生労働大臣 殿

令和2年3月27日

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴彦

次の職員の令和元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。

- 研究事業名 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
- 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) ・該当する口を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。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元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。



令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元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 短時間非常勤職員  
(氏名・フリガナ) 笠松 俊夫 カサマツ トシオ

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) 未審査の場合は、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。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

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

次の職員の令和元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戦略の開発
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) 未審査の場合は、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。

令和2年3月27日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴

次の職員の令和元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。

- 研究事業名 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 薬理部・第三室長  
(氏名・フリガナ) 石田誠一・イシダセイイチ

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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<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。