

別添1

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
(H30-化学-指定-005)

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 隆志

令和3年(2021年)5月

目次

I. 総括研究報告

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.....1

II. 研究分担報告

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

古濱 彩子、本間 正充.....16

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

杉山 圭一.....30

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.....45

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.....73

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.....96

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....103

令和2年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

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

総括研究報告書

研究代表者 山田隆志 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長

研究要旨

本研究では、化学物質のヒト健康リスクを効率的に評価するための*in silico*手法の高度化と実用化に資するデータベース、毒性発現経路（AOP）、予測モデルの評価と改良を遂行した。

本事業で構築した安衛法 Ames 試験結果の詳細データベースを用いて新規 Ames 試験予測 QSAR モデルの向上を目指した Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトを始動した。1589 物質の予測に挑戦する本プロジェクトに 10 か国 19 チームが参加している。更に、安衛法 Ames 試験結果の詳細データベース更新を進めた。そのデータベース情報から被験溶媒や構造に関する解析と Ames 試験を実施し、QSAR 予測に資する知見の充実を図った。

次いで、*in vitro/in vivo* の遺伝毒性試験結果の相違を、代謝の観点から検討した遺伝毒性予測モデルを構築した。*In vitro* モデルでは、実験的な速度論的データを付与した。更に *in vitro/in vivo* モデルで、付加体の生成量を推定、学習データより陽性となる閾値を設定した。本モデルでは閾値に基づく判定の導入で偽陽性が減少し、*in vitro* 陰性、*in vivo* 陽性といった矛盾する遺伝毒性試験結果について合理的な解釈ができる可能性を示せた。

反復投与毒性については、カテゴリーアプローチの適用範囲の拡大・高度化を図るため、国内外の信頼性が高い反復投与毒性試験データを統合し、大規模データベースを構築した。統合データベースの利用として、神経毒性を対象に毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となる部分構造と体内動態に寄与する物理化学的・生物薬学的パラメータ領域を検討し、一貫性のある神経毒性の評価に資する精度の高い情報の提供を可能とした。

さらに、令和元年度に生殖発生毒性に関するリードアクロスの精度向上を目指して行った毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして新規の AOP を開発するという手法により特定された標的のうちゴナドトロピン放出ホルモン受容体（GnRHR）とヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）に関連した文献調査を行った結果、GnRHR 結合阻害による妊娠損失と、HDAC 阻害による発生毒性の AOP を開発した。

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、令和元年度にデータベース化した化学物質をカテゴリーごとに分類し、分配係数および代謝パラメータ値と物質の特性との相関性を解析し、これらのパラメータ値の推定法を得た。次いで、生理学的薬物動態（PBPK）モデルで化学物質の体内動態を推定し、その妥当性を確認するとともにパラメータ推定値の不確実性等についても定量的に解析し、体内動態推定結果の信頼性を評価した。

研究分担者

本間 正充

国立医薬品食品衛生研究所

副所長

古濱 彩子

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

主任研究官

杉山 圭一

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

部長

山田 隆志

国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部

室長

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

客員研究員

A. 研究目的

試験データのない膨大な数の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。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

ヒトへの毒性を高精度で予測する*in silico*評価技術を確認し、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。データベースを精査すると共に、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第2回国際チャレンジプロジェクトを始動する。また、データベースを解析し、基本構造は同一でAmes試験結果（陽性・陰性）が異なる互変異性体物質について被験溶媒や構造に注目した解析を実施し、要因解明を図り、Ames実試験による検証を行う。更に既存データベースの充実を目的としたAmes試験も実施する。（本間・古濱）

*In vitro*試験の代謝系（肝S9画分）と*in vivo*試験（生体）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。これらの代謝の相違に関する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*遺伝毒性予測の可能性を探る。（杉山）

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、国内外の公開データベースを統合し、

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（NIHS統合DB）を構築する。さらに、化学物質審査規制法（化審法）新規化学物質の毒性試験結果をデータベース化する。それらを有効に活用し、さらに体内動態・代謝・毒性機序等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毒性を評価する手法の高度化を目指す。（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関しては、毒性エンドポイントに関連するキーイベント情報とそれらから構成される AOP に基づいた毒性予測性の向上をめざしており、令和 2 年度は生殖発生毒性の予測性を向上させるための新たな AOP 開発の開発を行うことを目的とする。（広瀬）

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、昨年度に作成したデータベースのヒトの分配係数と代謝パラメータの値に基づく *in silico* 手法を用いてパラメータ推定し、それらを用い PBPK モデルでヒト体内動態を推定する。体内動態の測定データ等との比較により、推定に伴う不確実性等を定量的に解析し、有害性情報の補完における *in silico*-PBPK モデルの有用性を検証する。さらに、OECD で整備を進めるガイダンスのケーススタディに採用された *in silico* 体内動態推定モデルとの比較検証を行う。（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・古濱）

前年度に続けて安衛法試験結果のデータベース精密化を続けると同時に、詳細デー

タベースを用いた Ames/QSAR ツールの予測性の向上を目指す新たな国際チャレンジプロジェクトを開始した。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。更に、基本構造は同一で安衛法 Ames 試験結果（陽性・陰性）が異なる互変異性体の類似化合物の DMSO 溶媒とアセトン溶媒・水溶媒での Ames 試験を実施した。

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

In vitro/in vivo 遺伝毒性試験結果の相違の要因を代謝活性化の観点から比較検討した結果、主要因として代謝酵素の発現と遺伝毒性試験の曝露時間が挙げられた。現行の代謝シミュレーションシステム Tissue Metabolism Simulator System (TIMES) を活用した遺伝毒性予測モデルには、これらの違いが反映される仕組みではない。前者への対応として、*in vivo* 特異的な構造的特徴によるアラートを導入した。後者への対応として、*in vitro* モデルでは、実験的速度論データを付与し、時間の関数として代謝変換の確率を再計算するようにした。更に、*in vivo/in vitro* 両モデルで、従来はアラートに基づき学習データとの適合性を向上させる補正因子を組合せて遺伝毒性の有無を判定していたが、付加体の生成量に対し陽性となる閾値を設定、遺伝毒性の有無を決定した。改変した速度論的モデルの性能を従来の非速度論的モデルと検証した。

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)

国内外の反復投与毒性試験公開データベースの統合では、HESS、COSMOS、FSCJ、RepDose、ToxRef統合データセットについて、データキュレーションを行った。化審法の新規化学物質の毒性試験結果のデータベース化では、上記データベースとの統合を踏まえて、Microsoft Wordファイル形式の過去20年間の審査シート情報をMicrosoft Excelファイル形式のデータに変換した。NIHS統合DBのケミカルスペースの評価は、構造解析ソフトウェアChemotyper (ver.1.0) と統計解析ソフトウェアJMP (ver.14.0.0) を用い、各ケモタイプを持つ物質数のカウントと主成分分析を行った。

NIHS統合DBを利用したカテゴリーアプローチの高度化では、神経毒性影響が懸念される物質について、想定機序を考慮して神経毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となる部分構造(Key Functional Group; KFG)を特定した。続いて、ADMET Predictorを利用して物質の体内動態に寄与する物理化学的及び生物薬学的 (Physico-Chemical Properties: PCP/Bio-Chemical Properties: BCP) パラメータを算出し、神経毒性物質と非神経毒性物質をより正確に区別するパラメータの組み合わせとそれぞれの数値範囲を詳細に検討した。

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)

昨年度は、毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連性、データセットに含まれる物質の数から、GnRHRと生殖毒性の間のシグナルについてのAOPの作成を試みたが、その中

に多く含まれるニトロベンゼン類の調査ではグルタチオンの枯渇による酸化ストレスによる精巣毒性のAOP作成に焦点を当てた。今年度はGnRHRによる本来の生物学的影響の蓋然性に基づき、様々な生殖発生毒性のエンドポイントとGnRHR変調の間の因果関係について文献調査を実施し、GnRHR阻害によるAOPの作成を試みた。また、昨年度のデータセットとToxCast試験結果との相関マイニングによって、発生生殖毒性が潜在すると特定されたHDAC阻害と発生毒性に関連したAOPの作成を試みた。

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)

データベース化した200超の物質を分子間相互作用 (van der Waals力、双極子-双極子相互作用、水素結合、イオン-イオン相互作用) の観点から4カテゴリーに分類し、検討対象物質として選択したエチルtert-ブチルエーテル (ETBE) と同一のカテゴリーの物質について、血液/空気および組織/血液分配係数と物性との相関性を解析した。代謝パラメータ (V_{max} 、 K_m) は、van der Waals力および双極子-双極子相互作用が主に作用する物質を対象に、構造フラグメントの出現数との相関性を解析した。並行して、PBPKモデルを作成し、吸入および経口摂取に伴う化学物質のヒト血中濃度を推定し、既報値と比較し、再現性を検証した。このPBPKモデルにMonte Carlo法を組み込み、回帰式で推定したパラメータ値を用いて、ETBEの吸入曝露に伴うヒト体内動態を不確実性ととともに推定し、WHO文書に従って、各パラメータがモデル推定結果に及ぼす感度と不確実性を定量的に解析し、推定結果の信頼性を評価した。また、OECDのガイド

ンスに示された医薬品等10物質の内分泌かく乱影響の*in vitro-in vivo*外挿 (IVIVE) に関するケーススタディにラットPBPKモデルを適用して同様のIVIVEを実施し、推定結果を比較した。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 結果

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

詳細データベースについて、令和2年度は陰性データ約6000件の更新を行った。

QSARツールの予測性の向上を目指す第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトを始動した。開始当初の2020年3月末では8か国13チームの参加であったが、2021年3月末には10か国19チームの参加となった。これらのチームは国立医薬品食品衛生研究所で精査した12134物質を学習データとして提供を受け、2020年12月末を期限に1589物質の予測に挑戦した。2021年3月時点で全チームから回答が得られた。計算化学ソフトウェアMOEを用いて予測結果を解析中であり、モデル情報の解析も進めていく。また、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30年度は6化合物を試験し、1化合物(4'-(chloroacetyl) acetanilide) が間違っ陽性とデータベース化されていることを明らかにした。平成31年度は2化合物について試験を実施しデータベースの結果の間違いが

無いことが確認できた。令和2年度は3化合物 (*p*-nitrotoluene と 1-chlorobutane と 2,5,8,11-tetraoxadodecane) の試験を実施し、陽性の報告であった1化合物は陰性の間違いと確認できた。更に、基本構造は同一で安衛法Ames試験結果(陽性・陰性)が異なる物質の類似化合物である1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione についてはDMSO溶媒とアセトン溶媒、Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate について水溶媒でのAmes試験を実施し、溶媒や構造に関する検討を行い、すべて陰性の結果が得られた。安衛法で試験された物質では置換基がAmes判定に影響を及ぼしたことが考えられることから、置換基効果を考慮した更なる検討と解析が必要である。

量子化学計算プログラムMOPAC2016のPM7ハミルトニアン計算により試験対象物質の互変異性体のイオン化構造のしやすさやなどの解析を試みたが、解析は容易ではなく、更なる考察と検討も必要であることがわかった。

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 (杉山)

これまでの解析結果から、*in vitro* Ames陰性・*in vivo* げっ歯類トランスジェニック突然変異試験(TGR)陽性4物質の内3物質、*in vitro* 染色体異常試験(CA)陰性・*in vivo*小核試験(MN)陽性12物質の内8物質は、代謝酵素の発現差異が*in vivo*特異的陽性の要因と考察され、残りの物質は遺伝毒性試験の曝露時間が要因と説明付けられていた。

*In vivo*で活性化を受けるTGR3物質およびMN8物質は、酵素発現は*in vivo*代謝系に特異的な一部の第1相代謝物(および一部の

化学物質の第2相代謝物)の生成と関連している。このような代謝物は*in vitro*では得られないことから、非速度論的*in vivo*モデルに*in vivo*特異的アラートを設定し、TGR3物質およびMN8物質の陽性予測が可能になった。

速度論的Amesモデルは、非速度論的Amesモデルにおける偽陽性(FP)率(191物質)と比較してFP率(120物質)が低くなった。一方、偽陰性率は、速度論的Amesモデル(244物質)と非速度論的Amesモデル(247物質)との間に差がなかった。陽性効果の閾値を設定することで、非速度論的CAモデルのFP率(77物質)に比べて速度論的CAモデルのFP率(48物質)が有意に低下した。一方、非速度論的モデルの感度(86%)は、速度論的CAモデルの感度(87%)とほぼ同じであった。陽性効果の閾値を設定することで、非速度論的TGRモデルと比べて速度論的TGRモデルの感度と特異度が高まった。速度論的TGRモデルの高性能は、親化合物ないし代謝物の閾値を設定したことで初めて達せられた。速度論的MNモデルの性能は、特異度(81%)に関して非速度論的MNモデルの特異度(80%)と比較するとわずかに高くなった。しかし、感度に関しては、速度論的MNモデルによる陽性適中数(170物質)は、非速度論的MNモデルにおける陽性適中数(181物質)より少なかった。速度論的MNモデルの感度が低いことは、アラートに対する補正因子および解毒経路の排除によって生じるFPの解消を目的として、効力閾値を高く設定しているため妥当な結果であった。

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)

国内外の反復投与毒性試験公開データベ

ースHESS、COSMOS、FSCJ、RepDose、ToxRefの統合については、化学構造および試験データの重複のチェックを行い、集計を行ったところ、最終的に1550物質、1975試験となった。化審法新規化学物質の毒性試験結果については、過去20年間の審査シートに記載の1183試験データから、化学構造を特定できた有機低分子化合物476物質、499試験結果を同様にデータベース化した。データセット化合物の主成分分析、ケモタイプ分析により、ケミカルスペースの拡大を達成できたことが明らかとなった。化学構造情報から毒性情報を検索するだけでなく、毒性所見から化学構造を検索することが可能となり、カテゴリーアプローチの開発に有用なデータベースを完成させた。

統合データベースを利用して神経毒性が懸念される物質について詳細に解析し、更に機序情報等を精査し、毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となるKFG14種類を特定した。続いて、KFGを有し神経毒性を発現する物質について、神経系への移行性が毒性発現と関連がある可能性を考慮し、物質の体内動態に寄与するPCP/BCPについて、神経毒性物質と非神経毒性物質をより正確に区別するパラメータの組み合わせとそれぞれの数値範囲を詳細に検討した。定義されたカテゴリー領域内に入るものの、神経毒性を発現しないと判定されていたデータセット化合物について、毒性情報を再度詳細に調査したところ、別試験で神経毒性を発現することが明らかになった事例を複数示すことができ、今回検討したアプローチの妥当性と有効性を示唆する結果が得られた。

C.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリ

ドアクロスモデルの精度向上に関する研究 (広瀬)

GnRHRに関するAOPの開発については、GnRHRへの結合阻害が、特に着床と胎盤の発生および機能の妨害を通して妊娠損失の増加を引き起こす可能性があるというエビデンスで裏付けられた。動物におけるエビデンスとしては、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) アゴニストおよびアンタゴニストの両方を用いた前臨床 *in vivo* 毒性試験では、これらのタイプの化合物の投与により胚・胎児毒性が生じる可能性があることが示されている。また、GnRHにより調節されるシグナル伝達分子の遺伝子 (ERK1 および ERK2) を胎盤で選択的にノックアウト (KO) したマウスの試験では、妊娠期間延長、胎盤構造の異常、産仔数減少および新生児死亡率増加が認められた。一方ヒトへの適用可能性については、ヒト胎盤細胞を用いた *in vitro* 試験で、GnRH デカペプチドと GnRHR-I はヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の発現を調節することが示されており、妊娠初期における黄体の維持などの機能を介して、流産など妊娠損失に関連することが想定される。また、GnRH は哺乳類において着床を調節する重要な因子として特定されている。以上の知見を総合して、[GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化 => 着床障害 => 妊娠損失の増加] 及び [GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化 => 胎盤の構造および機能障害 => 妊娠損失の増加] という2系統のAOPを開発した。

HDAC 阻害薬に分類されるいくつかの化合物は、実験動物に催奇形性反応を示し、心欠陥、骨格奇形および神経管閉鎖障害などがある。神経管欠陥は、ヒトとマウスのモデルのみで認められた。HDAC は遺伝子

発現の調節に関与し、HDAC によって促進されるヒストンの脱アセチル化によって遺伝子発現の抑制が生じる。正常な胎芽・胎児発生のためには遺伝子発現の慎重な調節が必要であり、不規則な遺伝子発現による HDAC 機能障害は心奇形や骨発生障害などの多くの発生異常を示す。文献調査の結果、阻害から中軸骨格欠損に至る3系統のAOP (HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => レチノイン酸依存性遺伝子転写の増加=>原腸形成障害 => 中軸骨格欠損; HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => Runt 関連因子2シグナル伝達変調 => 骨形成障害 => 軟骨内骨化障害 => 中軸骨格欠損; HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => 軟骨形成障害 => 軟骨内骨化障害 => 中軸骨格欠損) を開発した。

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)

空気/血液分配係数は、ヘンリー則定数との相関を、肝臓、脂肪、高血流組織および低血流組織と血液間の分配係数は、オクタノール/水分配係数との相関を解析し、線型回帰式を得た。代謝パラメータの解析では Free-Wilson法により12の構造フラグメントとのVmaxおよびKmの線型重回帰式を得た。並行して、トルエン等の吸入曝露およびイソプロパノール等の経口摂取時のヒト体内動態をPBPKモデルで推定し、推定血中濃度を既報測定値と比較した。推定値は、測定値をほぼ再現しており、作成したPBPKモデルの体内動態予測能の妥当性が確認された。さらに、回帰式で推定されたパラメータ値を用いてこのPBPKモデルで推定された吸入ETBEのヒト血中濃度の中央値は、測定値を2倍ほど過大に推定した。感度および不確

実性の解析の結果、内部用量指標のETBEの血中最大濃度および濃度曲線下面積(AUC)には空気/血液分配係数が大きく影響し、体内動態推定の信頼度は中程度と判定された。また、医薬品等10物質の血中濃度を計算し、OECDのケーススタディで報告された値と比較した結果、良い一致が見られ、*in vitro*の内分泌かく乱関連影響の最低影響濃度からIVIVEで外挿された各物質の経口用量も、ケーススタディの値とほぼ一致した。

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・古濱)

QSARの予測精度の向上にはモデルに使用するデータベースの量と質に依存する。安衛法Ames試験報告書は世界最大規模のAmes試験データソースであり、極めて高精度のQSARモデルの開発に有用と考えられるが、有効に利用するためにはデータベースの構築と、試験結果の信頼性の確保が重要である。詳細データベースを提供した第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトの実施によりQSARツールのボトムアップが見込まれ、予測率はさらに向上することが期待できる。専門家による再評価でも結果の判定が困難である場合は、実際にAmes試験を実施し、結果の確認を行うことが重要である。データベース情報を活用した考察と量子化学計算を含む構造の解析も含め、検証作業を繰り返すことにより、QSARの予測能向上が期待できる。

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

*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解析した結果、1) 代謝酵素の発現と、2) 遺伝毒性試験の曝露時間の相違が浮かび上がった。

TIMESの*in vivo*モデルでは、このような知見を基に、複数の臓器が関与することによって生じる新たな*in vivo*アラートの設定が可能なことを示した。*In vitro*遺伝毒性予測モデルには、速度論的視点に加えて、付加体の寄与やその量(代謝物の量)が試験結果に影響を及ぼす閾値を設定した。*In vivo*モデルでは、速度論的な扱いを行う上で実験クリアランスの設定が容易ではなく、クリアランスに基づく直接的な試験時間の寄与の考慮は困難である。しかしながら、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れば、将来ヒト健康リスクを評価する際、対象物質への曝露形態や期間に合わせて臨機応変な予測をする際に応用が期待できる。

今回提案したTIMESによる速度論的モデルを用いることで、*in vitro* Ames陰性・*in vivo* TGR陽性4物質および*in vitro* CA陰性・*in vivo* MN陽性12物質の正しい予測(*in vitro*は陰性、*in vivo*は陽性)が可能となった。

閾値は偽陽性を減らす効果がある反面、速度論的MNモデルに見られるように、感度を下げってしまう懸念もある。陽性物質を含む外部バリデーションによる検証の実施も今後の課題である。

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)

2010年代に入って、国内外で化学物質、農薬、化粧品原材料などの反復投与毒性データベースが開発・更改された。しかしな

がら、それらが別々に存在したままでは、反復投与毒性に対する代替手法として期待されるカテゴリーアプローチの適用範囲拡大は難しい。そこで本研究では、国内外の公開データベースの統合化を遂行した。物質・試験数の拡充、ケミカルスペースの拡大を達成するとともに、共通した部分構造をもつ物質の検索および類似した毒性影響をもつ物質の検索が容易になった。本研究では、肝毒性、血液毒性、神経毒性を対象としたカテゴリーアプローチを検討してきたが、今後は内分泌器官や生殖器等の他臓器毒性に対する統合的アプローチにも利用できる有用なデータソースになると期待される。

NIHS統合DBの有用性を証明する一環として、KFGに基づくグルーピング化による神経毒性に対する予測系構築に取り組んだ。神経毒性発現が未判定若しくは当初負の判定の化合物について、毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となる部分構造KFGと推計PCP/BCPパラメータの利用により神経毒性発現を予測し、追加の文献調査により神経毒性を有することを確認した事例を複数挙げる事ができた。有害性の評価の現場では、毒性試験の投与量設定に依存して神経毒性影響が明瞭でないケースがあり、しばしば評価が困難となっている。神経毒性と関連性が懸念される構造を抽出して、そのグループの特徴や領域を現在可能な範囲で明確にできたことにより、Weight of Evidenceに基づく神経毒性の一貫性のある評価に有用であると期待される。

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

昨年度の毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連性に関するデータセットに含まれる標的の中から、GnRHRと生殖毒性の間のシグナルについてのAOPの作成を試み、そのデータセットに多く含まれるニトロベンゼン類を対象として調査では、結果的にグルタチオンの枯渇による酸化ストレスが引き起こす精巣毒性という初期の想定とは異なるAOPが見いだされることとなった、今年度はGnRHRによる生物学的影響の蓋然性にに基づき、さらなる文献調査を実施した結果、裏付けとなるエビデンスのレビューおよびこれらを整理することにより、標的に関連した発生毒性の原因が存在し、有害性発現に至る妥当な機序の説明が可能であると考えられたため、GnRHR結合を介した妊娠損失の増加に関するAOPを構築することができた。しかし、複数の動物種から得られたエビデンスは、妊娠維持におけるGnRHRの重要性を裏付けているものの、hCGを介した系はヒトおよび一部の高等霊長類でしか観察されていないなどの不確実性が示された。

一方、HDAC阻害AOPについては、HDACの阻害から生じ得るいくつかの有害転帰を記述している。個々のHDACアイソフォームの固有の機能はマウスの遺伝子KO) 試験によって解明されているが、機能の冗長性は全てのアイソフォームに存在し、HDAC阻害薬が多数のアイソフォームをターゲットにする可能性があるため、特定の有害転帰が特定のアイソフォームの攪乱に起因する確実性は低いことや、多数のHDAC阻害薬は動物モデルで催奇形性であり、有害転帰の中でもとりわけ中軸骨格欠損を生じることが明らかにされているが、バルプロ酸および他のHDAC阻害薬については、HDAC

に対する影響に起因する可能性ではないことも示唆されていることなどの、不確実性が残っている。

本研究では、生殖発生毒性を引き起こす GnRHR 結合や HDAC 阻害についての AOP が合成できる可能性があることが明らかとなった。これらの経路の開発は、Lhasa の AOP DART ネットワークにおける既存の知識（エストロゲンシグナル伝達知識と重複）を活用し、データベースにおける経路の知識を拡大する可能性がある。提示した事例研究では、単一の AOP の観点からデータを評価することに焦点を当てた。これらの AOP ネットワークを利用して未解明の部分に新たな毒性機序に関する仮説を立て、AOP 内の各イベントを各種 (*in vitro*) 試験法等に関連付けることで検証を行いながら、新たな試験戦略を構築できる可能性も広がると考えられた。

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

本年度の結果は、吸入曝露濃度や経口摂取量からヒトや実験動物での内部用量指標（最高濃度、AUC、代謝物生成量等）を推定する”forward dosimetry”のみならず、*in vitro*試験液中濃度を *in vivo*投与量に等価な量に変換する”reverse dosimetry”にも PBPK モデルが適用可能なことを示唆していると考えられる。これにより、量-反応評価での種間、曝露経路間の外挿に加えて、IVIVE への適用も可能となり、PBPK モデルは今後ますます一般化学物質の有害性情報の補完においても重要になると考えられる。また、PBPK モデルに Monte Carlo シミュレーション技法を組み合わせることで、生理学的あるいは物質特異的なパラメータに付随す

る不確実性が体内動態推定結果の信頼性に及ぼす影響の程度を定量化でき、補完される有害性情報の信頼性評価を容易にすると考えられる。

E. 結論

遺伝毒性については、これまでの成果を用いて Ames 試験予測 QSAR モデルの向上を目指した第2回国際チャレンジプロジェクトを始動した。その上で、さらなる予測性の向上を目指す Ames 試験や詳細データを活用した解析を進めた。

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曝露時間、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ー 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、速度論的考慮や閾値を設定した新しいモデルを構築した。

反復投与毒性については、国内外の公開反復投与毒性試験データを統合したデータベースを完成させた。化審法新規化学物質の毒性データも統合化を完了した。さらに、統合データベースの利用として、神経毒性を対象に毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となる部分構造と体内動態に寄与する物理化学的・生物薬学的パラメータ領域を検討し、一貫性のある神経毒性の評価に資する精度の高い情報の提供を可能とした。

さらに、生殖毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして新規の AOP を開発するという手法に基づき特定された標的のうち、GnRHR 結合阻害による妊娠損失

と、HDAC阻害による発生毒性のAOPを開発した。

体内動態予測システムの基盤整備では、PBPKモデルは”forward dosimetry”および”reverse dosimetry”に有用であることが示された。さらに、PBPKモデルにMonte Carloシミュレーションを導入することにより、*in silico*-PBPK法による体内動態推定の信頼性評価が可能であることが示唆された。このような定量的な信頼性評価は、IVIVEにおけるPBPKモデルによる”reverse dosimetry”の妥当性を容易にすると考えられる。

F. その他 - OECD他の海外動向と調和活動 -

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た。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誘導体を化審法化学物質インベントリ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2019年のワークショップで紹介し、毒性予測の信頼性向上のためのNew Approach Methodologyの利用に関する助言文書作成（2020年）に貢献した。さらに米国 ICCVAM Read-Across Work Groupでも同ケーススタディを2019年に紹

介し、その後のリードアクロス適用のための基本原則の確立のための議論に継続して参加している。また、欧州食品安全庁EFSAでは、2020年よりリードアクロスのガイダンス作成のための議論を開始した。毒性エンドポイント毎（遺伝毒性、次いで反復投与毒性）にガイダンスをまとめていくことが予定されており、本専門家グループの議論に参加している。ここでも毒性発現につながるキーイベントデータの活用が主要なテーマのひとつとなっている。OECDを軸にして海外諸機関と同手法の国際的なガイダンス作成に継続的に貢献してきた。

2019年のOECD 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に実装されている他の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。同データベースは完成し、QSAR Toolbox事務局と相談の上、2021年1月にOECDに提供した。ヒト毒性エンドポイント予測に関する機能の大きな改良が行われるQSAR Toolbox ver.4.5（2021年前半公開予定）に実装される。

化学物質の体内動態推計は定量的な毒性予測において必須の要素となりつつある。現在OECDの専門家グループによりPBPKモデル検証のガイダンスを取りまとめ中であることから、本分担研究ではこの最新動向を参考にして、体内動態予測の事例研究を実施した。

以上、本研究はOECDを軸とした国際動向に対応しつつ、それら活動の国際的な調和にも貢献した。

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honma M. An assessment of mutagenicity of chemical substances by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 2020; 42:23. doi: 10.1186/s41021-020-00163-1. PMID: 32626544.
- 2) Van Bossuyt M, Raitano G, Honma M., Van Hoeck E, Vanhaecke T, Rogiers V, Mertens B, Benfenati E. New QSAR models to predict chromosome damaging potential based on the *in vivo* micronucleus test. *Toxicol Lett.* 2020; **329**: 80-84. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.016. PMID: 32360788.
- 3) Honma M., Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 2020; 42:32. doi: 10.1186/s41021-020-00171-1. PMID: 3329276
- 4) Shigeta Y, Iso T, Inoue K, Yamada T., Hirose A., Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VI). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* 2020, **138**, 33-39.
- 5) Kawashima A, Inoue K, Yoshizaki Y, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Takano M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Yamada T., Hirose A. Combined repeated-dose and reproductive/developmental oral toxicity of 3-methylpentane, isooctane, and isononane in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* 2020, **7**, 259-279.
- 6) Yamazoe Y, Yamada T., Nagata K. Prediction and Characterization of CYP3A4-mediated metabolisms of azole fungicides: an application of the fused-grid template system. *Food Saf (Tokyo).* 2020, **8**, 34-51.
- 7) Rovida C, Barton-Maclaren T, Benfenati E, Caloni F, Chandrasekera PC, Chesné C, Cronin MTD, De Knecht J, Dietrich DR, Escher SE, Fitzpatrick S, Flannery B, Herzler M, Hougaard Bennekou S, Hubesch B, Kamp H, Kisitu J, Kleinstreuer N, Kovarich S, Leist M, Maertens A, Nugent K, Pallocca G, Pastor M, Patlewicz G, Pavan M, Presgrave O, Smirnova L, Schwarz M, Yamada T., Hartung T. Internationalization of read-across as a validated new approach method (NAM) for regulatory toxicology. *ALTEX.* 2020, **37**, 579-606.
- 8) 山田隆志. IATA の実践および毒性データベースと *in silico* ツールの利用から学んだ知見. フロンティア. 2020, **2(3)**, 133-139.
- 9) Rovida C, Escher SE, Herzler M, Hougaard Bennekou S, Kamp H, Kroese, DE, Maslankiewicz L, Moné MJ, Patlewicz G, Sipes, N, van Aerts L, White A, Yamada T., van de Water B. NAM-supported read-across: From case studies to regulatory guidance in safety assessment. *ALTEX.* 2021, **38**, 140-150.
- 10) Yamazoe Y, Yamada T., Hirose A., Murayama N. Deciphering key

- interactions of ligands with CYP3A4-Template system. *Food Saf (Tokyo)*. 2021, **9**, 10-21.
- 11) Yamada T, Kurimoto M, Hirose A, Yang C, Rathman J. Development of a new threshold of toxicological concern database of non-cancer toxicity endpoints for industrial chemicals. *Front. Toxicol.* 2021, **3**, 1-9.
- 12) Igarashi T, Suzuki H, Ushida K, Matsumoto M, Inoue K, Kanno T, Miwa Y, Ishii T, Nagase T, Katsumata Y, Hirose A. Initial hazard assessment of 1,4-dichlorobutane: Genotoxicity tests, 28-day repeated-dose toxicity test, and reproductive/developmental toxicity screening test in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2020 Apr; 112:104610. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104610. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32032664.
- 13) Shigeta Y, Iso T, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VI). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* 2020, **138**, 33-39.
- 2. 学会発表**
- 1) Regulatory Science and Emerging Technology in Japan. Honma M. Global Summit Regulatory Science 2020 (2020年9月 Online, USA)
- 2) 化学物質の変異原性 *in silico* 評価の精緻化：第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 第6回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2020年11月 Online, 島根)
- 3) Assessment and Control of Mutagenic Impurities in Pharmaceuticals, Honma M, The 5th International Webinar Conference on Pharmaceutical Quality Regulatory Sciences (2020年11月 Online, Korea)
- 4) 医薬品中に存在する変異原性不純物の評価と管理手法の最新動向, 本間正充, 第22回 インターフェックス ジャパン セミナー (2020年11月 幕張)
- 5) 異性体に対する Ames 予測の試みと 2nd Ames/QSAR International Challenge Project の状況, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 日本環境変異原学会第49回大会 (2020年11月 沼津)
- 6) 生活環境で極低レベルで摂取する遺伝毒性発がん物質の安全性評価と管理, 本間正充, 日本環境変異原学会第49回大会基調講演 (2020年11月 沼津)
- 7) ICH-M7 ガイドラインの基本的事項、Q&A の解説及び最近のトピック, 本間正充, 令和2年度関西医薬品協会技術研究委員会研修講演会 (2020年12月 Online, 大阪)
- 8) 化学物質の生殖発生毒性の新しいデータベースの開発とその特徴解析, 三浦 稔, 栗本 雅之, 川村 智子, 牛田 和夫, 井上 薫, 山田 隆志, 栗形 麻樹子, 広瀬 明彦, 第47回日本毒性学会学術大会 (2020年6月 Online)
- 9) 環境化学物質の生理学的薬物動力学 (PBPK) モデリングで使用されるパラメータの構造特異的な特性の評価, 吉田 喜久雄, 明関 由里子, 松本 さおり, 石田 誠一, 山田 隆志, 第47回日本毒性学会学術大会 (2020年6月 Online)

- 10) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用—構造類似物質候補の収集・選択法の確立, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 11) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用—ノナン—1—オール(C₉H₂₀O)の人健康影響評価, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 吉崎 芳郎, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 12) IATA(統合的)アプローチに基づいた皮膚感作性における *in silico* 予測モデルの開発, 鈴木 政晴, 安部 賀央里, 頭金 正博, 山田 隆志, 足利 太可雄, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 13) Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Read Across Workgroup: Towards guiding principles for read-across applications, Rooney J, Lizarraga L, Yamada T, Allen D, Babich M, Daniel A, Fitzpatrick S, Garcia-Reyero N, Gordon J, Hakkinen P, Karmaus A, Kleinstreuer N, Matheson J, Mumtaz M, Rua D, Ruiz P, Scarano L, Volarath P, Patlewicz G. 9th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (Oct. 2020, Online).
- 14) Cosmetics Europe database を使用した *in silico* 皮膚感作性予測回帰モデルの開発, 鈴木 政晴, 安部 賀央里, 頭金 正博, 山田 隆志, 足利 太可雄, 日本動物実験代替法学会第 33 回大会 (2020 年 11 月 Online)
- 15) Constructing Developmental and Reproductive Toxicity Database of Chemicals, DART NIHS DB, for Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). Yamada T, Miura M, Kawamura T, Ushida K, Inoue K, Kuwagata M, Katsutani N, Hirose A. 2021 SOT Annual Meeting and ToxExpo (March. 2021, Online)
- 16) Development of initial environmental risk assessment methods for pharmaceuticals by using Eco-QSAR system. Hirose A, Kobayashi N, Kurimoto M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Yamada T. SETAC Europe 30th Annual Meeting (May 2020, Online)
- 17) OECD における Wnt/beta-catenin シグナルがん悪性化に関連する Adverse Outcome Pathway (AOP)の開発, 田邊 思帆里, 青柳 一彦, Sabina QUADER, Horacio CABRAL, 小野 竜一, 広瀬 明彦, 横崎 宏, 佐々木 博己, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 18) 化学物質の生殖発生毒性の新しいデータベースの開発とその特徴解析, 三浦 稔, 栗本 雅之, 川村 智子, 牛田 和夫, 井上 薫, 山田 隆志, 栗形 麻樹子, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 19) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用—構造類似物質候補の収集・選択法の確立, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦

彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会
(2020 年 6 月 Online)

- 20) 一般化学物質のスクリーニング評価
におけるリードアクロスの適用ーノ
ナンー 1ーオール(C₉H₂₀O)の人健康
影響評価, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 吉崎
芳郎, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆
志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会
学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 21) 食品用器具・容器包装のポジティブリス
トに記載されているナノ物質も含
む無機化学物の遺伝毒性評価, 磯 貴
子, 松本 真理子, 鈴木 洋, 杉山 圭一,
本間 正充, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒
性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 22) 短期的緊急時における人の健康を守
るための水道水中汚染物質濃度の提
案, 松本 真理子, 重田善之, 川村 智
子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦
, 日本毒性学会 (2020 年 6 月 Web 開
催)
- 23) Derivation of Subacute Guidance Values
of Inorganic Metal Contaminants
Controlled by the Drinking Water Quality
Standards in Japan. Matsumoto M,
Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Iso T,
Hirose A. 2021 SOT Annual Meeting and
ToxExpo (March. 2021, Online)
- 24) 環境化学物質の生理学的薬物動力学
(PBPK) モデリングで使用されるパラ
メータの構造特異的な特性の評価, 吉
田 喜久雄, 明関 由里子, 松本 さおり,
石田 誠一, 山田 隆志, 第 47 回日本毒性
学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和2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
研究分担者 古濱 彩子 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官
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、定量的構造活性相関（QSAR）ツールの開発を手掛けている事業者は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）。令和元年度に Ames 試験報告書の入手が可能となったことから、本年度は陰性結果が報告されている物質について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、誤りや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。令和元年度に更新・精査したデータベースを用いて、第2回 Ames/QSAR 国際共同チャレンジプロジェクトを始動させた。1,589 物質の予測に挑戦するプロジェクトには、2021 年度末現在、10 か国 19 チームが参加している。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。その他、安衛法に基づき実施された Ames 試験の結果で、被験溶媒や構造に依存して判定が異なると考えられる物質の類似化合物について Ames 試験を実施し、Ames 予測に関する知見の充実を図った。

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*in silico*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*in silico*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*in silico*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*in silico*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。日本では労働安全衛生法（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）。

令和元年度より、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、令和2年度は試験結果の85%を占め、未着手部分が大半の陰性データを中心に、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、第2回Ames/QSARチャレンジプロジェクトを実施する際に提供することやQSAR予測精度向上に資する考察およびAmes実試験を実施した。以上の取り組みにより、更に予測性の高い*in silico*予測モデルの開発に寄与することを本課題の目的とする。

B. 研究方法

B.1. 詳細Ames試験データベースの整備

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 C：陰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。

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。なお、陽性物質1549と陰性物質16の結果は令和元年度に評価済である。

B.2. 第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトの始動

令和元年度評価したデータベースでは、12,140物質のうち6物質は、評価不能になったことから12,134物質のAmes試験結果と評価済のデータベースを学習データとして、新たに1589物質の予測に挑戦する第2回Ames/QSARチャレンジプロジェクトを始動した。2020年2月12日に国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部のホームページに第1報を掲載した (図1)。

ホームページには、QSARツールの開発を手掛けている事業者だけではなく、大学などのアカデミアなどからの参加を求める旨記載した。参加表明がなされたチームとは機密保持契約への署名を求めた。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署名が得られた参加チームに昨年度整備したデータベースを学習データとして、新

たに予測を実施する1589物質の情報 (構造SMILES、物質名称、CAS番号、SDFファイル) を提供した。予測結果の提出期限は令和2年12月31日に定めた。また、令和2年4月以降も参加希望をしたチームに対する受付を継続的に実施した。

B.3. Ames試験の実施による試験結果の確認と検証

ハンセンデータベースに記載の以下の3化合物についてAmes試験を実施した。

- ① *p*-nitrotoluene (CAS番号 99-99-0)
- ② 1-chlorobutane (CAS番号 109-69-3)
- ③ 2,5,8,11-tetraoxadodecane (CAS番号 112-49-2)

また、安衛法試験報告書で同じ構造を有するが、ナトリウム塩を形成し、互変異性体を取りうる物質 (図2) において、非イオン構造図2-(1)では陽性判定 (被験溶媒DMSO)、イオン構造図2-(2)では陰性判定 (被験溶媒 水) が存在する。置換基 (R_1 、 R_2 、 R_3) をすべて水素に置換した化合物について、溶媒依存性も考慮して、以下の3Ames試験を実施した。

- ④ 1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione (CAS番号 86-93-1 DMSO溶媒)
- ⑤ 1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione (CAS番号 86-93-1 アセトン溶媒)
- ⑥ Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate (CAS番号 15052-19-4)

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Class C陰性物質6149に上った。再評価物質のまとめを表1に示す。青枠内が令和元年度から更新された内容である。

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H₂Oに)。

③標準5菌株それぞれの判定と代謝活性化の有無(S9+/-)

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。Class Cの33物質の判定がClass B(陽性)に変更された(表1)。再判定結果と、判定結果の理由を表3に示す。

残り2980陰性物質の評価を令和3年度中に実施し、データベースの最終化を図る。

C.3. 第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトの実施

本プロジェクトには10か国19チームが参加し、QSAR予測に取り組んだ。参加チーム名(所属)と国名は表4に示す。令和2年3月16日の始動の段階では、13チームが参画し、令和2年4月以降に6チームから新たにプロジェクトの参加表明があった。19チームのうち約半数の9チームが第1回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクト参加チームに該当し、第1回の成果との比較が可能であった。第1回と第2回プロジェクトの概要の比較は表5の通りであり、第1回プロジェクトではPhase IからPhase IIIまで3回のトライアルを実施したが、第2回プロジェクトでは1回のトライアル(Phase IVと呼ぶ)のみを実施した。なお、第1回よりも参加チーム数・国数も増加するとともに、QSARソフトウェアを開発する事業者以外のアカデミア・大学関係機関からの参加が増えた。

令和2年12月31日の予測結果提出期限に間に合わないチームがいくつか見られたが、令和3年3月末現在、全19チームからの回答が得られた。計算化学ソフトウェアMOEを用いて予測結果を解析中である。

C.4. 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6には令和2年度に行った3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ており、陰性の2化合物 (*p*-nitrotolueneと1-chlorobutane) は、Derek Nexusでは陽性、Case Ultraでは既存の陰性(Known negative)とされている。しかしながら、Case UltraでのQSARによる陽性率はそれぞれ、88.6%、85.1%と高く、陰性結果には疑問が残る。ハンセンデータベース陽性の2,5,8,11-tetraoxadodecaneは、Derek Nexusでは陰性、Case Ultraでは既存の陽性(Known positive)とされている。しかしながら、Case UltraでのQSARによる陰性確率は9.5%であり、陰性結果に疑念がある。

プレインキュベーション法によるAmes試験を実施したところ、3化合物全てにおいて陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加も見られなかった。このことから陰性が確認された。

C.5. 構造依存性と溶媒依存性の検討と実証に向けたAmes試験の実施

QSARによるAmes変異原性の予測精度は8割余に向上したことから、*in silico*評価の活用も実用化しつつあり、その精緻化が発がん性の予測にも寄与する。しかしながら、2次元構造に基づくQSARによるAmes予測では、被験溶媒や互変異性体構造の安定性、それらに起因する三次元立体構造の相違がAmes試験結果にどの様に影響するのかは議論が十分でない。通常、化合物の構造異性

体や塩形成物は、同じAmes判定を示すと考えられているが、例外もある。例えば、図2で示す互変異性体を形成する物質（ここでは、R₁、R₂、R₃の一部またはすべてが水素以外の置換基の物質）では、安衛法の試験結果で、塩を形成しない物質図2-(1)では陽性(被験溶媒 DMSO)、塩を形成し、水溶液中でイオン化する物質図2-(2)では陰性(被験溶媒 水)の報告がなされていた。構造の相違と溶媒がAmes試験に寄与することが考えられる。

表7には、置換基 (R₁、R₂、R₃) をすべて水素に置換した化合物である1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione と Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolateについて、それぞれの互変異性体でのAmes/QSAR予測結果を示した。前者は水に不溶な物質であり、後者は水に可溶であることから、それぞれ非イオン、イオン構造を入力構造とした。Derek Nexusの予測結果は非イオン・イオンで同一であるが、Case Ultraの予測では、非イオン構造の互変異性体の一部で陽性(Positive)を示し、陽性確率が65.1%であった。これはトリアジン様構造を有することで、S_N1求核反応によるDNA付加体形成を起こしてAmes陽性につながる(Enoch *et al.* 2012)ことで説明がつく。更に、非イオン構造は芳香族チオール構造をとりうることから、DMSO溶媒中で芳香族に結合したチオール基が酸化反応を起こし、ジスルフィド結合を結合して別の物質を形成(佐藤武雄, 1965)する可能性もあるため、溶媒を考慮に入れた試験も検討する必要があった。

構造及び溶媒の依存性を検証するために実施した1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione と Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate に対

する3試験の結果を表8にまとめた。DMSO、アセトン、水、いずれの溶媒のAmes試験も、プレインキュベーション法で実施され、被験物質の沈殿や生育阻害もみられず、2倍以上のコロニー数の増加と用量反応性も認められず、陰性と確認された。

この他、1-phenyl-2H-tetrazole-5-thioneとSodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate に対するMOPAC2016プログラムのPM7ハミルトニアンによる量子化学計算を実施したが、イオン・非イオン構造での比較は容易ではなく、更なる考察と検討が必要であった。

安衛法で実施された物質については置換基 (R₁、R₂、R₃) がAmes判定に影響を及ぼしたことが考えられることから、置換基効果を考慮した更なる検討と解析が必要である。

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。昨年度判定が変更された 60 物質に加え、33 物質について判定が陰性から陽性に変更された (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。詳細については昨年度報告書で考察したので割愛する。

本データベースでは陰性と判定された 3000 物質弱の再評価がまだ残っている (表 1) が、令和 2 年度の進捗状況から、令和 3 年度中に評価することが可能な範囲である。これらのデータベースは、今後実施が見込まれる Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトでの基礎データとして重要な役割を担い、Ames 試験の溶媒依存性の説明付けなどにも活用が期待される。例えば、QSAR 開発者には、被験物質の純度が低い物質を学習データから除外することで予測精度向上を目指す選択肢が与えられる。アシルハライドもしくはスルホニルハライドの試験では、DMSO 溶媒を用いると副反応で変異原性を有する物質が生成し、溶媒の種類によって Ames 試験結果が異なる (Amberg *et al.*, 2015) 懸念があるため、詳細なデータベース情報が学習データのキュレーションの一助を担うことが期待される。

昨年度精査した安衛法 Ames 試験データベースを学習データとして、第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトを始動させ、前回よりも多種多様なチーム (所属)・モデルによる QSAR 予測結果 (表 5) が得られた。また、前回参加したチームの 75% に相当する 9 チームから継続的な参加を受け、QSAR モデルの更なる改良が期待される。今後、各チームから受け取った予測結果データの解析を進め、モデルや学習データ構築方法などの改善点の提示を含め、QSAR モデルのボトムアップを図る提案を目指す。

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3化合物について Ames 変異原性を確認し、1化合物についてハンセンデータベースや Case Ultra に収集されたデータベースの結果とは異なる結果と詳細情報を得られた。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充を目指す。

また、詳細なデータベースで得られる情報を活用して、互変異性体を取りうる物質やその塩に関して、判定が異なる要因を考察し、溶媒を考慮した Ames 試験を実施し、要因解明の一助を担った。今後、実際に安衛法で試験された物質と比較検証を含めた量子化学計算による調査・研究を実施することで、Ames 判定の要因解明と予測の高度化が期待できる。

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成果を反映して第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトを始動した。さらに、他の既存の Ames 試験データベースの精緻化と構造および溶媒依存性に関する解析と評価も行った。将来的にはこれらデータベースや蓄積された知見は、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) Honma M. An assessment of mutagenicity

of chemical substances by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 2020; 42:23. doi: 10.1186/s41021-020-00163-1. PMID: 32626544.

- 2) Van Bossuyt M, Raitano G, Honma M., Van Hoeck E, Vanhaecke T, Rogiers V, Mertens B, Benfenati E. New QSAR models to predict chromosome damaging potential based on the *in vivo* micronucleus test. *Toxicol Lett.* 2020; 329: 80-84. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.016. PMID: 32360788.
- 3) Honma M., Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 2020; 42:32. doi: 10.1186/s41021-020-00171-1. PMID: 3329276

2. 学会発表

- 1) Regulatory Science and Emerging Technology in Japan. Honma M. Global Summit Regulatory Science 2020 (2020年9月 Online, USA)
- 2) 化学物質の変異原性 *in silico* 評価の精緻化：第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 第6回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2020年11月 Online, 島根)
- 3) Assessment and Control of Mutagenic Impurities in Pharmaceuticals, Honma M. The 5th International Webinar Conference on Pharmaceutical Quality Regulatory

Sciences (2020年11月 Online, Korea)

- 4) 医薬品中に存在する変異原性不純物の評価と管理手法の最新動向, 本間正充, 第22回 インターフェックス ジャパン セミナー (2020年11月 幕張)
- 5) 異性体に対する Ames 予測の試みと 2nd Ames/QSAR International Challenge Project の状況, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 日本環境変異原学会第49回大会 (2020年11月 沼津)
- 6) 生活環境で極低レベルで摂取する遺伝毒性発がん物質の安全性評価と管理, 本間正充, 日本環境変異原学会第49回大会基調講演 (2020年11月 沼津)
- 7) ICH-M7 ガイドラインの基本的事項、Q&A の解説及び最近のトピック, 本間正充, 令和2年度関西医薬品協会技術研究委員会研修講演会 (2020年12月 Online, 大阪)

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



The 2nd AMES/QSAR International Challenge Project

1st Announcement

February 12, 2020

Previously, we conducted the Ames/QSAR International Challenge Project with 12 QSAR vendors to validate and improve their QSAR tools for predicting Ames mutagenicity of chemical substances (<https://www.nihs.go.jp/dgm/amesqsar.html>). The outcome of the project was published in a special issue of *Mutagenesis* (Honma et al., *Mutagenesis* 34, 2-16, 2019). The paper is available [here](#). The paper got good reputation and was received the best paper award of *Mutagenesis* recently. We were convinced that this project was a great success and provided a lot of benefit to QSAR vendors, QSAR users, and regulatory authorities involved in the evaluation of mutagenicity of chemical substances.

Now, we announce to start the 2nd AMES/QSAR International Challenge Project. During recent 5 years, new Ames test results (about 1,600 chemicals) have been accumulated in our Ames database. Using these chemicals as challenge chemicals, we will start the 2nd AMES/QSAR challenge project shortly. If you are interested in participating the new project. Please contact with us as soon as possible. Not only QSAR vendors, but also researchers in academia are very welcome for the participation. Advanced *in silico* models using deep learning or AI are also welcome. We hope that a lot of *in silico* researchers will participate the new project.

Division of Genetics and Mutagenesis,
National Institute of Health Sciences

Kei-ichi Sugiyama (sugiyama@nihs.go.jp)
Ayako Furuhashi (ayako_furuhashi@nihs.go.jp)
Masamitsu Honma (honma@nihs.go.jp)

[変異遺伝部ホームページへ戻る / Back to DGM homepage](#)

Copyright © Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences. All rights reserved.

図1 第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの第1報

http://www.nihs.go.jp/dgm/2nd_amesqsar.html

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

Class	A	B	C	計	Note
総化合物数：第1回プロジェクト直後 (A)	672	1085	10383	12140	
試験報告書が無いもの (B)	44	164	1238	1446	所在確認取れず
試験報告書があり評価が可能な物 (C=A-B)	628	921	9145	10694	
実際に評価した物 (D)	628	921	16	1565	
未評価化合物数 (F=C-D)	0	0	9129	9129	
専門家判断により評価結果が訂正された物 (E)	26	18	16		
専門家判断前後の評価Class増減 (E')	-23	15	2	-6	評価不能 (6)
令和2年3月地点での判定結果 (B+D+F+E')	649	1100	10385	12134	
総化合物数：第2回プロジェクト直前 (A')	12134				
評価物質数 (第2回プロジェクト開始～令和3年3月末)	0	0	6149	6149	
未評価物質数	0	0	2980	2980	
専門家判断による評価結果訂正数	0	0	33	33	
専門家判断前後の評価Class増減	0	33	-33	0	
2021年3月末地点での判定結果	649	1133	10352	12134	

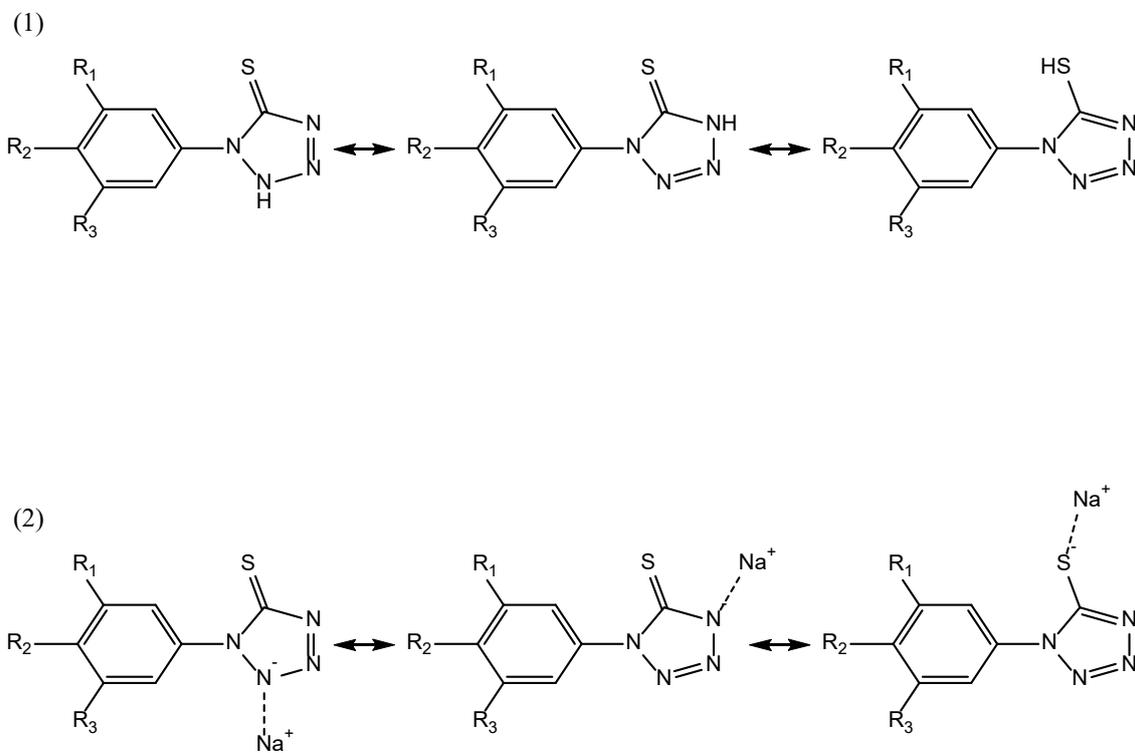


図2 1-Phenyl-2H-tetrazole-5-thione とそのナトリウム塩の互変異性体

表2 入力したデータ例

Serial Id	JNEI No.	Registration No.	Ames Result	CAS#	Chemical Name	Structure	Mol Weight	Formula	JNEI Ph asc	Purity (%)	Solvent	-S8				+S8					
												TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
2159	4-(4)-888	2285	A	97269-99-6	N-(2-benzoyl-1-ethoxycarbonylethyl)acetamide	<chem>CC(=O)N(C)NC(=O)C1=CC=CC=C1C(=O)C</chem>	293.319	C15H19NO5	1	98.3	DMSO	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C
2228	4-(4)-992	2286	A	15121-89-8	3-benzoylacrylic acid ethyl ester	<chem>CCOC(=O)C=C(C(=O)C1=CC=CC=C1)C=C</chem>	204.225	C12H12O3	1	95.1	DMSO	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C

表4 第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト参加チーム

No	チーム	国名	参加表明	備考
1	Shanghai Institute of Organic Chemistry	China	令和3年3月以前	
2	Alttox Ltd.	Brazil	令和3年3月以前	
3	Molecular Networks GmbH and Altamira, LLC (MN-AM)	USA	令和3年3月以前	前回参加
4	Leadscope, Inc.	USA	令和3年3月以前	前回参加
5	Institute di Ricerche Farmacologiche Mario Negri	Italy	令和3年3月以前	前回参加
6	IdeaConsult Ltd.	Bulgaria	令和3年3月以前	前回参加
7	MultiCASE Incorporated	USA	令和3年3月以前	前回参加
8	Lhasa Limited	UK	令和3年3月以前	前回参加
9	Istituto Superiore di Sanità (ISS)	Italy	令和3年3月以前	前回参加
10	Gifu University	Japan	令和3年3月以前	
11	Massachusetts Institute of Technology (MIT)	USA	令和3年3月以前	
12	Simulations Plus, Inc.	USA	令和3年3月以前	前回参加
13	Chemotargets	Spain	令和3年3月以前	
14	LMC (Laboratory of Mathematical Chemistry), Bourgas University	Bulgaria	令和3年4月以降	前回参加
15	The University of Sydney	Australia	令和3年4月以降	
16	Meiji Pharmaceutical University	Japan	令和3年4月以降	
17	Liverpool John Moores University	UK	令和3年4月以降	
18	Evergreen AI	Canada	令和3年4月以降	
19	Politecnico di Milano	Italy	令和3年4月以降	

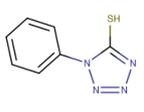
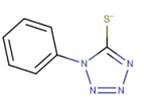
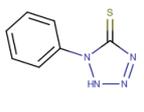
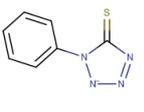
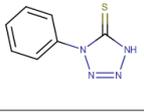
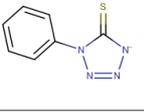
表5 第1回と第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの比較

	第1回プロジェクト	第2回プロジェクト
時期	2014-2017	2020
参加チーム数	7か国12チーム	10か国19チーム
評価回数 (予測物質数)	3回 (Phase I:3902, Phase II:3829, Phase III:4409)	1回 (Phase IV:1589)
学習データ数	Phaseごとに異なる (Phase IIはなし、Phase IIIはI、Phase IIIはIとIIをトレーニングデータとして使 用)	12134 (Phase I-IIIの学習データのうち、6 物質は判定不能になったため12134 物質のAmes試験情報の提供)
参加者	半数は商業ソフトウェアを開発する QSARベンダー	アカデミアからの参加が増加
モデル	統計ベース、ルールベース、コンセン サスモデル	統計ベース、ルールベース、コンセン サスモデルに加え人工知能(AI)を用 いた予測手法を行うチームも参画

表 6 3 化合物の Ames 試験結果

CAS番号	物質名	構造	Hansen DBの結果	Derek MX result and Alert Nexus v220 Derek v1	Inactive reason Nexus v220 Derek v1	CASE ULTRA GT1_BMUT Results 1802 Probability (%)	Ames実施結果	溶媒	結果詳細
99-99-0	p-nitrotoluene		陰性	PLAUSIBLE #329 Aromatic nitro compound		Known Negative 88.6	陰性	DMSO	本試験用量を設定するため、122、488、195、701、313、1250、5000 μg/plateの複数濃度経用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において復帰変異コロニー数の増加が認められなかったため、全用量の認められた経用量の1250 μg/plateを最高用量として以下公比2で除した313、156、313、625、1250 μg/plateの5用量で本試験を実施した。 1) 試験物質による代謝、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生用阻害、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度の625 μg/plate以上の用量で認められた。 3) 復帰変異コロニー数：用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。以上の試験結果より、本試験条件下においてp-nitrotolueneは、細菌に対する遺伝子変異誘発剤と見做されない(陰性)と判定した。
109-69-3	1-chlorobutane		陰性	PLAUSIBLE #027 Alkylating agent		Known Negative 85.1	陰性	DMSO	本試験用量を設定するため、122、488、195、701、313、1250、5000 μg/plateの複数濃度経用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において復帰変異コロニー数の増加が認められなかったため、全用量の認められた経用量の5000 μg/plateを最高用量として以下公比2で除した150、313、625、1250、2500、5000 μg/plateの6用量で本試験を実施した。 1) 試験物質による代謝、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生用阻害、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度の2500 μg/plate以上の用量で認められた。 3) 復帰変異コロニー数：用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。以上の試験結果より、本試験条件下において1-chlorobutaneは、細菌に対する遺伝子変異誘発剤と見做されない(陰性)と判定した。
112-49-2	2,5,8,11-tetraoxadodecane		陽性	INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Known Positive 9.5	陰性	水	本試験用量を設定するため、122、488、195、701、313、1250、5000 μg/plateの複数濃度経用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において、復帰変異コロニー数の増加、生用阻害及び毒性が認められなかったため5000 μg/plateを最高用量として以下公比2で除した313、625、1250、2500、5000 μg/plateの5用量で本試験を実施した。 1) 試験物質による代謝、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生用阻害、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度においても認められなかった。 3) 復帰変異コロニー数：用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。以上の試験結果より、本試験条件下において2,5,8,11-tetraoxadodecaneは、細菌に対する遺伝子変異誘発剤と見做されない(陰性)と判定した。

表 7 互変異性体構造に依存した QSAR 予測結果*

CAS no. 86-93-1 1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione	Derek NX result v230	Derek Nx reasoning overview v230	CASE ULTRA GT1_BMUT Results 1802 (probability)	CAS no. 15052-19-4 Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate	Derek NX result v230	Derek Nx reasoning overview v230	CASE ULTRA GT1_BMUT Results 1802 (probability)
	INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Negative (16.3 %)		INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Out of Domain (16.3 %)
	INACTIVE	Contains unclassified features	Inconclusive (41.0 %)		INACTIVE	Contains unclassified features	Out of Domain (10.8 %)
	INACTIVE	Contains unclassified features	Positive (65.4 %)		INACTIVE	Contains unclassified features	Inconclusive (41.2 %)

*Sodium salt (CAS no. 15052-19-4) では、水中での挙動を模倣して、イオンを入力構造として指定した。

表 8 溶媒を考慮にいれた Ames 試験結果

CAS番号	物質名	Ames実施結果	溶媒	結果詳細
86-93-1	1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione	陰性	DMSO	<p>本試験用量を設定するため、1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、復帰変異コロニー数の増加、生育阻害及び沈殿が認められなかったため5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$を最高用量として以下公比2で除した313、625、1250、2500、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$の5用量で本試験を実施した。</p> <p>1) 被験物質による沈殿: 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生育阻害: 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。 3) 復帰変異コロニー数: 用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において1-phenyl-2H-tetrazole-5-thioneは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。</p>
86-93-1	1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione	陰性	アセトン	<p>本試験用量を設定するため、1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、復帰変異コロニー数の増加、生育阻害及び沈殿が認められなかったため5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$を最高用量として以下公比2で除した313、625、1250、2500、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$の5用量で本試験を実施した。</p> <p>1) 被験物質による沈殿: 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生育阻害: 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。 3) 復帰変異コロニー数: 用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において1-phenyl-2H-tetrazole-5-thioneは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発能を有さない(陰性)と判定した。</p>
15052-19-4	Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate	陰性	水	<p>本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株、いずれの用量段階においても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、それぞれの陰性対照と比較して2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出したそれぞれの陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果の再現性が確認された。陰性対照群は、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それぞれの陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。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。これらの結果から、試験が適切に実施されたと判断した。</p> <p>以上の結果より、本試験条件下において本被験物質は遺伝子突然変異誘発性を有しないと判定した。</p>

令和2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	杉山 圭一	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部	部長
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	古濱 彩子	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部	主任研究官
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・実用化を図ることを目的として、Ames 試験と *in vivo* げっ歯類トランスジェニック動物突然変異試験、あるいは *in vitro* 染色体異常試験と *in vivo* 小核試験のように、基本的には同等のエンドポイントを指標としながら *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を構築した。

In vitro/in vivo の差異をもたらす要因として 1) 代謝酵素の発現、2) 試験における曝露時間が挙げられたが、これまでの代謝シミュレーションシステム（Tissue Metabolism Simulator System: TIMES）を活用した遺伝毒性予測モデルでは十分に考慮されていない。そこで、TIMES の *in vivo* 遺伝毒性モデルで *in vivo* 特異的な構造的特徴によるアラートを設定した。次に *in vitro* 遺伝毒性モデルでは、実験的な速度論的データを付与し、時間の関数として代謝変換の確率を再計算するようにした。更に *in vitro/in vivo* 遺伝毒性モデルで、付加体の生成量を推定、学習データより陽性となる閾値を設定して、遺伝毒性の有無を決定した。従来の TIMES ではアラートに対し、学習データとの適合性を向上させる補正因子（マスク）を組合せて遺伝毒性の有無を判定していたが、補正因子を除くと偽陽性が増加した。本研究で提案したモデルでは付加体の閾値に基づいた判定を行うことで偽陽性が減少した。また、*in vitro* で陰性、*in vivo* で陽性といった矛盾する遺伝毒性データについて合理的な解釈ができる可能性が示せた。

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、ICH（医薬品規制調和国際会議）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

前年度までに、既存の各種データベース

における*in vitro* Ames試験 (Ames) 陰性で*in vivo* 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について、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、それぞれ4物質 (表1)、12物質 (表2) 抽出した。これら物質の代謝情報を収集し、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結果、1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の曝露時間が主要因となった。

In vitro Ames陰性*in vivo* TGR陽性4物質の内3物質 (表1)、*in vitro* CA陰性・*in vivo* MN陽性12物質の内8物質 (表2) については、「1) 代謝酵素の発現」差異が*in vivo* 特異的陽性の要因と考察され、この*in vitro/in vivo* の代謝の違いを代謝予測シミュレータTIMESに反映させることで予測精度が高まることが示されたが、一方、残りの物質については、「2) 遺伝毒性試験の曝露時間」が要因と説明付けられた。これらに対処するには対応するモデルに速度論を導入するなどのTIMESの概念を変える改変が必要と判断した。

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。これまでの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。

B.1. *In vivo*モデルに対するアラートの設定

In vitro Ames陰性の物質が*in vivo* TGR陽性となり、*in vitro* CA陰性が*in vivo* MN陽性となる「1) 代謝酵素の発現」差異に対応するため、非速度論的*in vivo* TGRモデル (ver. 08.08)、*in vivo* MNモデル (ver. 13.13) に新たにアラートを設定した。

B.2. 実験的速度論データを考慮に入れた*in vitro*肝S9代謝シミュレータの導入

TIMESの*in vitro* AmesおよびCA予測モデルで活用される*in vitro*ラット肝S9代謝シミュレータに実験的な速度論データを付与し、時間の関数として代謝変換の確率を再計算するようにした。それにより化学物質が代謝されて生成する反応活性体と標的分子 (DNA/タンパク質) との付加体(adduct)の生成量を推定した。

まず、代謝情報やクリアランス(CI)の実測値を収集し、起こり得る酵素的反応と非酵素的反応をリスト化した。各反応に対して、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CIを再計算し、発生確率 P_i を代謝変換の確率を時間 t の関数 (式1) とし最適化した。

$$P_i = (1 - \exp [-CI * t]) \quad (1)$$

Amesは2時間、CAは6時間と試験時間を定義し、調整した。この時間の相違がAmesとCAの代謝シミュレータの違いとなった。

次に325親化合物・374肝代謝マップからなる学習セットを用いて、オリジナルの*in vitro* S9代謝シミュレータを最適化し、親化合物の安定性を予測した。ここで、安定な化学物質ほど、肝臓で代謝されにくく代謝が「困難」であることと、親化合物の安定性は、その量と関連することを仮定した。化学

物質の安定性評価の原則は表3の通りであり、表3の原則に従って、325化合物は表4の通りに分類された。表4の分類に従い、親化合物から代謝された量(Q : Quantity)の割合 [mol/mol parent]の実験値の定義値に対し、RSS (residual sum of squares, 式2)の最小化を行うことで Q の最適化を行った。 Q は P_i と式3の関係である。

$$RSS_{\min} = \sum_{i=1}^N (Q_i^{obs} - Q_i^{calc})^2 \quad (2)$$

$$Q_n^{calc} = (1 - P_{n+1}) \prod_{m=1 \rightarrow n} P_m \quad (3)$$

ここで、 N は当てはめたデータ数、 Q^{obs} および Q^{calc} はそれぞれ実測量及び予測量を表す。

なお、式1では一次反応速度定数でのCIならば時間に依存しないが、代謝変換の確率は時間の関数となり、確率値に基づいて、化学物質が代謝されて生じる反応活性体と標的分子 (DNA/タンパク質) との付加体の生成量が推定される。例えば、*in vivo* TGR速度論的モデル (28日間) のDNA付加体の量は、*in vitro* Ames速度論的モデル (2時間) の同じ付加体の量よりも多くなりうる。同じことがMN (72時間) にも該当し、DNA/タンパク質付加体の量が、CA (6時間) より多い可能性がある。代謝物生成量が増加するならば、親化合物の量は減少する。

B.3. *in vivo*代謝シミュレータの最適化

*In vitro*代謝シミュレータは、実験的速度論的データと化学物質の安定性評価との両方に基づいて構築された。対照的に、*in vivo* (生体) 代謝シミュレータは複数の臓器が関係するため、実験的な速度論データは入手できないため、化学物質の安定性評価のみに基づいて最適化した。それ以外は、*in vivo*と*in vitro*代謝シミュレータの最適化手順は、基本的に同一とした。ただし、化学の

安定性評価の原則は表5の通りであり、*in vitro*とは異なる記述、追加された構造には赤字を付した。

B.4. 閾値の設定

速度論的モデルの枠組みにおいて、反応活性体代謝物とDNA/タンパク質との相互作用の結果、DNA/タンパク質付加体が生成する概念を取り入れた。B2の最終段落に記載した通り、付加体量は、試験（時間）によって異なり、試験結果（陽性/陰性）にも影響を及ぼす。従来の非速度論的モデルの場合、アラート構造の出現有無と、学習データから実試験結果に合うように導き出された補正因子（マスク）を組合せて、遺伝毒性を予測した。しかしながら、速度論的モデルでは、この様なマスクは適用できないため、学習データに基づく陽性となる閾値を設定し、速度論的モデルを構築した。

閾値を設定する原理は図1の通りである。付加体推定量が閾値を超えている場合は陽性（Positive）となり、超えない場合は陰性（Negative）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. 非速度論的*in vivo*モデルの新アラート

メチルオイゲノール(methyl eugenol, CAS: 93-15-2)に対する*in vivo*-特異的なアラートを例として示す。メチルオイゲノールの*in vivo*の代謝は文献情報と一致するため信頼できる。具体的には、特異的な*in vivo*代謝活性化では第2相硫酸転移酵素が関与しており、DNA反応性求電子剤を産生する代謝物

を生成する(Solheim *et. al*, 1976)ことから、TGRモデルに新たなアラートとして、置換アリルアルコールを設定した。なお、Hondaらは、硫酸転移酵素を用いない標準的なAmes試験ではこの様な求電子反応性第2相代謝物が得られないことを報告していた(Honda *et. al*, 2016)。*In vitro* S9系では得られなかった反応性*in vivo*代謝物である1-(3, 4-ジメトキシフェニル) 硫酸水素アリルが、メチルオイゲノールの*in vivo*代謝シミュレーションで陽性物質として強調表示された(図2)。メチルオイゲノールは親化合物としては陰性であるが、*in vivo*特異的第2相反応性代謝物が生成されると、*in vivo* TGR予測陽性になる。この結果は、実験データと一致する。

非速度論的*in vivo* TGRモデルに*in vivo*特異的なアラートを設定すると、酵素発現の違いがAmesの結果との違いを及ぼすtamoxifen, cyproterone acetateおよびメチルオイゲノールに対し、正しい陽性予測結果が得られこととなった。

同様に、CA陰性で、酵素発現の結果として*in vivo*でMN活性化を受ける8物質（表2）も、酵素発現は*in vivo*代謝系に特異的な一部の第1相代謝物（および一部の化学物質の第2相代謝物）の生成と関連している。このような代謝物は*in vitro*では得られないことから、非速度論的*in vivo* MNモデルに*in vivo*特異的なアラートを設定し、8物質の陽性予測が可能になった。

C.2. 速度論的*in vitro* Ames変異原性モデル

In vitro Amesモデルに対し、方法で示した手順で*in vitro*肝S9代謝シミュレータ学習セット325親化合物に対し最適化手順を適用

した。併せて、化学物質（親化合物および代謝物）とDNAとの相互作用（DNA付加体生成）を考慮するため、301種類の代謝反応（マスクなし）を設定した。速度論的Amesモデル（ver. 02.02）では、14種類のDNA結合アラートの陽性効果に閾値を設定した（表6）。

表7に示すように、非速度論的Amesモデルの性能に比べて速度論的Amesモデルの性能がわずかに高くなった。これは、アラートの適用を調整する役割のマスクの大部分が、速度論的モデルでは排除されていることで説明付けできる。この様なマスクは、非速度論的モデルにおいて速度論的因子を補う役割で使用されていたものである。

また、速度論的Amesモデルに陽性効果の閾値を設定する主目的は、偽陽性予測率を下げることであった。速度論的Amesモデルは、非速度論的Amesモデルにおける偽陽性（FP）率（191物質、表7）と比較してFP率（120物質、表7）が低くなった。一方、偽陰性率は、速度論的Amesモデル（244物質、表7）と非速度論的Amesモデル（247物質、表7）との間に差がなかった。

C.3. 速度論的*in vitro* CAモデル

In vitro CAモデルに対し、方法で示した手順で*in vitro*肝S9代謝シミュレータ学習セット325親化合物に対し最適化手順を適用した。併せて、DNA/タンパク質付加物の形成を考慮するため、377種類の代謝反応を設定した。速度論的CAモデル（ver. 02.02）では、32アラートの陽性効果に閾値を設定した（表8）。

閾値を設定すると、速度論的CAモデルの性能が非速度論的CAモデルの性能に比べて有意に向上した（表9）。非速度論的CAモ

デルにおけるアラート適用を調整する役割のマスクの大半は、速度論的CAモデルでは（閾値が役割を担うため）取り除かれた。

陽性効果の閾値を設定することで、非速度論的CAモデルのFP率（77物質、表9）に比べて速度論的CAモデルのFP率（48物質、表9）が有意に低下した。一方、非速度論的モデルの感度（86%）は、速度論的CAモデルの感度（87%）とほぼ同じであった。

C.4. 速度論的*in vivo* TGRモデル

In vivo TGRモデルに対し、方法で示した手順で*in vivo*代謝シミュレータ学習セット631親化合物の701代謝データに対し最適化手順を適用した。併せて、DNA付加体生成を考慮するため、速度論的Amesモデルと同様に、DNA付加体生成に係る代謝変換も*in vivo*代謝シミュレータに組み込んだ。さらに、速度論的*in vivo* TGRモデルでは、*in vivo*特異的代謝反応も考慮した。この反応は、酵素発現の違いによる*in vitro*と*in vivo*との代謝の差に対処する本研究で設定したアラートに対応する。非速度論的*in vivo* TGRモデルで経験的に規定された*in vivo*解毒経路が、速度論的TGR変異原性モデルでは排除されることに留意し、速度論的TGRモデル（ver. 01.01）では、15アラートの陽性効果に閾値を設定した（表10）。

閾値を設定すると、速度論的TGRモデルの性能が非速度論的TGRモデルの性能よりも高くなった（表11）。他の速度論的モデルと同様、非速度論的TGRモデルのアラート適用を調整するマスクの大部分が、速度論的TGRモデルで取り除かれた。

陽性効果の閾値を設定することで、非速度論的TGRモデルと比べて速度論的TGRモ

デルの感度と特異度が高まった。速度論的TGRモデルの高性能は、親化合物ないし代謝物の閾値を設定した（マスクおよび解毒経路の役割が取り除かれた）ことで初めて達せられた。

C.5. 速度論的*in vivo* MNモデル

In vivo MNモデルに対し、方法で示した手順で*in vivo*代謝シミュレータ学習セット631親化合物の731代謝データに対し最適化手順を適用した。併せて、DNA/タンパク質付加体生成を考慮するため、速度論的CAモデルと同様に、DNA/タンパク質付加体生成に係る代謝変換も*in vivo*代謝シミュレータに組み込んだ。さらに、速度論的*in vivo* MNモデルでは、*in vivo*特異的代謝反応も考慮した。

アラートを有する化学物質は、DNA/タンパク質付加物の量が高分子に損傷を生じるほど十分でない場合は、MN陰性となる可能性があるため、速度論的MNモデル（ver. 01.01）では、55アラートの陽性効果に閾値を設定した（表12）。

アラートに閾値を設定すると、表13に示す通りとなった。

速度論的MNモデルの性能は、特異度（81%）に関して非速度論的MNモデルの特異度（80%）と比較するとわずかに高くなった。しかし、感度に関しては、速度論的MNモデルによる陽性適中数（170物質、表13）は、非速度論的MNにおける陽性適中数（181物質、表13）より少なかった。速度論的MNモデルの感度が低いことは、モデルのアラートに対するマスクと解毒経路が除かれたことにより生じるFPを解消するために閾値を高く設定していることから、妥当な結果ではあった。

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解析した結果、1) 代謝酵素の発現と、2) 遺伝毒性試験の曝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を改めて確認した。TIMESのモデルでは、このような知見を基に、複数の臓器が関与することによって生じる新たな*in vivo*アラートの設定が可能なことを示した。

*In vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異のもう一つの主因、遺伝毒性試験の曝露時間の相違については、TIMESの*in vitro*遺伝毒性予測モデルに速度論的視点に加えて、*in vivo/in vitro*モデルで付加体の寄与やその量（代謝物の量）が試験結果に影響を及ぼす閾値を設定した。

*In vivo*モデルでは、速度論的な扱いを行う上で実験クリアランスの設定が容易ではなく、クリアランスに基づく直接的な試験時間の寄与の考慮は容易ではない。また、プロトコール上の曝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。しかしながら、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れば、将来ヒト健康リスクを評価する際、対象物質への曝露形態や期間に合わせて臨機応変な予測をする際に応用が期待できる。

表1と表2には、*in vitro*陰性と*in vivo*陽性物質の速度論的モデルの予測結果も示す。酵素の発現と試験の曝露の要因を考慮に入れた速度論的モデルでは、正しい予測が可能

となった。

ただし、閾値の設定はFPを減らす効果がある反面、速度論的MNモデル（表13）に見られるように、感度を下げた偽陰性を増大させる懸念もある。陰性候補予測には効果的であるが、化学物質のスクリーニング評価には不適切であり、陽性物質を含む外部バリデーションによる検証も今後の課題である。

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曝露時間、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、速度論的考慮や閾値を設定した新しいモデルを構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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 *In vitro* Ames/*in vivo* TGR の試験結果差異の検証・TIMES 予測結果*

CAS; 名称	<i>in vitro</i> Ames		<i>in vivo</i> TGR		代謝の相違の要因
	実験結果	速度論的モデル (02.02)	実験結果	速度論的モデル (01.01)	
10540-29-1; Tamoxifen	Negative	Negative	Positive	Positive	代謝酵素発現
427-51-0; Cyproterone acetate	Negative	Negative	Positive	Positive	代謝酵素発現
93-15-2; Methyl eugenol	Negative	Negative	Positive	Positive	代謝酵素発現
604-75-1; Oxazepam	Negative	Negative	Positive	Positive	遺伝毒性試験の曝露時間

*Negative:陰性、Positive:陽性

表2 *In vitro* CA/*in vivo* MNの試験結果差異の検証・TIMES予測結果*

CAS; 名称	<i>in vitro</i> CA		<i>in vivo</i> MN		代謝の相違の要因
	実験結果	速度論的モデル (02.02)	実験結果	速度論的モデル (01.01)	
62-55-5; Thioacetamide	Negative	Negative	Positive	Positive	代謝酵素発現
79-34-5; 1,1,2,2-Tetrachloroethane	Negative	<u>Negative</u>	Positive	Positive	代謝酵素発現
51-79-6; Urethane	Negative	<u>Negative</u>	Positive	Positive	代謝酵素発現
1937-37-7; C.I. Direct black 38	Negative	<u>Negative</u>	Positive	Positive	代謝酵素発現
58-25-3; 3H-1,4-Benzodiazepine-2-amine,7-chloro-N-methyl-5-phenyl-,4-oxide	Negative	Negative	Positive	Positive	代謝酵素発現
513-37-1; 2,2-dimethylvinyl chloride	Negative	Negative	Positive	Positive	代謝酵素発現
599-79-1; Sulfasalazine	Negative	Negative	Positive	Positive	代謝酵素発現
366-70-1; Procarbazine hydrochloride	Negative	<u>Negative</u>	Positive	Positive	代謝酵素発現
439-14-5; Diazepam	Negative	Negative	Positive	Positive	遺伝毒性試験の曝露時間
1912-24-9; Atrazine	Negative	Negative	Positive	Positive	遺伝毒性試験の曝露時間
300-62-9; Amphetamine	Negative	Negative	Positive	Positive	遺伝毒性試験の曝露時間
842-07-9; 1-Phenylazo-2-naphthol (CI Solvent yellow 14)	Negative	<u>Negative</u>	Positive	Positive	遺伝毒性試験の曝露時間

*Negative:陰性、Positive:陽性。赤字下線はTIMES非速度論的モデルNon-kinetic *in vitro* CA モデル (17.17)では陽性を示す。なお、TIMES非速度論的モデルNon-kinetic *in vivo* MN モデル (13.13)では、12物質全て陽性の予測結果であった。

表3 *in vitro* 肝 S9 代謝における化学物質の安定性評価の原則

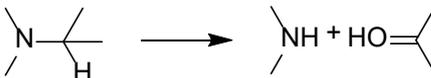
No.	構造	肝代謝の受けやすさの評価(TIMES 開発者共同研究者の専門的知見)
i.	芳香族炭化水素	通常は最初にエポキシ化による代謝を受ける。多環式芳香族炭化水素(PAH)の場合、二重結合性の高い C-C 結合が通常、最もアクセスしやすい。その後は様々な経路がある。PAH の場合、例えば、加水分解によってエポキシ化環がシクロヘキサジエン-ジオール (他の環と融合しうる) に変換され、さらに水を失ってフェノールとなることもあれば、キノンへの酸化、PAH の場合はさらにエポキシ化を受けてジオール-エポキシドとなることがある。PAH (ここでは芳香環が 4 つ以上のもの) を VE(Very Easy:非常に容易)、その他の芳香族を E(Easy:容易)に分類する。芳香族中のメチル基はアリル-CH ₂ OH 基に変換される可能性があり、これは硫酸またはグルクロン酸と抱合することができる。これらを E に分類する。
ii.	芳香族アミン	これは芳香族と同様の代謝経路をたどるが、アミノ基も代謝されることがある。酸化によってヒドロキシルアミンになると、硫酸またはグルクロン酸と抱合する場合や、さらに酸化されてニトロソ化合物となる場合、アセチル化の次に N-ヒドロキシル化されたあとに抱合を受ける場合がある。このようなものを E に分類する。窒素に 1 つまたは 2 つのアルキル基を有する芳香族アミンは、アルキル基の酸化による脱アルキル化を受ける可能性がある。このようなものも E に分類する。
iii.	芳香族ニトロ化合物	ニトロソ化合物に還元され、さらにヒドロキシルアミンとなる (しかし通常は直接にアミンとはならない)。また、アリル炭化水素と同様の代謝経路をたどる可能性がある。このようなものを E に分類する。
iv.	アゾ芳香族化合物	一般構造は ArN=NAr である。このようなものは非常に容易に還元されてアミン ArNH ₂ となり、さらに上述の芳香族アミンとして代謝される。このようなもののほとんどを VE に分類する。
v.	フェノール	通常、硫酸またはグルクロン酸との抱合によって非常に容易に代謝される。このようなもののほとんどを VE に分類する。
vi.	エポキシド	いくつかのエポキシドは高い求電子反応性を有し、これを構造アラートによって認識することができる。これを直接(Direct)(S _N 2)に分類した。ほとんどのエポキシドは加水分解によって非常に容易に代謝されてジオールとなり、さらに硫酸またはグルクロン酸との抱合などによって代謝される。Direct に分類されなかったエポキシドを全て VE に分類した。
vii.	脂肪族アルコール	一級アルコールは、硫酸化またはグルクロン酸抱合を受けやすい。この多くを E に分類したが、VE の方が適切である可能性がある。部分構造-C=C-CH ₂ OH および Ar-CH ₂ OH を有するアルコールを VE に分類する。
viii.	脂肪族炭化水素	分析したデータセットに飽和炭化水素は含まれていない。炭素数が 3 を超える直鎖アルキル基を有するものは末端のメチル基が初期酸化されて代謝されるため、このようなものがあれば E に分類する。オレフィンも E とする — このようなものは代謝によってエポキシドとなり、さらに代謝されてジオールおよびその抱合体となり得る。
ix.	エーテル	通常、酸化的に開裂してアルコールとカルボン酸 (芳香族エーテルの場合はフェノールとカルボン酸) になるため、ほとんどを E に分類した。
x.	ハロゲン置換体	ハロゲンの作用は、有意な作用がないものから代謝が非常に困難なものまで様々である。代謝反応が起こる可能性のある部位における相対的な反応性にハロゲン置換基がどのような影響を及ぼすかという機構的な評価に従って分類した。

表4 代謝されやすさと親化合物から代謝された量 Q [mol/mol parent] の実験値の定義 *

代謝されやすさ	<i>in vitro</i> 代謝物親化合物数	定義した実測値 Q (=範囲の平均)	実測値 Q の範囲
困難	37	0.875	[0.75; 1]
容易~困難	22	0.625	[0.5; 0.75]
容易	169	0.375	[0.25; 0.5]
非常に容易	97	0.125	[0; 0.25]

* $Q=0$ は親化合物がすべて代謝され、 $Q=1$ は親化合物が代謝されていないことを示す。

表5 *in vivo* 代謝における化学物質の安定性評価の原則*

No.	構造	<i>in vivo</i> 代謝の受けやすさの評価(TIMES 開発者共同研究者の専門的知見)
i.	芳香族炭化水素	通常は最初にエポキシ化による代謝を受ける。多環式芳香族炭化水素(PAH)の場合、二重結合性の高い C-C 結合が通常、最もアクセスしやすい。その後は様々な経路がある。PAH の場合は、例えば、加水分解によってエポキシ化環がシクロヘキサジエン-ジオール (他の環と融合する) に変換され、さらに水を失ってフェノールとなることもあれば、キノンへの酸化、PAH の場合はさらにエポキシ化を受けてジオール-エポキシドとなることがある。PAH (ここでは芳香環が 4 つ以上のもの) を VE、その他の芳香族を E(Easy:容易)に分類する。PAH では、この代謝は (PAH の極度皮膚感作能および肺発癌性から明らかなように) 肝臓以外の臓器で容易に発生する。
ii.	芳香族中のメチル基	アリル-CH ₂ OH 基に変換される可能性があり、これは硫酸またはグルクロン酸と抱合することができる。このようなものを E に分類する
iii.	芳香族アミン	これは芳香族と同様の代謝経路をたどるが、アミノ基も代謝されることがある。酸化によってヒドロキシルアミンになると、硫酸またはグルクロン酸と抱合する場合や、さらに酸化されてニトロソ化合物となる場合、アセチル化の次に N-ヒドロキシル化されたあとに抱合を受ける場合がある。このようなものを E に分類する。窒素に 1 つまたは 2 つのアルキル基を有する芳香族アミンは、アルキル基の酸化による脱アルキル化を受ける可能性がある。このようなものも E に分類する。
iv.	脂肪族アミン	このようなものは通常、α 炭素で初期酸化されることによって容易に代謝される:  逆反応も容易に進行し、アミンとカルボニル化合物との間の相互変換がどの種でも代謝に重要な役割を果たす。ここで検討する脂肪族アミンの大部分を VE(Very Easy:非常に容易)または E に分類する。
v.	芳香族ニトロ化合物	ニトロソ化合物に還元され、さらにヒドロキシルアミンとなる (しかし通常は直接にアミンとはならない)。また、アリル炭化水素と同様の代謝経路をたどる可能性がある。このようなものを E に分類する。
vi.	アゾ芳香族化合物	一般構造は ArN=NAr である。このようなものは非常に容易に還元されてアミン ArNH ₂ となり、さらに上述の芳香族アミンとして代謝される。このようなもののほとんどを VE に分類する。
vii.	フェノール	通常、硫酸またはグルクロン酸との抱合によって非常に容易に代謝される。化合物が極めて疎水性であるか、フェノール基が阻害されていない限り、このようなものの大部分を VE に分類する。
viii.	エポキシド	いくつかのエポキシドは高い求電子反応性を有し、これを構造アラートによって認識することができる。これを直接(Direct)(S _N 2)に分類した。ほとんどのエポキシドは加水分解によって非常に容易に代謝されてジオールとなり、これはさらに、硫酸またはグルクロン酸との抱合などによって代謝される。直接(Direct)に分類しなかったエポキシドをすべて VE に分類した。
ix.	脂肪族アルコール	一級アルコールは、硫酸化またはグルクロン酸抱合を受けやすい。この大部分を VE に分類した。部分構造-C=C-CH ₂ OH および Ar-CH ₂ OH を有するアルコールは常に VE に分類する。
x.	脂肪族炭化水素	炭素数が 3 を超える直鎖アルキル基を有するものは、末端のメチル基が初期酸化されて代謝されるため、E に分類した。オレフィンも E とする。このようなものは代謝によってエポキシドとなり、さらに代謝されてジオールとその抱合体となり得る。高度に分岐した構造を有するいくつかのパラフィンも H(Hard:困難)に分類する。
xi.	エーテル	これは通常、酸化的に開裂してアルコールとカルボン酸 (芳香族エーテルの場合はフェノールとカルボン酸) になる。このため、そのほとんどを E に分類した。
xii.	ハロゲン置換体	ハロゲンの作用は、有意な作用がないものから代謝が非常に困難なものまで様々である。代謝反応が起こる可能性のある部位における相対的な反応性にハロゲン置換基がどのような影響を及ぼすかという機構的な評価に従って分類した。

xiii.	ポリハロゲン化（フッ素を含まない）化合物	通常極めて疎水性であり、脂質に分配されるためにバイオアベイラビリティが低く、代謝が極めて遅い可能性がある。
xiv.	エステル	酵素的加水分解が関与しており、代謝されやすさにばらつきがある。通常、胃内の強酸化条件によって非酵素的に加水分解される。
xv.	リン酸エステル	このようなものはカルボン酸エステルより酸加水分解されにくく、経口投与された場合、胃を経ても効果を保持する可能性が高い。しかし、通常は酵素的に加水分解されやすい。

*留意事項：多くの化合物は上記の構造的特徴をいくつも有しており、*in vivo* では複数の並列経路で代謝されると考えられる。この評価は、初期代謝段階が最も容易であるとの判断に基づいており、必要に応じて、バイオアベイラビリティの問題（生来代謝されやすい特徴を有する化合物が脂肪組織に高度に分配される可能性が高い場合等）を考慮に入れている。

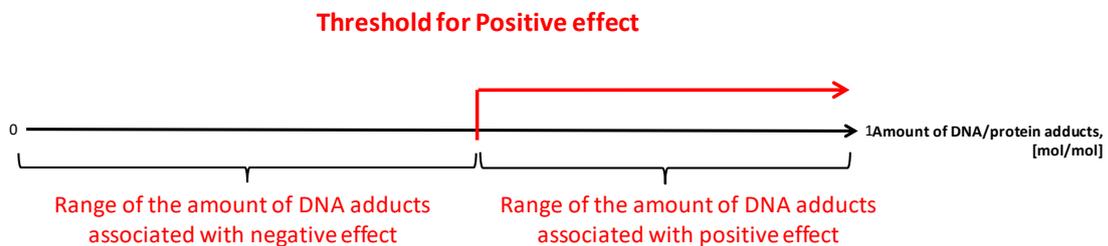


図1 閾値量を設定する際の原則

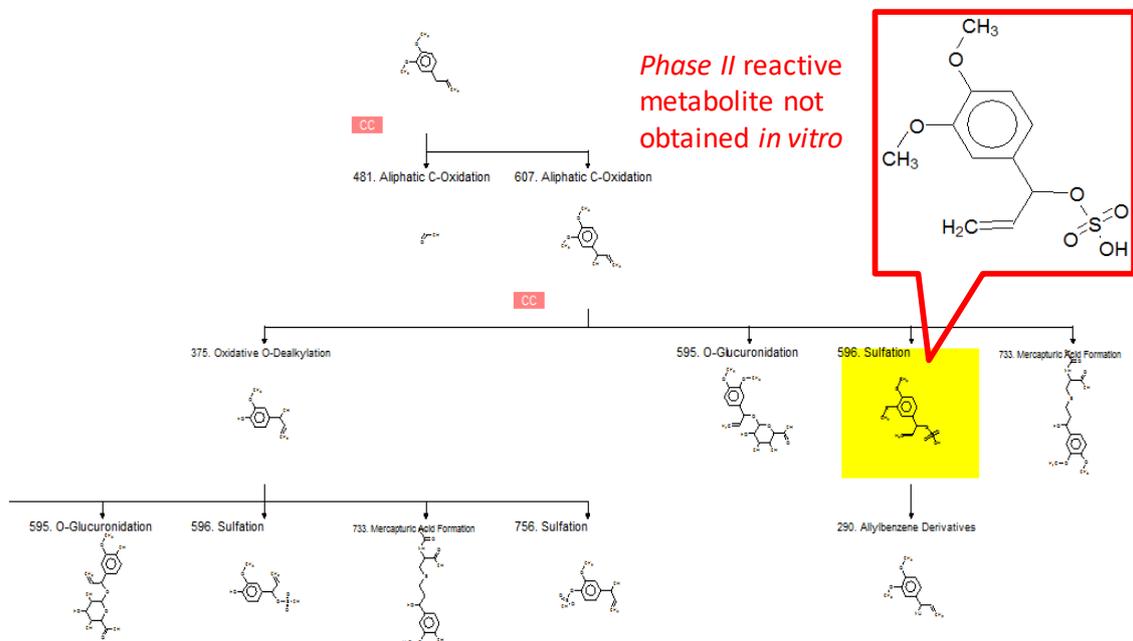


図2. メチルオイゲノール (CAS: 93-15-2) の *in vivo* 代謝シミュレーションマップ

表6 DNA付加体量に対して閾値を設定した Ames モデルの性能

#	アラート名称	実験		予測		閾値 [mol/mol]	
		陽性	陰性	陽性	陰性	代謝物	親化合物
1	アクリドン、チオキサントン、キサントン、フェナジン誘導体	65	1	65	1	0.06	-
2	リン酸アルキル、チオリン酸アルキル、ホスホン酸アルキル	29	8	29	7	0.25	0.55
3	アントロン	3	1	3	1	0.41	-
4	ジアゼン、アゾキシアルカン	38	2	38	2	0.02	-
5	ジカルボニル化合物	44	50	44	35	0.20	-
6	エポキシド、アジリジン	226	58	226	56	0.14	0.53
7	N-ヒドロキシルアミン	388	33	388	19	0.11	0.55
8	ニトロアニリン誘導体	129	20	129	16	0.51	-
9	ポリニトロアレーン	14	-	14	-	0.50	-
10	キノンイミン、チオニン、Phenoxazinium 誘導体	34	13	34	11	0.05	-
11	キノン、トリヒドロキシベンゼン	87	28	87	15	0.03	-
12	単環置換された第1級芳香族アミン	226	62	226	44	0.53	0.22
13	特殊なイミンとチオール誘導体	15	4	15	3	0.40	0.47
14	チオール	24	14	24	14	0.45	0.88

表7 非速度論的/速度論的 TIMES *in vitro* Ames モデルの性能比較

非速度論的 Ames モデル (17.17)	陰性 実験	陽性 実験	合計	Con-cordance	速度論的 Ames モデル (02.02)	陰性 実験	陽性 実験	合計	Con-cordance
陰性予測	1882	247	2129	0.91	陰性予測	1953	244	2197	0.94
陽性予測	191	1245	1436	0.83	陽性予測	120	1248	1368	0.84
合計	2073	1492	3565	0.88	合計	2073	1492	3565	0.90

表8 DNA/タンパク質付加体量に対して閾値を設定した CA モデル性能

#	アラート名称	実験		予測		閾値 [mol/mol]	
		陽性	陰性	陽性	陰性	代謝物	親化合物
1	ニトロアニリン誘導体	11	8	17	2	0.15	0.40
2	Geminal ポリハロアルカン誘導体	10	4	13	1	0.10	0.65
3	アレーンスルホンアミド	10	1	9	2	-	0.65
4	電気吸引性基を持つハロアルケン	4	5	4	5	0.35	0.65
5	α 位が活性化したハロアルカン	8	1	8	1	-	0.65
6	ヘテロアレーンスルホンアミド	2	1	2	1	-	0.70
7	ジカルボニル化合物	20	3	22	1	0.01	-
8	カルボン酸アミド	7	3	9	1	0.50	-
9	Halogenated vicinal 炭化水素	14	1	14	1	0.02	0.58
10	α,β 不飽和カルボニルおよび関連化合物	28	7	31	4	0.20	0.40
11	特殊なイミンとチオール誘導体	4	1	4	1	0.07	0.86
12	α,β 不飽和アルデヒド	2	1	2	1	-	0.65

13	パラ位置換したモノニトロベンゼン	1	1	1	1	-	0.33
14	電気吸引性基を持つ非芳香族共鳴系	4	1	4	1	-	0.30
15	キノロン誘導体	0	1	0	1	-	0.40
16	ピリミジン、プリン	12	1	12	1	0.15	-
17	ポリニトロアレーン	4	4	5	3	0.20	0.50
18	N-ヒドロキシルアミン	65	12	69	8	0.16	-
19	置換アニリン	47	15	59	3	0.15	-
20	キノン、トリヒドロキシベンゼン	20	2	21	1	0.007	-
21	ニトロフェノール、ニトロフェノールエーテル、ニトロ安息香酸	9	2	10	1	0.18	-
22	キノンイミン、チオニン、Phenoxazinium 誘導体	6	3	8	1	0.045	-
23	ベンゾキノン、アクリジン誘導体	9	1	9	1	-	0.40
24	エポキシド、アジリジン	84	34	71	47	0.23	-
25	ジアゼン、アゾキシアルカン	24	2	25	1	0.15	-
26	イソシアネート、ジイソシアネート	6	2	7	1	0.15	0.50
27	アトラジン誘導体	1	2	1	2	0.60	0.60
28	置換フェノール	57	25	61	21	0.20	-
29	フェニル-アゾ-ナフトール誘導体	0	1	0	1	0.70	-
30	単環置換された第1級芳香族アミン	42	12	50	4	0.13	-
31	パラアミノビフェニル誘導体	1	1	2	0	0.10	-
32	ヒドロキサム酸	4	2	3	3	0.25	-

表9 非速度論的/速度論的 TIMES *in vitro* CA モデルの性能比較

非速度論的 CA モデル (17.17)	陰性 実験	陽性 実験	合計	Con- cordance	速度論的 CA モデル (02.02)	陰性 実験	陽性 実験	合計	Con- cordance
陰性予測	240	74	314	0.76	陰性予測	269	72	341	0.85
陽性予測	77	464	541	0.86	陽性予測	48	466	514	0.87
合計	317	538	855	0.82	合計	317	538	855	0.86

表10 DNA 付加体量に対して閾値を設定した TGR モデル性能

#	アラート名称	実験		予測		閾値 [mol/mol]	
		陽性	陰性	陽性	陰性	代謝物	親化合物
1	共役ニトロアルケン、5員環芳香族ニトロ複素環式化合物	2	1	2	1	-	0.28
2	ジアゼン、アゾキシアルカン	0	1	0	1	0.20	-
3	ジカルボニル化合物	1	3	1	3	0.55	0.60
4	縮合環ニトロ芳香族	4	2	5	1	-	0.25
5	Geminal ポリハロアルカン誘導体	2	3	3	2	0.99	-
6	電気吸引性基を持つハロアルケン	1	1	1	1	-	0.96
7	ハロフラノン	0	1	0	1	-	0.70

8	ハロアルコール	0	2	0	2	0.30	-
9	ヒドラジン誘導体	1	2	2	1	0.54	-
10	多環芳香族炭化水素 (PAH)、ナフタレンジイミン誘導体	4	1	4	1	-	0.46
11	分極ハロアルケン誘導体	0	1	0	1	0.40	-
12	キノロン誘導体	0	1	0	1	0.15	0.60
13	キノンメチド	0	2	0	2	0.65	0.45
14	スルホン酸塩、硫酸塩	0	2	0	2	-	0.55
15	Vicinal ジハロアルカン	0	4	0	4	0.50	0.45

表 11 非速度論的/速度論的 TIMES *in vivo* TGR モデルの性能比較

非速度論的 TGR モデル(08.08)	陰性 実験	陽性 実験	合計	Con-cordance	速度論的 TGR モデル(01.01)	陰性 実験	陽性 実験	合計	Con-cordance
陰性予測	49	15	64	0.83	陰性予測	50	12	62	0.85
陽性予測	10	64	74	0.81	陽性予測	9	67	76	0.85
合計	59	79	138	0.82	合計	59	79	138	0.85

表 12 DNA/タンパク質付加体量に対して閾値を設定した MN モデル性能

#	アラート名称	実験		予測		閾値 [mol/mol]	
		陽性	陰性	陽性	陰性	代謝物	親化合物
1	ニトロアニリン誘導体	2	26	6	22	0.35	0.53
2	Geminal ポリハロアルカン誘導体	3	12	2	13	0.95	0.99
3	ニトロアゾアレーン、パラ単置換アゾベンゼン誘導体	0	1	0	1	-	0.50
4	Vicinal ジハロアルカン	3	3	2	4	-	0.40
5	アゾジカルボンアミド	0	1	0	1	-	0.55
6	アレーンスルホンアミド	0	3	0	3	-	0.55
7	ニトロアルカン	0	1	0	1	-	0.55
8	ニトロビフェニル、架橋ニトロビフェニル	0	1	0	1	-	0.55
9	N-ニトロソ化合物	9	9	10	8	0.35	0.43
10	電気吸引性基を持つハロアルケン	1	4	0	5	0.10	0.88
11	プロパルギルアルコール誘導体	0	1	0	1	-	0.45
12	α 位が活性化したハロアルカン	3	4	4	3	0.25	0.40
13	ヒドロキシル化したフェノール	4	5	2	7	0.30	0.40
14	ジカルボニル化合物	5	6	9	2	0.40	0.60
15	カルボン酸アミド	3	3	5	1	-	0.30
16	Halogenated vicinal 炭化水素	3	3	2	4	-	0.40
17	α,β 不飽和カルボン酸およびエステル	1	4	1	4	0.30	0.40
18	ヒドラジン誘導体	13	2	14	1	-	0.55
19	特殊な 5 位置換ウラシル誘導体	0	1	0	1	-	0.85
20	縮合環ニトロ芳香族	2	5	1	6	0.03	0.70
21	ハロアルコール	3	3	4	2	-	0.45
22	α,β 不飽和カルボニルおよび関連化合物	8	10	10	8	0.50	0.42

23	ピラゾロン、ピラゾリジン-3,5-ジオン誘導体	0	2	0	2	0.50	0.55
24	モノハロアルカン	1	2	2	1	-	0.55
25	特殊なイミンとチオール誘導体	2	1	2	1	0.05	0.30
26	α,β 不飽和アルデヒド	0	2	0	2	-	0.55
27	パラ位置換したモノニトロベンゼン	0	1	0	1	-	0.30
28	縮合間芳香族アミン	4	7	7	4	0.06	0.60
29	チオール	3	2	4	1	0.50	0.45
30	イソシアネート	0	1	0	1	-	0.45
31	ポリニトロアレーン	0	7	0	7	0.35	0.55
32	N-ヒドロキシルアミン	18	13	25	6	0.03	-
33	置換アニリン	22	39	23	38	0.35	0.33
34	分極ハロアルケン誘導体	2	2	3	1	0.20	0.23
35	キノン、トリヒドロキシベンゼン	4	6	7	3	0.04	0.50
36	キノンイミナンパク結合	4	1	3	2	0.05	0.30
37	ニトロフェノール、ニトロフェノールエーテル、ニトロ安息香酸	0	4	0	4	-	0.30
38	リン酸アルキル、チオリン酸アルキル、ホスホン酸アルキル	7	4	5	6	0.15	0.51
39	ハロフラノン	0	1	0	1	-	0.75
40	キノンイミン、チオニン、Phenoxazinium 誘導体	4	2	3	3	0.05	0.55
41	不安定なハロゲンを持つハロアルカン誘導体	1	9	2	8	0.50	0.60
42	N-ニトロソアミン誘導体	0	1	0	1	-	0.35
43	脂肪族飽和モノアルデヒド	0	3	0	3	0.20	-
44	他の活性基を持つニトロアレーン	1	1	1	1	-	0.30
45	鎖状ヘテロ原子を含むハロアルカン誘導体	15	1	15	1	-	0.30
46	ポリハロエタン誘導体	1	4	0	5	0.10	-
47	没食子酸エステル	0	1	0	1	0.25	0.30
48	アミノアントラキノン	0	2	0	2	-	0.30
49	ナイトロジェンマスタード	12	1	12	1	-	0.30
50	フラボノイド	0	1	0	1	-	0.30
51	置換フェノール	0	5	0	5	0.30	0.50
52	ベンジジンベースのアゾ染料	5	3	6	2	0.06	0.40
53	単環置換された第1級芳香族アミン	13	27	10	30	0.70	0.65
54	キノンメチド	0	1	0	1	0.55	-
55	アレーンカルボン酸とエステル	0	2	1	1	0.05	0.45

表 13 非速度論的/速度論的 TIMES *in vivo* MN モデルの性能比較

非速度論的 MN モデル (13.13)	陰性 実験	陽性 実験	合計	Concordance	速度論的 MN モデル (01.01)	陰性 実験	陽性 実験	合計	Concordance
陰性予測	218	40	258	0.80	陰性予測	220	51	271	0.81
陽性予測	54	181	235	0.82	陽性予測	52	170	222	0.77
合計	272	221	493	0.81	合計	272	221	493	0.79

令和2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	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	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	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	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

研究要旨

本研究では、反復投与毒性について、カテゴリーアプローチモデルの適用範囲拡大・高度化に取り組んだ。まず、国内外で公開されている反復投与毒性試験データの統合化を図った。本年度は、統合データベースのキュレーションを実施し、更に化学物質審査規制法新規化学物質の試験結果をデータベース化した。これによりケミカルスペースを拡張させ、毒性所見から化学構造を検索できるカテゴリーアプローチに有用な大規模データベース（NIHS 統合 DB）を完成させることができた。次に、統合データベースを活用し、化学物質のヒト健康リスクの精緻な評価法を確立することを目的に、昨年度の研究の拡張として、神経毒性について検討することとした。はじめに、統合データベース中の神経毒性発現の懸念がある物質について詳細に解析し、共通する 33 種類の化学構造を抽出した。続いて、機序情報等を精査し、毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となる部分構造（Key Functional Group: KFG、14 種類）を特定した。そして、KFG を有し神経毒性を発現する物質について、体内動態と神経系への移行性に寄与する可能性がある物理化学的パラメータ（PCP）及び生物薬学的パラメータ（BCP）を算出し、神経毒性物質と非神経毒性物質をより正確に区別するパラメータの組み合わせとそれぞれの数値範囲を詳細に検討した。その結果、KFG に加えて、神経系への送達に有効な PCP と BCP を同時に利用することにより、構造情報のみを利用する従来の手法と比較して、化学物質の神経毒性に関連したより精度の高い情報を有害性評価者に提供することができ、一貫性のあるヒト健康リスクの評価の支援に有効であることが示された。

A. 研究目的

現在、国内外の化学物質管理行政においては、試験データを必要とする膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。また、動物愛護の観点から、動物実験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* の評価技術を確認し、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、上記の国際動向を見据えつつ、反復投与毒性についての新たな評価スキームの開発と実用化を目指している。まず、化学物質の毒性情報について、網羅的かつ容易に検索し解析することができるデータベースを構築するため、国内外で公開されている毒性試験データを、可能な限り統合し、更に未公開の化学物質審査規制法（化審法）新規化学物質の毒性試験結果をデータベース化し、NIHS 統合 DB を完成させる。

更に、今年度は、NIHS 統合 DB の有用性を証明する一環として、当該 DB から取得できる情報を有効活用し、化学物質のヒト健康リスクの精緻で新規な評価法を確立す

ることを目的に、神経毒性リスクを課題に、問題解決に取り組むこととする。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、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。しかし、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。したがって、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しばしば困難である。

従来の化学物質によるヒト健康リスクの評価法では、特定の毒性（例えば、肝毒性や血液毒性など）に対して、それを示す化学物質の情報を可能な限り収集し、化学者が、主にメディシナルケミストリーの知識と経験に基づき、物質の化学構造にのみ着目し、共通する化学構造を有する物質は当該毒性を発現する可能性（リスク）があると予測しているが、偽陽性予測の問題が解決できていない。一方、化学物質のヒトや動物等に対する特定の毒性は、その化学物質の体内の特定の毒性発現部位の曝露と関連することが多い。

そこで神経毒性を対象に化学物質の化学構造と体内動態予測を代替する情報を同時に考慮することで、鍵となる部分構造と種々のパラメータ領域を設定する。その結果、評価対象物質に対して、それと関連する化学構造とパラメータ情報を有害性評価者に提供することが可能となり、一貫性のある化学物質の神経毒性評価のサポートに貢献すると考えられる。

B. 研究方法

B.1. 反復投与毒性 NIHS 統合 DB の構築

国内外の反復投与毒性試験公開データベースの統合では、HESS、COSMOS、FSCJ、RepDose、ToxRef データセットについて、化学構造情報のチェックを行った。更に、毒性試験データは相互比較を容易にするため、投与量の単位を可能な限り mg/kg bw/day に揃えた。試験条件情報を精査して重複する試験データを削除した。化審法新規化学物質の毒性試験結果のデータベース化では、上記データベースとの統合を踏まえて、Microsoft Word ファイル形式の過去 20 年間の審査シート情報を Microsoft Excel ファイル形式のデータに変換した。処理番号、CAS No、届出会社、名称、化学構造式、用途、純度等の物質の基本情報、毒性試験等の項目について、データを取り出した。継続審議の物質や審議済みのデータに関しては、重複とならないよう、データをまとめた。無機物、反応生成物、共重合物、重縮合物、付加物、混合物、構造不確定の物質を除いた。NIHS 統合 DB のケミカルスペースの評価は、構造解析ソフトウェア Chemotyper (ver.1.0) と統計解析ソフトウェア JMP (ver.14.0.0) を用い、各ケモタイプを持つ物質数のカウントと主成分分析を行った。

B.2. 神経毒性物質の化学構造情報の収集とカテゴリ領域の精緻化

NIHS 統合 DB を利用して収集した神経毒性の発現の懸念がある所見（病理所見または病理所見が認められたときにしばしば伴って観察される臨床症状）を示す物質構造を抽出し、高分子化合物及び無機化合物を除く有機化合物について、詳細に解析をし、

共通する化学構造を抽出した。更に、毒性学の教科書である Casarett & Doull's Toxicology 9th Edition および日本毒性学会教育委員会編 トキシコロジー[第 3 版]からも神経毒性物質の化学構造を抽出した。次に、それらについて、神経毒性発現の機序情報等を文献調査し、現在までに神経毒性の発現に寄与すると考えられる KFG を特定した。続いて、特定した KFG を有し神経毒性を発現する物質について、市販の汎用ソフトウェアである ADMET Predictor (ver. 10.0.0.10) を利用して物質の体内動態に寄与する PCP 及び BCP について、神経毒性物質と非神経毒性物質をより正確に区別するパラメータの組み合わせとそれぞれの数値範囲を詳細に検討した。

（倫理面への配慮）本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 結果

C.1. 反復投与毒性の NIHS 統合 DB の概要

国内外の反復投与毒性試験公開データベース HESS、COSMOS、FSCJ、RepDose、ToxRef の統合データセット 2500 試験相当については、化学構造および試験データの重複のチェックを行い、集計を行ったところ最終的に 1550 物質、1975 試験となった。以下に、本データベースに収録されている主なデータ項目を示した。

- Data source
- CAS
- Chemical Name
- SMILES
- 試験動物（種・性別）
- 試験物質（純度）

- 投与量（最大－最小値）
- 投与経路および方法
- 投与期間
- エンドポイント：LO(A)EL／NO(A)EL
- 標的臓器又は組織
- 所見：生物薬学パラメータ、臓器重量の変化、病理所見など
- 準拠ガイドライン
- 試験報告（公開年）

これらのデータは、Microsoft Excel 形式で整備した。更に、化学構造情報と主要な毒性データは、化学情報データベース管理システム Chem Finder (ver. 19.1)で読み込める形式でも整備を行った（表 1, 図 1）。

化審法新規化学物質の毒性試験結果については、過去 20 年間の審査シートに記載の 1183 試験データから、化学構造を特定できた有機低分子化合物 476 物質、499 試験結果を同様にデータベース化した。

肝臓、腎臓、神経系に病理所見が観察された試験数、溶血性貧血が観察された試験数と LO(A)EL の分布を図 2 に示す。

国内外の反復投与毒性試験公開データベース HESS、COSMOS、FSCJ、RepDose、ToxRef の統合データセットと比較して、化審法新規化学物質 (New Chemical) のデータセットには、発現毒性の観点から大きな相違は認められないと考えられる。

NIHS 統合 DB のデータセットを用いて、3 物質以上が分類された 379 ケモタイプについて、主成分分析を実施した。第 2 主成分 (PC2) ～第 4 主成分 (PC4) をそれぞれ縦軸、横軸とした散布図を図 3 に示した。化審法既存化学物質を中心とした HESS データセットは、PC2 と PC4 への分散が大きく、New Chemical は HESS の範囲内に分散

してはいるが、その多くは一部の領域に偏在している結果となった。COSMOS は PC2 に、ToxRef は PC3 に分散したが、いずれも PC4 に対する分散は小さかった。以上より上記 3 つのデータセットはそれぞれ異なるケミカルスペースを持つことが示唆された。

HESS と他データセットのケミカルスペースの相違を詳細化するため、Chemotyper を用いてそれぞれのケモタイプに分類された物質数を比較した（図 4）。HESS データセットで分類されたケモタイプ数の多い順に左から右へ並べている。HESS データセットより分類物質数が多いケモタイプを持つデータセットは ToxRef で 379 ケモタイプ中 125 ケモタイプ、次いで FSCJ が 67、COSMOS が 25、RepDose が 13 となった。また、HESS データセットで分類されなかったが、COSMOS、FSCJ、RepDose、ToxRef のいずれかのデータセットに 3 物質以上含まれていたケモタイプは 22 個見つかった。以上の結果から、データベースを統合することにより、ケミカルスペースの拡大と化学構造の多様化、数が少ない化学構造の充実化が図られたことが明らかとなった。

C.2. 神経毒性発現の鍵となる部分化学構造 KFG の抽出

NIHS 統合 DB を検索して、神経毒性の発現の懸念がある所見（表 2）を含む 806 化合物の構造情報を取得した。このうち 20 物質は高分子化合物、19 物質は無機化合物であったため、今回の評価では対象外とし、757 個の有機化合物の情報を採用した。更に、毒性学の教科書である Casarett & Doull's Toxicology 9th Edition およびトキシコロジー [第 3 版]から 81 個の神経毒性物質構造を抽

出した。次に、これらを神経毒性発現の懸念がある候補化合物として、メディシナルケミストリーの知識と経験知を利用して、複数の化合物で共通する 33 種類の部分化学構造 (Common Functional Group: CFG) を抽出した (表 3)。続いて、毒性発現機序の調査を行い、毒性発現が化学構造に起因すると考えられるものや、機序の詳細は不明であるが、DB 検索の結果から、神経毒性発現比率 (NT/NT+nonNT) が高く神経毒性の発現と化学構造の関連が示唆されるものを、優先して神経毒性発現の KFG として選択することとし、現在までに 8 種類特定した (表 3: 薄青でハイライト)。また、毒性発現機序から代謝的变化を要する等、構造を細分化可能と考えられるものについては、KFG にアルファベットを付記して区別した。KFG の化学構造式を図 5 に示す。上記 14 種類の KFG を分子内に保有する化学物質は、体内で神経部位に到達した (送達された) 場合、神経毒性を発現する可能性があると考えられる。

C.3. KFG に起因すると考えられる神経毒性及び想定される発現機序

KFG 1 [1,2-OX: X=OH, halogen; OX: oxirane]

1,2-OX は、隣接する炭素原子上の一方に水酸基 (OH)、他方に水酸基またはハロゲン原子 (X) を有する化合物及び、それらが脱水または脱ハロゲン化水素 (HX) 化されたオキシラン環を有することを鍵構造とする鎖状のアルキル化合物。

エチレンオキシド (EO: KFG 1a) は、ヒトや動物での神経毒性が多く報告されており、反応性の高いオキシラン環が生体内の蛋白質や DNA をアルキル化することでそ

の正常な機能を阻害し、脳を含む組織で発癌性を示すことも報告されており、7-(2-hydroxyethyl)guanine (7-HEGua) の生成が発癌機序の一部であると考えられている (CICAD-54, ETHYLENE OXIDE, WHO, 2003, Föst et al., 1989; Li et al., 1992)。神経毒性の発現に関しては、詳細な機序の知見は殆どなく、ラットの 4 週間暴露で creatine kinase (神経系や筋肉組織に広く分布) の活性が著しく低下するとの報告があり、脳ホモジネートでその阻害が確認している (Matsuoka et al., 1990)。オキシラン環を有する類縁体を含め、それらの毒性発現機序の詳細は不明であるが、神経系においても、発癌性の発現と同様に、蛋白質や DNA をアルキル化することで機能を阻害し毒性を発現していると考えられる。

エチレングリコール (EG: KFG 1b) は、消化管から速やかに吸収され、臨床的に第一段階として、中枢抑制 (運動失調や言語障害等) や浸透圧異常 (高圧) 等を引き起こすことが報告されているがその機序は解明されていない。EG や類縁物質は、物理化学的に組織細胞膜との親和性が高く、毒性発現に何らかの影響を及ぼしていると推定される。また、第二段階として、酸化的に代謝されることで生成するシュウ酸が血中カルシウムと結合し不溶性の塩として神経系 (脳の小血管壁等) やその他の組織 (尿細管) で析出することや、同時に副生する CO₂ 等による代謝性アシドーシスを引き起こすことも報告されている (Toxicological Profile, Nov. 2010)。

エチレンハロヒドリン (EC: KFG 1e) は、マウスやラットで脳幹 (特にグリア細胞) に病変を引き起こすことが報告されており

(Cavanagh et al., 1993)、ヒトでは急性中毒により重篤な代謝性アシドーシスや呼吸障害及び昏睡等の毒性を発現することが報告されている (Deng et al., 2001)。これらの毒性発現機序は明らかにされていないが、EC やその類縁体は、化学的に反応性が高く、EO と同様に生体内の基質をアルキル化しその機能を阻害することや、酸化的代謝物が毒性を発現すると考えられる。

KFG 2 [Dicarbonyl: a/b/g-Diketone]

ジカルボニル化合物の内、アルキル基上の1,4-位にカルボニル基を有する化合物(g-diketone) については、神経毒性を発現する分子機構が比較的詳細に検討されており、巨大神経細糸 (giant neurofilament) を構成する蛋白質の1級アミノ基と反応しピロール環を形成することで、中枢神経や抹消神経の軸索障害 (axonal swelling) を起こすことが主な原因と考えられている。なお、カルボニル基の a 位の炭素が4級でピロール環を形成することができない化合物 (例えば、3,3-dimethyl-2,5-hexanedione) は、12週までの暴露で軸索口径に僅かな変化が認められたが、臨床上の神経毒性は認められていない (Sayre et al., 1986)。

1,2-及び1,3-ジカルボニル化合物 (α - & β -diketone) について、2,3-butanedione 及び 2,4-pentanedione をラットに40週間投与後電気生理学的に評価し、共に神経毒性を示すことを確認している (Nagano et al., 1983)。また、1,2-ジカルボニル化合物は、ラットに346 ppm 急性暴露することで、脳組織 (嗅球, 線条体, 海馬) において、claudin-1 (BBB (脳・血液関門) の組成物)、IL-6 及び NOS2 の発現が増加し、何らかの作用を及ぼしてい

ることも報告されている (Hubbs et al., 2010)。これらの化合物については、神経毒性を発現する分子機構の報告はなく不明である。これらの化合物は、化学構造上ピロール環を形成することは不可能であるが、蛋白質上の1級アミノ基と Schiff 塩基等を形成することは可能で、それにより機能を障害しているものと考えられる。

KFG 3 [Acrylamide/Acrylate/Acrylo-nitrile]

ソフトな親電子性を有するアクリル酸誘導体は、生体内でソフトな求核性の SH 基を有する蛋白質やグルタチオン類と Michael 付加反応を起こすことで、それらの機能の障害やグルタチオン量の減少に伴う酸化ストレス等により抹消や中枢神経組織で毒性を発現することが報告されている (LoPachin et al., 2012)。更に、アクリル酸誘導体は、二重結合が代謝的に酸化を受けるとハードな親電子性のオキシラン環を獲得する (Tarskikh et al., 2013) と、蛋白質や DNA のハードな求核性基 (アミノ基、グアニン N7 等) とも反応し易くなり、それらをアルキル化することができる (Zhang et al., 2016)。

この様にアクリル酸誘導体は代謝物を含め、ハード・ソフトの両面の反応性を有することで、生体内の様々な蛋白質や DNA 等のアルキル化を通じてその機能を障害し神経毒性や様々な毒性を発現すると考えられている。即ち、この α,β -不飽和カルボニルの部分構造を有する KFG 3 化合物は、その体内動態が毒性発現に極めて重要な役割を担っていることが分かる。

KFG 4 [Aromatic amine: aniline: 4a]

アニリン誘導体の神経毒性に関する報告は少なく、ヒトで、アニリンが混濁、頭痛や運動失調等を引き起こすことが知られている。発現機序については、アミノ基が酸化的に代謝されヒドロキシルアミン体やニトロソ体が酸化ストレスを引き起こすことで脂質を過酸化すること等が主な原因と考えられている。然しながら、その詳細な分子機構は不明である (Makhdoumi et al., 2019)。

KFG 5 [Aromatic alcohol: phenol: 4a]

フェノール誘導体の神経毒性に関する知見は少なく、アニリン誘導体と同様に酸化ストレスを引き起こすことが報告されているが (Shvedova et al., 2000)、神経毒性発現の分子機構は不明である。

KFG 6 [Aliphatic alcohol]

脂肪族アルコール類は酸化的に代謝されアルデヒドやカルボン酸を生成し、これらが代謝性アシドーシスを引き起こしアルコール類による毒性発現の原因の一つであると考えられている (Patocka et al., 2012)。

また、エタノールについては、大脳辺縁系やオピオイド等の中枢神経系に刺激や抑制等相反する多様な影響を及ぼすことが知られているが (Costardi et al., 2015)、それらの分子機構の詳細は不明である。

KFG 7 [Benzyl alcohol/aldehyde]

ベンズアルデヒドは、特異的にグルタチオンペルオキシダーゼを阻害し活性酸素分子種 (ROS) の産生を誘導することで神経毒性を発現すると考えられているが、この阻害作用の構造活性相関は極めて限定的で、芳香環上のハロゲン置換を全く許容しない

ことが報告されている (Tabatabaie et al., 1996)。

KFG 9 [Carbamate]

カーバメート類は、神経組織や神経接合部で神経伝達に係るコリンエステラーゼを可逆的に阻害し、アセチルコリンが蓄積することで神経毒性を発現する。アセチルコリンエステラーゼの阻害機構は詳細に研究されており、カーバメート基がエステラーゼの深く (>15Å) 細いゴルジ内の触媒三残基 (catalytic triad) に非共有的に相互作用することで、アセチルコリンを競合阻害することが知られている (Sussman et al., 1993)。

KFG 10 [Guanidine]

グアニジン誘導体は、サキシトキシンやテトロドトキシンと同様に、神経細胞の電位依存性 Na チャンネルの開口部 (p-loop, α -subunit) 付近に結合することで、神経細胞への Na イオンの流入を阻害し、神経毒性症状を引き起こすことが報告されている (Durán-Riveroll et al., 2015)。詳細な分子機構については不明であるが、グアニジル基の正電荷とイオンチャンネル開口部の負電荷が静電的に相互作用しているものと推定できる。

また、腎性脳症を引き起こすことが知られており、腎性脳症ではてんかんや認知機能障害が多くみられる。更に腎性脳症を引き起こす濃度で痙攣を引き起こすことが知られており、その機序として NMDA 受容体の活性化と同時に GABA type A 受容体を阻害することや、その他の脱分極が関与していると考えられているが、それらの詳細な分子機構は不明である (De Deyn et al., 2009)。

KFG 14 [Organochlorine]

KFG 15 [Organohalide]

KFG 16 [Organophosphorus]

有機リン化合物の内 KFG 16a は、リン酸又はチオリン酸のエステル又はアミデート類で、少なくとも一つの有効な脱離能を有する置換基を保有し、KFG 9 のカーバメート類と同様にコリンエステラーゼを阻害し神経毒性を発現する。特にリン酸エステル類は、5 配位エステル構造が加水分解酵素の遷移状態をより精密にミミックし catalytic triad の重要な残基である Ser と共有結合を形成することで不可逆的に阻害する。その結果、より持続的で重篤な神経障害や精神疾患又は知覚運動障害等を引き起こすことが知られている (Mangas et al., 2016)。

また、リン酸エステル類は、コリンエステラーゼ以外にも多様な加水分解酵素 (arylformamidase; acylpeptide hydrolase; butyrylcholinesterase; carboxylesterases; fatty acid amide hydrolase; muscarinic acetylcholine receptor; neuropathy target esterase; phosphotriesterase, etc.) を阻害することが知られている。

KFG 16b の有機リン化合物の内 3 価の亜リン酸類は、生体内で酸化代謝を受け 5 価に変換されることでコリンエステラーゼ等を阻害すると考えられる。一方、5 価のホスホニウム類については、神経毒性を発現する分子機構の報告はなく不明である。

KFG 17 [Organosilane]

有機ケイ素化合物は近年診断や薬物の送達担体として利用され始めており、ナノ粒子が線条体で、酸化ストレスを誘導しや炎症反応を増大させることが報告されているが (Wu et al., 2011)、その分子機構等詳細は

明らかにされていない。

KFG 18 [Organotin]

有機スズ化合物はアルキル基の置換様式により神経毒性の発現様式が微妙に異なることが知られている。その機序は十分に解明されていないが、例えば、グリア細胞等を活性化することで、脳内でのサイトカイン (IL1-b, IL-6, TNF-a 等) の分泌を亢進し神経炎症を引き起こすことや、海馬では酸化ストレスを引き起こすこと等が報告されている (Ferraz da Silva et al., 2018)。

また、有機スズ化合物は、一般に置換アルキル基の脂溶性が高くなる程、免疫毒性に加えて神経毒性を発現する傾向が強くなることも報告されている (ToxProfile, 2005)。以上の様に、有機スズ化合物の神経毒性と化合物の性質 (物性) には密接な関りがあることが示唆されており、脂溶性が重要な役割を果たしているが、詳細な分子機構は不明である。

C.4. KFG の領域を精緻化するための BCP/PCP パラメータの選択

有機化合物が神経毒性を発現するには体内で化合物が神経組織に到達することが不可欠であり、神経毒性発現の予測に体内動態の知見が重要な役割を果たすことは明らかである。然しながら、すべての化合物の体内動態を正確に知るには多大な費用と労力を要し、近年の動物愛護の観点からも現実的ではない。そこで、近年それを代替する知見として、化合物の物理化学的性質 PCP 及び生物薬学的性質 BCP の利用した予測が検討されている。使用する PCP/BCP 値については、予測の精度を高める為には可能な限

り実測値であることが望ましいが、実測値の取得にも多くの費用と労力を要する。本研究では、*in silico* での体内動態予測に実績がある Simulation Plus 社が開発した汎用ソフトウェアである ADMET Predictor で予測値を取得し、神経毒性の予測に利用することとした。

ADMET Predictor は化合物の構造情報を入力することで、492 個の PCP 及び BCP のパラメータ値を予測することができる。その中から下記の考え方で、神経組織への分布予測に有用と考えられる 26 個のパラメータを選択した。

神経毒性を発現する物質の予測にあたって最も重要なパラメータは、対象化合物の中枢系組織への移行能、即ち、能血液関門を通過する能力を評価することであり、その評価には、BBB 前後の 2 相間での分配を予測する LogBB (脳内優先>-0.1) の他、特に BBB 通過時に影響を及ぼす分子の位相幾何学的極性表面積 (TPSA) やイオン性 (pKa) 及び膜透過性に影響を及ぼす脂溶性 (logP) 等を重要な PCP パラメータとして選択した。その他、体内での吸収・分布・代謝・排泄は、化合物の毒性発現にも大きな影響を及ぼすパラメータであり、ヒト空腸 (P_{eff} human) やマウス MDCK 細胞 (MDCK P_{app}) への取り込み速度や、体内滞留時間に影響を及ぼす血中蛋白質との結合率 (Human/Rat fup) 等を予測に加えることとした。排泄のパラメータとして、ECCS (Extended Clearance Classification System) を利用することとし、化合物のイオン性や膜透過性及び分子量から律速段階となる排泄機構が予測できる為、体内動態の分類に有用であると考えられる。

- 分子量他: MW; AMW(平均分子量);

No of Halogen

- 脂溶性: S+logP; S+logD
- 分子極性: TPSA
- 水素結合: HBD; HBA
- 解離定数: S+acidic pKa; S+ basic pKa;
- 溶解度 [mg/ml]: S+Sw(水); S+FaSSG(空腹時胃); S+FaSSIF(空腹時小腸)
- 吸収 (透過): S+Peff human[cm/s $\times 10^4$]; S+MDCK Papp [cm/s $\times 10^7$]; S+MDCK-LE;
- 脳・血液関門: LogBB (log brain/blood)
- 代謝・排泄: S+CL metabolism; S+CL renal; S+CL hepatic uptake; S+CL mechanism; ECCS Class
- 血中蛋白質結合 (%): Human fup (fraction unbound protein); Rat fup
- 分布 (容積): Vd
- その他: MPO score (Wagner, 2010, 2016)

C.5. KFG と BCP/PCP を利用した神経毒性予測性の評価

KFG 1 [1,2-OX: X=OH, halogen; OX: oxirane]

NIHS 統合 DB から取得した KFG 1a, 1b, 1e を分子内に保有する 12 化合物について、神経毒性が不明な化合物を可能な限り除外し神経毒性既知化合物 (7 化合物) をすべて設定範囲内に分布するよう、26 個の BCP/PCP パラメータの内 5 個のパラメータの組み合わせを選択し、その範囲を設定した。その結果、KFG1 の化合物は、1a, 1b, 1e に限定しパラメータ値の要件を付加することで、神経毒性を発現する化合物の判定確

率 (NT/Hit) が 28.2%から 87.5%に改善した。

なお、神経毒性が不明の CAS 57-55-6 も設定範囲内に分布している。近接する構造近似の CAS 584-03-2 とパラメータ値を比較することで、CAS 57-55-6 が神経毒性を発現する可能性が高いことが容易に推定できる。

また、パラメータの範囲外には、オキシラン環を有する毒性情報が不明な 2 化合物が存在するが、CAS 2224-15-9 は、ヒト血中蛋白質との非結合（遊離）比率（Human fup=91.8%）が、KFG 1 の神経毒性物質と同様に高く、LogBB の設定値を -0.5 以上（LogBB>-1.0 : high BBB penetration）に修正すると神経毒性の発現が予想される。他方 CAS 30171-80-3 は、分子量(MW)、分配係数（S+LogP）、Human fup の 3 つのパラメータで KFG 1 に分類したその他の神経毒性物質の値（範囲）を逸脱しており、神経系へ到達する可能性は低く毒性発現の可能性も低いと予想できる（図 6）。

KFG 2 [Dicarbonyl: Diketone]

NIHS 統合 DB から取得した KFG 2 を分子内に保有する 5 化合物について、神経毒性を発現しない化合物を除外することが可能な、5 個の BCP/PCP パラメータの組み合わせを選択し、その範囲を設定した。

その結果、KFG2 の化合物は、パラメータ値の要件を付加することで、神経毒性を発現する化合物の判定確率が 60.0%から 75.0%に改善した。

また、CAS 24382-04-5 については、当初、神経毒性を発現しないと判定したが、グラフからすべてのパラメータ値が KFG 2 の神経毒性化合物の設定範囲内で他の化合物と近似している為、文献情報を詳細に調査し

たところ、神経細胞のミトコンドリアに作用し、膜電位の低下と呼吸鎖複合体 I-II 等を阻害することで ROS の産生を増大させ抗酸化機能を低下させることが報告されている。また、神経細胞のミトコンドリア機能の不全は、脳の老化や神経障害性疾患に繋がる可能性も示唆されている（Long et al., 2009）。以上のことから、CAS 24382-04-5 は、解析結果が示唆した通り、神経毒性を発現するリスクを有する化合物であると判定でき、設定範囲内の化合物は高い（100%）確率で神経毒性を発現すると予想できる（図 7）。

なお、CAS 473278-76-1 は、すべてのパラメータ値が設定範囲を大きく逸脱していることが、図 7 のグラフから容易に判定でき、立体構造的にも柔軟性に欠ける為、恐らく神経毒性を発現しないと予想できる。

KFG 3 [Acrylamide/Acrylate/Acrylo-nitrile]

NIHS 統合 DB から取得した KFG 3 を分子内に保有する 15 化合物について、毒性情報が不明な化合物を可能な限り除外し、すべての神経毒性既知化合物（10 化合物）が分布するよう、26 個の BCP/PCP パラメータから 4 個のパラメータの組み合わせを選択しその範囲を設定した。その結果、KFG3 の化合物は、パラメータ値の要件を付加することで、神経毒性を発現する化合物の判定確率が 66.7%から 83.3%に改善した。

CAS 2439-35-2 は解析前、流涎のみの情報で神経毒性は無いと判定したが、図 8 の通り、選択したすべてのパラメータが設定範囲内に分布し、化学構造が極めて近似する CAS 2867-47-2（メタクリル酸誘導体）の近傍に分布していることが分かる。CAS2867-

47-2 は、ラットへの 6 週間投与で、痙攣や発作等を引き起こし脊髄にも傷害を示すことが報告されている神経毒性化合物である (NIOSH, 2002)。また、CAS 868-77-9 は情報が不足しており神経毒性は不明であるが、化学構造が近似し神経毒性を発現することが明らかな CAS 818-61-1 (アクリル酸誘導体) の近傍に分布していることが分かる。これら 2 組 4 化合物は、互いにアクリル酸-メタクリル酸誘導体の関係にあり、その化学構造とパラメータ値の近似性から、CAS 2439-35-2 及び CA868-77-9 は共に、神経毒性を発現する高いリスクを有すると判定できる。

その他の神経毒性情報が不足する 3 化合物については、本研究で NIHS 統合 DB から取得した KFG3 の化合物に、 $\log P > 1.60$ 又は $MW > 160$ で、神経毒性を発現する根拠(情報) が得られていないため、除外した。

以上の結果、KFG 3 の部分構造を有し、選択した 4 個のパラメータ値が設定範囲内に分布する化合物は高い確率で神経毒性を発現すると予測できる。

KFG 9 [Carbamate]

NIHS 統合 DB から取得した KFG9 を分子内に保有する 27 化合物について、毒性情報が不明な化合物を可能な限り除外し、すべての神経毒性既知化合物 (16 化合物) が分布するよう、3 個のパラメータの組み合わせを選択しその範囲を設定した。その結果、KFG9 の化合物は、パラメータ値の要件を付加することで、神経毒性を発現する化合物の判定確率が 59.3%から 84.2%に改善した。また、KFG9 の標的部位はアセチルコリンエステラーゼの狭く深いゴルジ構造の底部で

あるが、パラメータの設定により、N 原子上の置換基が芳香環の 6 化合物がすべて他の化合物から分離できることが判明した。これらの化合物はすべて神経毒性を発現しない又は毒性情報が不明であった。即ち、N 原子上の置換基の嵩高さが毒性発現に影響を及ぼすと推定できた為、KFG9 の追加要件として④N 置換基の構造的柔軟性を付加することとした。なお、③として Human fup を設定した場合、N-芳香族置換化合物の分離能が低下する。

CAS 2278-23-3 は、設定範囲内に分布するが毒性情報は不明であったため、詳細に調査したところ、同一化合物ではないが、極めて近似する構造の Carbofuran がアセチルコリンエステラーゼを阻害する殺虫剤として開発されており、ヒトにも毒性を示すことが知られていることから、CAS 2278-23-2 も同様に神経毒性を発現する可能性が極めて高いと判定でき、この結果を考慮すると、本条件において神経毒性化合物の判定確率は、89.5%に改善されることになる (図 9)。

KFG 10 [Guanidine]

NIHS 統合 DB から取得した KFG10 を分子内に保有する 4 化合物について、毒性情報が不明な化合物を除外し、すべての神経毒性既知化合物 (3 化合物) が分布するよう、4 個のパラメータの組み合わせを選択しその範囲を設定した。その結果、KFG10 の化合物は、パラメータ値の要件を付加することで、神経毒性を発現する化合物の判定確率が 75.0%から 100%に改善した。

CAS 159138-81-5 は、神経毒性の発現は不明であるが、すべてのパラメータが設定範囲外に逸脱しており、グアニジン化合物で

唯一 ECCS クラス 4 に分類されている。即ち、膜透過性 (S+Peffhu: スポットの大きさで表示) が低く、中枢系 (脳) への分配比率 (LogBB) も -1.0 以下で、体内で神経系に到達する可能性は低い (困難) と推定され、神経毒性を発現するリスクも低いと予測できる (図 10)。

KFG 16 [Organophosphorus]

NIHS 統合 DB から取得した KFG16a を分子内に保有する 50 化合物について、すべての神経毒性既知化合物 (29 化合物) が分布するよう、4 個のパラメータの組み合わせを選択し、その範囲を設定した。結果として、神経毒性を発現する化合物の判定確率は全く改善されなかったが (58.0%)、毒性情報が不明な 20 化合物がすべて毒性発現化合物の近傍に分散して分布することが判明し、多くの化合物が KFG16a に起因する神経毒性を発現する可能性 (リスク) が高いと推定することができる。

例えば、CAS 756-79-6 は神経毒性を発現しないと判定されており、CAS 10265-92-6 は神経毒性の発現情報が欠落していたが、両者の化学構造は共に、神経毒性が確認されている CAS 512-56-1 と極めて類似しており、パラメータ値も非常に近似していることから、体内で神経組織に到達することが十分予測され、神経毒性を発現する可能性 (リスク) は高いと予想された。そこで、毒性情報を再調査したところ、CAS 756-79-6 は、予想通り、ラット 15 日間連続投与 (> 2,500mg/kg/day) で歩行障害や活動量の低下すること等が観察されており (NIH, 1987)、CAS 10265-92-6 は、様々な動物で、運動失調や中枢抑制等の急性神経毒性や亜急性試

験 (最長 90 日) では、遅発性の神経毒性も報告されており (食品安全委員会、2016)、予測した通り、神経毒性を発現することを確認した (図 11)。

KFG 18 [Organotin]

NIHS 統合 DB から取得した KFG 18 を分子内に保有する 7 化合物について、神経毒性と脂溶性が密接に関係していることが明らかであるため、神経毒性を発現しないと判定した CAS 13121-70-5 を除外することができる 4 個の BCP/PCP パラメータの組み合わせを選択し、その範囲を設定した。その結果、KFG 18 の化合物は、パラメータ値の要件を付加することで、神経毒性を発現する化合物の判定確率が 71.4% から 80.0% に若干向上した。

設定した範囲内には、神経毒性の発現が当初不明であった、CAS 993-16-8 が含まれていたが、設定したパラメータ値がその他の神経毒性化合物と近似していたため、毒性情報を再度詳細に調査した結果、神経毒性を発現することが明らかになり (IMAP Single Assessment Report, 29 June 2018)、パラメータ値の要件を加えることで、神経毒性化合物の判定確率が 100% に改善された。

更に毒性情報の調査を進めた結果、神経毒性を発現しないと判定されていた CAS 13121-70-5 についても、Toxicology Profile for Tin and Tin Compounds (ATSDR, August 2015) に、25 mg/m³ の暴露で直ちに生命や健康に危険を伴う、との記述があり神経毒性化合物であることが判明した。最終的に、KFG 18 のパラメータ値 ② S+logP の範囲を 3.9 - 8.0 に修正することで、設定したパラメータ値内の有機スズ化合物はすべて神経毒性

を発現物質となり、その判定確率が 100%に改善された (図 12)。

D. 考察

2010 年代に入って、国内外で化学物質、農薬、化粧品原材料などの反復投与毒性データベースが開発された。反復投与毒性に対する代替手法として期待されるカテゴリーアプローチの適用範囲を拡大し、実用化を推進していくためには、点在する毒性データを統合し、一体化して活用することが求められる。そこで、本研究では、複数の信頼性が高い国内外の毒性データベースを対象に、共通または類似するデータ項目を注意深く選定し、統合化を図った。更に化審法の新規化学物質の毒性試験結果も同等のフォーマットでデータベース化した。

データの精査の結果、複数の毒性データベースに同じ試験結果が登録されていることがしばしばあることが判明した。その重複を削除したため、当初期待したよりデータセットは大きくならなかったが、それでも 2000 を超える物質について、信頼性の高い毒性データを統合することができた。データセット化合物の主成分分析、ケモタイプ分析により、ケミカルスペースの拡大を達成できたことが明らかとなった。

化審法新規化学物質の毒性試験については、反応生成物など化学構造を特定できない試験も多かったが、476 の有機低分子化合物 (499 試験) について毒性情報をデータベース化できた。ChemFinder 形式でデータベース化したことにより、部分構造を元に類似物質の試験データを効率よく検索することができるようになった。また、新しいカテゴリーの候補を、これまでより迅速に検討

することもできるようになったため、有害性評価の専門家は、評価対象物質の類似物質の評価結果を参照しつつ、より一貫性ある安全性評価を行うことが可能となる。

データベースは常に新しいデータを追加し、更新していくことが重要である。今回用いた国内外反復投与毒性データベースのアップデート情報を把握し続けると共に、新しいデータソースや紙媒体などの形で埋もれている試験データ集を検索し、拡充していく努力も必要である。新規化学物質については、今回確立した手法を用いることによって、継続的なデータの更新は容易にできると考えられる。病理などの所見や用語の統一化を図ることが出来れば、データベースは更に使いやすいものになると期待されるが、これは今後の課題である。

NIHS 統合 DB の有用性を証明する一環として、当該 DB から取得できる情報を有効活用し、化学物質のヒト健康リスクの精緻で一貫性のある評価法を確立することを目的に、神経毒性を課題に、問題解決に取り組むこととした。

反復投与毒性試験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。今回の解析では、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に加えて、安全サイドに立って、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広く抽出した。

より厳密には、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すなど、神経毒性の判定は慎重に行うべきである。しかし、有害性の評価の現場では、毒性試験の投与量設定が低い故に神経毒性影響が明瞭に認められないケースがしばしばあり、評価を困難にしている。神経毒性と関連性が懸念される構造を広く抽出して、そのカテゴリーの特徴を現在可能な範囲で明確化しておくことは、**Weight of Evidence** に基づく神経毒性の一貫性のある評価に有用であると期待される。

従来は、特定の毒性に対して、それを示す化学物質の情報をできる限り収集し、物質の化学構造にのみ着目し、共通する化学構造を有する物質は当該毒性を発現する可能性があると予測してきた。しかし、化学物質が人や動物等に対して特定の毒性を発現するという事は、多くの場合、化学物質が体内の特定の毒性発現部位に到達していることを意味している。従って、より精緻な化学物質の毒性予測には、当該化学物質の構造情報に加えてその体内動態を予測する情報の付加が不可欠であると考えられる。

そこで今回は、市販ソフトウェア **ADMET Predictor** を利用して、物質の体内動態に寄与する **PCP/BCP** パラメータについて、神経毒性物質と非神経毒性物質をより正確に区別するパラメータの組み合わせとそれぞれの数値範囲を詳細に検討した。**KFG** の構築に際しては、毒性機序に関する情報をできるだけ収集したが、詳細は不明である場合が多かった。本研究では、最終的に残る曖昧な部分にはメディシナルケミストリーの経験知を組み込んで、分子化学的に共通または類似の標的分子に影響しうるかを考慮し

つつグループ化を行った。

KFG と **PCP/BCP** パラメータの利用により、当該神経毒性物質群の分布を確認しており、その領域に分布する当該 **KFG** 含有化合物は毒性発現リスクが高いと考えられる。一方、**PCP/BCP** パラメータは、主に医薬品のデータを元に作成されたモデルにより算出されており、物理化学的性状の異なる化学物質へ適用したときの精度は十分に評価されていない。しかし、化学物質の場合、実測値をそろえること自体ほぼ不可能であり、本解析ではすべて推計値を用いることとした。構築する神経毒性予測モデルの適用範囲について、不確実性が存在することに留意する必要がある。

しかしながら、本研究では、神経毒性発現が(当初)負の判定の化合物について、**KFG** と推計 **PCP/BCP** パラメータの利用により神経毒性発現を予測し、追加の文献調査により神経毒性を有することを確認した事例を挙げることができた (**KFG2**; CAS 24382-04-5, **KFG 9**; CAS 2278-23-3, **KFG16**; CAS 756-79-6, **KFG 18**; CAS 13121-70-5)。このことは、本研究で確立したグループ化手法により、神経毒性評価を精緻化できる可能性を示唆している。しかしながら、実試験データがない場合の神経毒性予測に用いるためには、神経毒性判定のクライテリア、**PCP/BCP** 設定の根拠、作用部位(中枢系と末梢系)、機序情報の不足などに起因する不確実性がまだ大きいと考えられ、更なる研究が必要である。

以上の結果より、本研究において確立した **KFG** と体内動態パラメータを用いた神経毒性予測系は、データの不足により神経毒性評価が困難な場合に、類似物質の試験

データや想定される機序を含めた種々の情報に基づく統合的な評価のサポートに有用であると考えられる。

E. 結論

本研究では、国内外で信頼性が確立された化学物質の毒性情報を入手・統合することで、NIHS 統合 DB を構築した。これを用いることにより、毒性影響から化学物質構造を検索することが可能となり、カテゴリーの同定とその領域の精緻化を効率化することができる。毒性機序情報を集積して体系的に整理することを併せて、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。

また、NIHS 統合 DB の有用性評価として、神経毒性が懸念される化合物構造を収集し、それらの化合物の KFG と神経系への到達に有効なパラメータ（物理化学的及び生物薬学的性質）を特定した。これらの情報を同時に利用する毒性予測手法は、構造情報のみを利用する従来の手法と比較して、化学物質の神経毒性をより高度に評価することが可能となり、ヒト健康リスクの評価のサポートとして有用である。

F. 参考文献

- Cavanagh JB, Nolan CC, Seville MP. The neurotoxicity of alpha-chlorohydrin in rats and mice: I. Evolution of the cellular changes, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1993, 19, 240-52.
- CICAD-54, ETHYLENE OXIDE, WHO, 2003.
- Costardi JV, Nampo RA, Silva GL, Ribeiro MA, Stella HJ, Stella MB, Malheiros SV. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency, *Rev Assoc Med Bras.* 2015, 61, 381-387.
- De Deyn PP, Vanholder R, Eloot S, Glorieux G. Guanidino compounds as uremic (neuro)toxins, *Seminars in dialysis.* 2009, 22, 340-5.
- Deng JF, Yang CC, Tsai WJ, Ger J, Wu ML. Acute Ethylene Chlorohydrin Poisoning: Experience of a Poison Control Center, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2001, 39, 587-93.
- Durán-Riveroll LM, Cembella AD. Guanidinium Toxins and Their Interactions with Voltage-Gated Sodium Ion Channels, *Mar. Drugs.* 2015, 15, 303.
- Ferraz da Silva I, Freitas-Lima LC, Graceli JB, Rodrigues LCM. Organotins in Neuronal Damage, Brain Function, and Behavior: A Short Review, *Frontiers in Endocrinology.* 2018, 8, 366.
- Föst U, Marczyński B, Kasemann R, Peter H. Determination of 7-(2-hydroxyethyl) guanine with gas chromatography/mass spectrometry as a parameter for genotoxicity of ethylene oxide. *Archives of Toxicology.* 1989, Supplement 13: 250–253.
- Hubbs AF, Cumpston A, Goldsmith WT, Battelli LA, Kashon ML, Jackson MC, Frazer DG, Fedan JS, Goravanahally MP, Sriram K. Acute central neurotoxicity of inhaled alpha-diketone butter flavoring compounds in the rat brain, *Vet. Pathol.* 2010, 47(Suppl), 57S.
- Li F, Segal A, Solomon JJ. *In vitro* reaction of ethylene oxide with DNA and

- characterization of DNA adducts. *Chemico-Biological Interactions*. 1992, 83:35-54.
- Long J, Liu C, Sun L, Gao H, Liu J. Neuronal Mitochondrial Toxicity of Malondialdehyde: Inhibitory Effects on Respiratory Function and Enzyme Activities in Rat Brain Mitochondria, *Neurochemical Res*. 2009, 34, 786-794.
- LoPachin RM, Gavin T. Molecular Mechanism of Acrylamide Neurotoxicity: Lessons Learned from Organic Chemistry, *Environ. Health Perspect*. 2012, 120, 1650-7.
- Makhdoumi P, Hossini H, Ashraf GM, Limoe M. Molecular Mechanism of Aniline Induced Spleen Toxicity and Neuron Toxicity in Experimental Rat Exposure: A Review, *Current Neuropharmacology*. 2019, 17, 201-213.
- Mangas I, Vilanova E, Estévez J, Costa Franca TC. Neurotoxic Effects Associated with Current Uses of Organophosphorus Compounds, *J. Braz. Chem. Soc*. 2016, 27, 809.
- Matsuoka M, Igisu H, Inoue N, Hori H, Tanaka I. Inhibition of creatine kinase activity by ethylene oxide, *British J. Indust. Med*. 1990, 47, 44-47.
- Nagano M, Misumi J, Nomura S. An electrophysiological study on peripheral neurotoxicity of 2,3-butanedione, 2,4-pentanedione and 2,5-hexanedione in rats, *Jpn J. Ind. Health*. 1983, 25, 471-82.
- Patocka J, Kuca K. TOXIC ALCOHOLS: ALIPHATIC SATURATED ALCOHOLS, *Mil. Med. Sci. Lett*. 2012, 81, 142-163.
- Sayre LM, Shearson CM, Wongmongkolrit T, Medori R, Gambetti P. Structural basis of g-diketone neurotoxicity: Non-neurotoxicity of 3,3-dimethyl-2,5-hexanedione, a g-diketone incapable of pyrrole formation, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1986, 84, 36-44.
- Shvedova AA, Kommineni C, Jeffries BA, Castranova V, Tyurina YY, Tyurin VA, Serbinova EA, Fabisiak JP, Kagan VE. Redox Cycling of Phenol Induces Oxidative Stress in Human Epidermal Keratinocytes, *J. Invest Dermatol*. 2000, 114, 354-364.
- Sussman JL, Harel M, Silman I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs, *Chem. Biol. Interact*. 1993, 87, 187-197.
- Tabatabaie T, Floyd RA. Inactivation of Glutathione Peroxidase by Benzaldehyde, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1996, 141, 389-393.
- Tarskikh MM, Klimatskaya LG, Kolesnikov SI. Pathogenesis of Neurotoxicity of Acrylates Acrylonitrile and Acrylamide: from Cell to Organism, *Bull. Exp. Biol. Med*. 2013, 155, 451-453.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, ATSDR, TOXICOLOGICAL PROFILE FOR ETHYLENE GLYCOL, Nov 2010.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, ATSDR, TOXICOLOGICAL

- PROFILE FOR TIN AND TIN COMPOUNDS, August 2005.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, RTECS, NIOSH, TOXID9, 66, 251, 2002
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service, NIH, NTP Technical Report No323, 1987.
- Wager TT, Hou X, Verhoest PR, Villalobos A. Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties, *ACS Chem Neurosci*. 2010, 1, 435-439.
- Wager TT, Hou X, Verhoest PR, Villalobos A. Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery, *ACS Chem Neurosci*. 2016, 7, 767-775.
- Wu J, Wang C, Sun J, Xue Y. Neurotoxicity of silica nanoparticles: brain localization and dopaminergic neurons damage pathways, *ACS Nano*. 2011, 28, 4476-89.
- Zhang J, Wang C, Ji L, Liu W. Modeling of Toxicity-Relevant Electrophilic Reactivity for Guanine with Epoxides: Estimating the Hard and Soft Acids and Bases (HSAB) Parameter as a Predictor, *Chem. Res. Toxicol*. 2016, 29, 841-850.
- 食品安全委員会農薬専門調査会、農薬評価書 (案)、メタミドホス、2016.
- G. 研究発表**
1. 論文発表
- 1) Shigeta Y, Iso T, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VI). *Bull. Natl Inst. Health Sci*. 2020, 138, 33-39.
 - 2) Kawashima A, Inoue K, Yoshizaki Y, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Takano M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Yamada T, Hirose A. Combined repeated-dose and reproductive/developmental oral toxicity of 3-methylpentane, isooctane, and isononane in rats. *Fundam. Toxicol. Sci*. 2020, 7, 259-279.
 - 3) Yamazoe Y, Yamada T, Nagata K. Prediction and Characterization of CYP3A4-mediated metabolisms of azole fungicides: an application of the fused-grid template system. *Food Saf (Tokyo)*. 2020, 8, 34-51.
 - 4) Rovida C, Barton-Maclaren T, Benfenati E, Caloni F, Chandrasekera PC, Chesné C, Cronin MTD, De Knecht J, Dietrich DR, Escher SE, Fitzpatrick S, Flannery B, Herzler M, Hougaard Bennekou S, Hubesch B, Kamp H, Kisitu J, Kleinstreuer N, Kovarich S, Leist M, Maertens A, Nugent K, Pallocca G, Pastor M, Patlewicz G, Pavan M, Presgrave O, Smirnova L, Schwarz M, Yamada T, Hartung T. Internationalization of read-across as a validated new approach method (NAM) for regulatory toxicology. *ALTEX*. 2020, 37, 579-606.
 - 5) 山田隆志. IATA の実践および毒性データベースと *in silico* ツールの利用から学んだ知見. フロンティア. 2020, 2(3), 133-139.
 - 6) Rovida C, Escher SE, Herzler M, Hougaard

- Bennekou S, Kamp H, Kroese, DE, Maslankiewicz L, Moné MJ, Patlewicz G, Sipes, N, van Aerts L, White A, Yamada T, van de Water B. NAM-supported read-across: From case studies to regulatory guidance in safety assessment. *ALTEX*. 2021, 38, 140-150.
- 7) Yamazoe Y, Yamada T, Hirose A, Murayama N. Deciphering key interactions of ligands with CYP3A4-Template system. *Food Saf (Tokyo)*. 2021, 9, 10-21.
- 8) Yamada T, Kurimoto M, Hirose A, Yang C, Rathman J. Development of a new threshold of toxicological concern database of non-cancer toxicity endpoints for industrial chemicals. *Front. Toxicol.* 2021, 3, 1-9.
2. 学会発表
- 1) 化学物質の生殖発生毒性の新しいデータベースの開発とその特徴解析, 三浦稔, 栗本 雅之, 川村 智子, 牛田 和夫, 井上 薫, 山田 隆志, 栗形 麻樹子, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 2) 環境化学物質の生理学的薬物動力学 (PBPK) モデリングで使用されるパラメータの構造特異的な特性の評価, 吉田 喜久雄, 明関 由里子, 松本 さおり, 石田 誠一, 山田 隆志, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 3) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用—構造類似物質候補の収集・選択法の確立, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 4) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用—ノナン—1—オール(C₉H₂₀O)の人健康影響評価, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 吉崎 芳郎, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 5) IATA(統合的)アプローチに基づいた皮膚感作性における *in silico* 予測モデルの開発, 鈴木 政晴, 安部 賀央里, 頭金正博, 山田 隆志, 足利 太可雄, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 6) Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Read Across Workgroup: Towards guiding principles for read-across applications. Rooney J, Lizarraga L, Yamada T, Allen D, Babich M, Daniel A, Fitzpatrick S, Garcia-Reyero N, Gordon J, Hakkinen P, Karmaus A, Kleinstreuer N, Matheson J, Mumtaz M, Rua D, Ruiz P, Scarano L, Volarath P, Patlewicz G. 9th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (Oct. 2020, Online).
- 7) Cosmetics Europe database を使用した *in silico* 皮膚感作性予測回帰モデルの開発, 鈴木 政晴, 安部 賀央里, 頭金正博, 山田 隆志, 足利 太可雄, 日本動物実験代替法学会第 33 回大会 (2020 年 11 月 Online)
- 8) Constructing Developmental and Reproductive Toxicity Database of

Chemicals, DART NIHS DB, for Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). Yamada T, Miura M, Kawamura T, Ushida K, Inoue K, Kuwagata M, Katsutani N, Hirose A. 2021 SOT Annual Meeting and ToxExpo (March. 2021, Online)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 Microsoft Excel形式で統合された反復投与毒性データベース

Source	CAS No.	Chemical Name	SMILES/Data Value	Data Unit	Purity (%)	Strain	Endpoint	Route	Test Orgs	Duration (Days)	Dose/Effect	Gender	Reliability	Organ (Tissue)	Test Guid/Max Dose	Min Dose	Dose Unit	Examination Items	Year	Repeatable		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	Triglyceride ↑	Male	B	Blood serum (Lipid)				Blood chemical exam	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	Other findings	Male	B	Blood serum				Blood chemical exam	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	RBC ↓	Male	B	Blood cell (Erythrocyte)				Hematological exam	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	HGB ↓	Male	B	Blood cell (Erythrocyte)				Hematological exam	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	HCT ↓	Male	B	Blood cell (Erythrocyte)				Hematological exam	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	Absolute organ w	Male	B	Liver				Organ weights	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	Relative organ w	Male	B	Liver				Organ weights	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	Body weight ↓	Male	B	Whole body				General signs	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	Triglyceride ↑	Male	B	Blood serum (Lipid)				Blood chemical exam	1972	Yes		
COSMOS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	752 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Oral (Feed/rat)		90 day	Other findings	Male	B	Blood serum				Blood chemical exam	1972	Yes		
Fraunhofer RepDose	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	420 mg/kg/day		Sprague-Daw	LOEL	Feed rat		21 day	Cholesterol ↑	male	B	clinical chemistry					Yes			
Fraunhofer RepDose	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	420 mg/kg/day		Sprague-Daw	LOEL	Feed rat		21 day	Changes in Organ	male	B	liver					Yes			
Fraunhofer RepDose	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	420 mg/kg/day		Sprague-Daw	LOEL	Feed rat		21 day	Functional Disord	male	B	liver					Yes			
Fraunhofer RepDose	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	5235 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Gavage rat		21 day	Mortality Increase	female	B	clinical symptoms					Yes			
Fraunhofer RepDose	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	5235 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Gavage rat		21 day	Weight Increased	female	B	kidney					Yes			
Fraunhofer RepDose	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	1047 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Gavage rat		21 day	Changes in Organ	female	B	liver					Yes			
Fraunhofer RepDose	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	1047 mg/kg/day		Wistar	LOEL	Gavage rat		21 day	Changes in Organ	female	B	spleen					Yes			
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	120 mg/kg/day		Wistar	NOEL	Gavage Rat		3 month	Total	Male	B	Whole bod	No description		1200	120 mg/kg/day	NOEL/LOEL	2004	Yes	
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	120 mg/kg/day		Wistar	NOEL	Gavage Rat		3 month	Relative organ w	Male	B	Liver	No description		1200	120 mg/kg/day	Organ weights	2004	Yes	
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	120 mg/kg/day		Wistar	NOEL	Gavage Rat		3 month	Total	Female	B	Whole bod	No description		1200	120 mg/kg/day	NOEL/LOEL	2004	Yes	
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	120 mg/kg/day		Wistar	NOEL	Gavage Rat		3 month	Relative organ w	Female	B	No descrip	Liver	No description		1200	120 mg/kg/day	Organ weights	2004	Yes
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	142 mg/kg/day		No descrip	Wistar	NOEL	Feed Rat	3 month	Total	Male	B	No descrip	Whole bod	No description		688	27 mg/kg/day	NOEL/LOEL	2000	Yes
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	142 mg/kg/day		No descrip	Wistar	NOEL	Feed Rat	3 month	RBC ↓	Male	B	No descrip	Blood cell	No description		688	27 mg/kg/day	Hematological exam	2000	Yes
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	142 mg/kg/day		No descrip	Wistar	NOEL	Feed Rat	3 month	HGB ↓	Male	B	No descrip	Blood cell	No description		688	27 mg/kg/day	Hematological exam	2000	Yes
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	142 mg/kg/day		No descrip	Wistar	NOEL	Feed Rat	3 month	HCT ↓	Male	B	No descrip	Blood cell	No description		688	27 mg/kg/day	Hematological exam	2000	Yes
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	142 mg/kg/day		No descrip	Wistar	NOEL	Feed Rat	3 month	Ab ↑	Male	B	No descrip	Blood seru	No description		688	27 mg/kg/day	Hematological exam	2000	Yes
FSCI	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	142 mg/kg/day		No descrip	Wistar	NOEL	Feed Rat	3 month	Triglyceride ↑	Male	B	No descrip	Blood seru	No description		688	27 mg/kg/day	Blood chemical exam	2000	Yes
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	138 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Total	Male	B	FDA GLP	Whole body	NTP short	2500	138 mg/kg/day	NOEL/LOEL	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	138 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Triglyceride ↑	Male	B	FDA GLP	Blood serum (Lipid)	NTP short	2500	138 mg/kg/day	Blood chemical exam	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	279 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	RBC ↓	Male	B	FDA GLP	Blood cell (Erythrocyt)	NTP short	2500	138 mg/kg/day	Hematological exam	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	279 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	HGB ↓	Male	B	FDA GLP	Blood cell (Erythrocyt)	NTP short	2500	138 mg/kg/day	Hematological exam	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	279 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	PLT ↓	Male	B	FDA GLP	Blood cell (Platelet)	NTP short	2500	138 mg/kg/day	Hematological exam	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	279 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Ab ↓	Male	B	FDA GLP	Blood serum (Enzym)	NTP short	2500	138 mg/kg/day	Blood chemical exam	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	279 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Absolute organ w	Male	B	FDA GLP	Liver	NTP short	2500	138 mg/kg/day	Organ weights	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	279 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Relative organ w	Male	B	FDA GLP	Liver	NTP short	2500	138 mg/kg/day	Organ weights	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	294 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Total	Female	B	FDA GLP	Whole body	NTP short	2450	147 mg/kg/day	NOEL/LOEL	1995	Yes	
HESS	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	294 mg/kg/day		#98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Other findings	Female	B	FDA GLP	Blood serum	NTP short	2450	147 mg/kg/day	Blood chemical exam	1995	Yes	
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Ab ↑	Male	B	Blood serum	Enzym	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Blood chemical exam	1995	Yes	
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Other findings	Male	B	Blood serum	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Blood chemical exam	1995	Yes		
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	T. cholesterol ↓	Male	B	Blood serum (Lipid)	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Blood chemical exam	1995	Yes		
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	ALP ↑	Male	B	Blood serum	Enzym	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Blood chemical exam	1995	Yes	
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Relative organ w	Male	B	Testis	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Organ weights	1995	Yes		
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Absolute organ w	Male	B	Testis	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Organ weights	1995	Yes		
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Relative organ w	Male	B	Liver	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Organ weights	1995	Yes		
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	T. protein ↓	Male	B	Blood serum	Enzym	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Blood chemical exam	1995	Yes	
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	Relative organ w	Male	B	Kidney	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Organ weights	1995	Yes		
ToxRef	84-74-2	1,2-benzenedicarboxyl	CCCCOC(=O)c1ccccc1	2000 mg/kg/day		98 F344	LOEL	Oral (Feed/Rat)		91 day	PLT ↓	Male	B	Blood cell (Platelet)	Subchronic	2000	125 mg/kg/day	Hematological exam	1995	Yes		

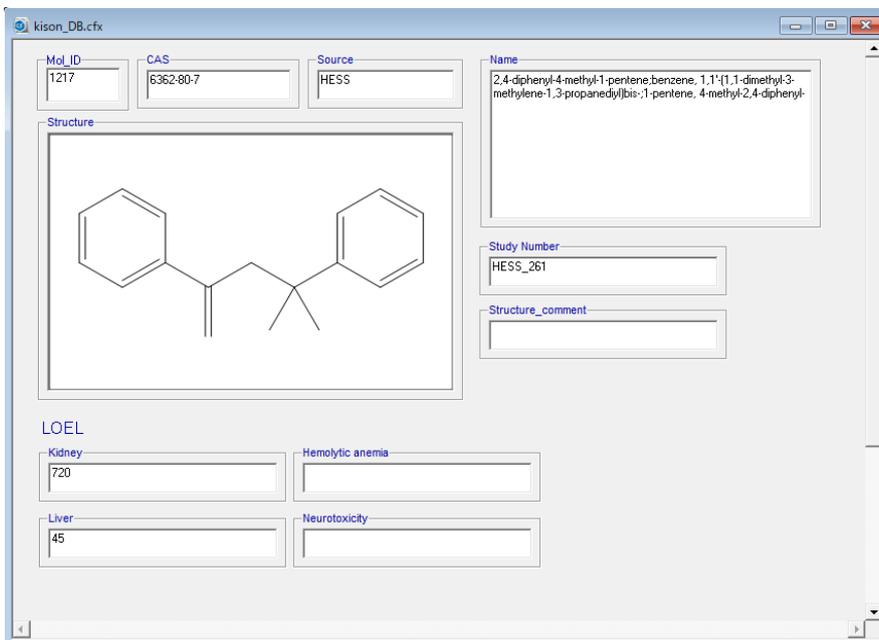


図1 部分構造検索を可能とする ChemDraw形式に変換した反復投与毒性データベース

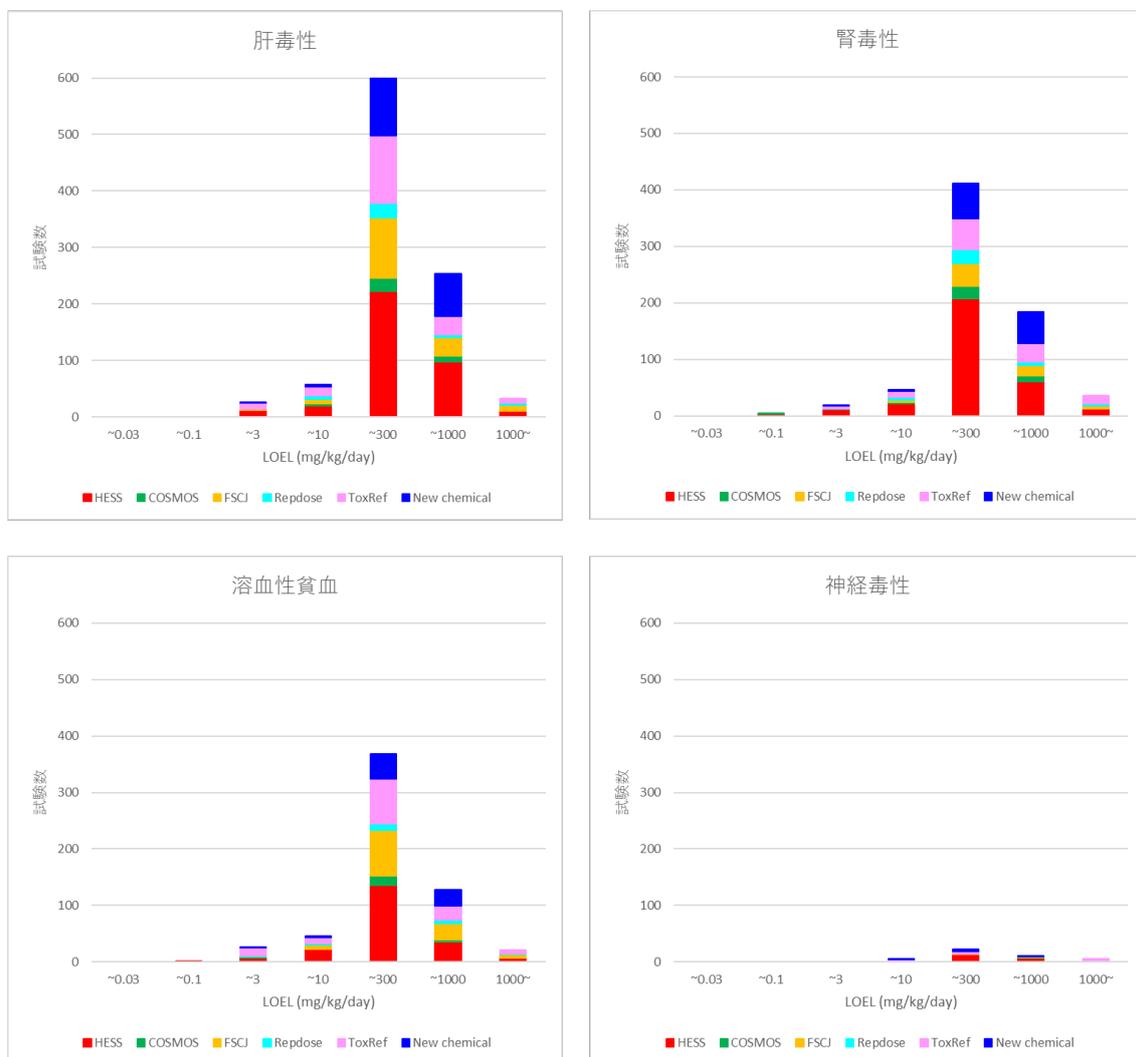


図2 反復投与毒性データベースの活用：亜急性試験を対象とした標的臓器ごとに病理組織学的影響を及ぼす化学物質のLO(A)ELと試験数

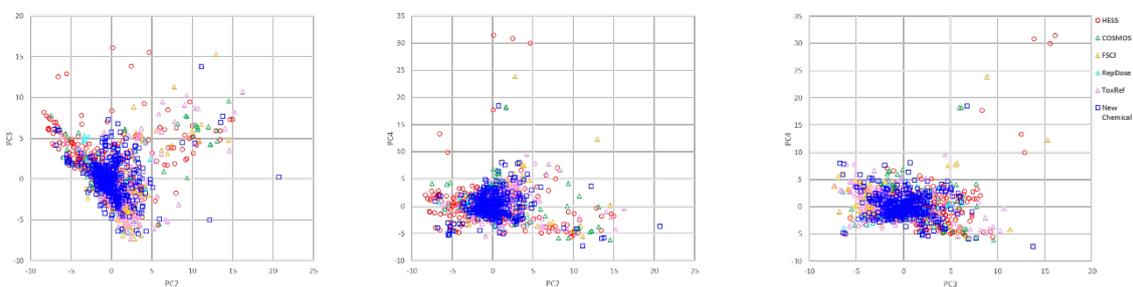


図3 NIHS 統合 DB のデータセット化合物のケミカルスペースの比較

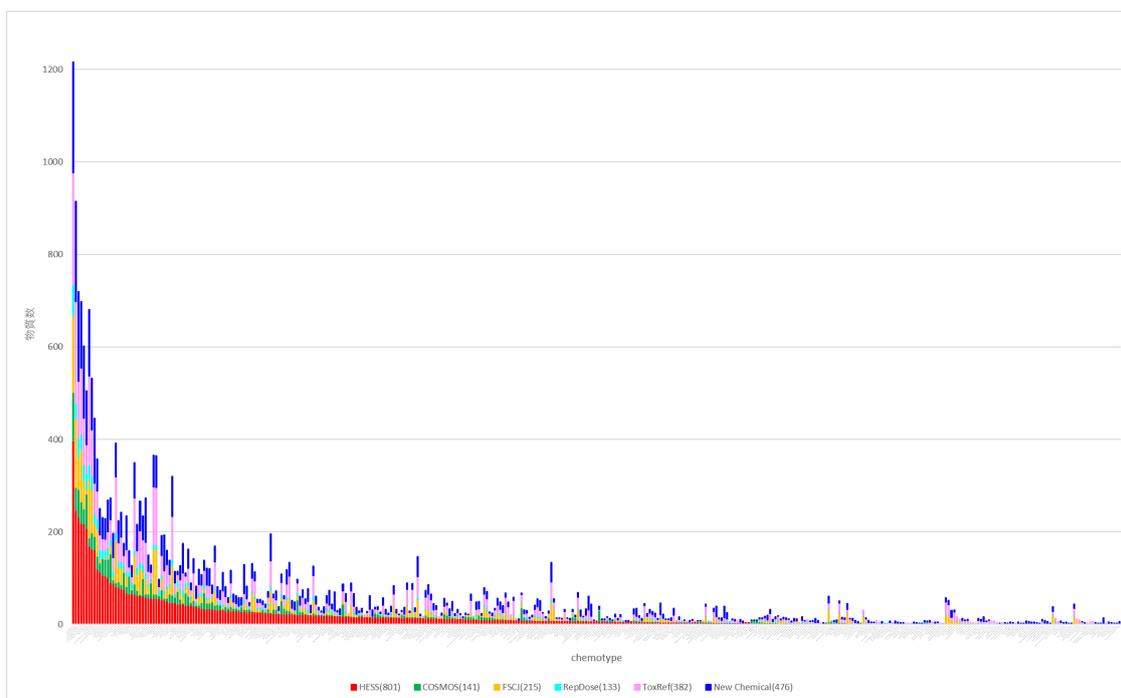


図4 NIHS 統合 DB データセット化合物の ToxPrint ケモタイプ分類の比較

表 2 NIHS 統合 DB から神経毒性が懸念される物質の抽出に用いた観察所見

	Findings
Histopathology	Necrosis, degeneration, other findings in brain, nervous system, sciatic nerve, spinal cord
Clinical sign	Abnormal appearance, Abnormal behavior, Abnormal body position, Abnormal breathing, Abnormal fur, Abnormal gait, Abnormal sensory response, Diarrhea/Loose stool/Bloody stool, emaciation, Lacrimation, lethargy, Locomotor activity ↑, Locomotor activity ↓, Muscle strength ↓, Muscle tone ↓, Piloerection, Ptosis/Palpebral closure, Salivation, Straub tail, Tremor/Convulsion

表 3 本解析で使用了した神経毒性物質の Common Functional Group (CFG)

CFG	Common Functional Group: CFG	Hit	NT/Hit	NT/NT+nonNT
0	CFG not assigned	96	20.8	47.6
1	1,2-OX [X= halogen, O, N]	[39]	28.2	55.0
1a	•1,2-OH/(O): EO	4	50.0	100.0
1b	•1,2-OH/OH: EG	5	40.0	100.0
1c	•1,2-OH/OR: EGE	11	36.4	50.0
1d	•1,2-OH/NH: EA	16	0.0	0.0
1e	•1,2-OH/X: Halohydrin	3	100.0	100.0
2	Dicarbonyl [a/b/g-Diketone (DK)]	5	60.0	60.0
3	Acrylamide/Acrylate/Acrylonitrile (AA/AE/AN)	15	66.7	90.9
4	Aromatic amine/amide	[60]	20.0	50.0
4a	•aniline	52	13.5	38.9
4b	•anilide	8	62.5	83.3
5	Aromatic alcohol w/o N	[72]	33.3	66.7
5a	•free OH	54	38.9	72.4
5b	•ester	3	0.0	0.0
5c	•ether (incl. PhO-AA)	15	26.7	66.7
6	Aliphatic alcohol (ROH w/o N)	[24]	54.2	68.4
6a	•free OH	16	68.8	78.6
6b	•ester	5	60.0	100.0
6c	•ether	3	33.3	50.0
7	Benzyl alcohol/Benzaldehyde/Benzoic acid (BA)	[34]	23.5	53.3
7a	•benzyl alcohol	5	40.0	66.7

7b	•benzaldehyde	2	100.0	100.0
7c	•benzoic acid/ester/amide	15	20.0	50.0
7d	•phthalic acid/ester (Ar/cR-diacid)	12	8.3	25.0
8	Diphenylmethane: <u>bis-phenyl (BP)</u> , benzophenone	20	20.0	28.6
9	Carbamate (CM)	27	59.3	84.2
10	Guanidine (GN)	4	75.0	100.0
11	Hydrazine/Hydrazide/Hydrazone (HDZ)	22	45.5	71.4
12	Neuro Transmitter Mimic	24	83.3	90.9
14	Organochlorine (OC1: Cl \geq 3)	21	61.9	92.9
15	Organohalide (OX: X w/Cl \leq 2)	[27]	37.0	62.5
15a	•aromatic	12	33.3	66.7
15b	•aliphatic	15	40.0	60.0
16	Organophosphorus (OP)	[57]	63.2	97.3
16a	•phosphate	50	58.0	96.7
16b	•phosphonic acid, phosphite, phosphonium	7	100.0	100.0
17	Organosilane (OSi)	10	60.0	66.7
18	Organotin (OSn)	7	85.7	85.7
19	Phenyl heterocyclic (pHet[5/6,N _x])	33	27.3	50.0
20	Pyrethroid (Pyr)	14	21.4	75.0
21	Quinone [benz-, naph-, anth-]	25	16.0	30.8
22	Sulfonamide/urea (SA)	16	31.3	55.6
23	Aliphatic amine (RN)	27	18.5	31.3
24	Nitro-aromatic (ArNO ₂)	36	13.9	31.3
25	Heterocyclic (hetCy): <i>complex molecules</i>	53	18.9	41.7
26	Reactive sp.: <i>complex electrophilic molecules</i>	12	33.3	36.4
27	Natural Product (NP): <i>complex molecules</i>	21	42.9	69.2
28	a-halo-acid/amide/ester	4	75.0	100.0
29	Nitroimidazole: thiamine-like	3	100.0	100.0
30	Diaryl-X [X=N, O, S] (Ar-X-Ar)	21	9.5	33.3
31	Urea [O, S]	11	36.4	50.0
32	Cyanide	9	44.4	57.1
33	Azole: <i>antifungals</i>	8	0.0	0.0
	SUM	838		

*NT: neurotoxic; nonNT: not neurotoxic

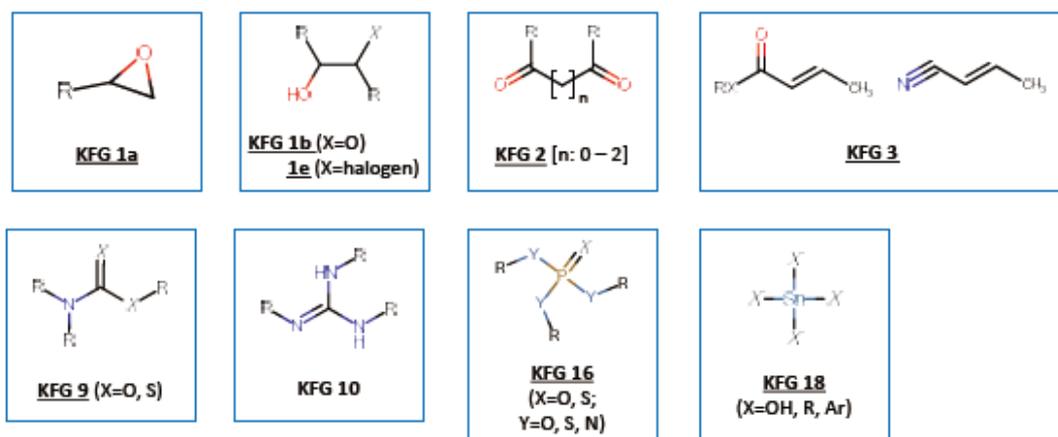


図5 本研究で PCP/BCP の領域を検討した Key Functional Group (KFG)の構造

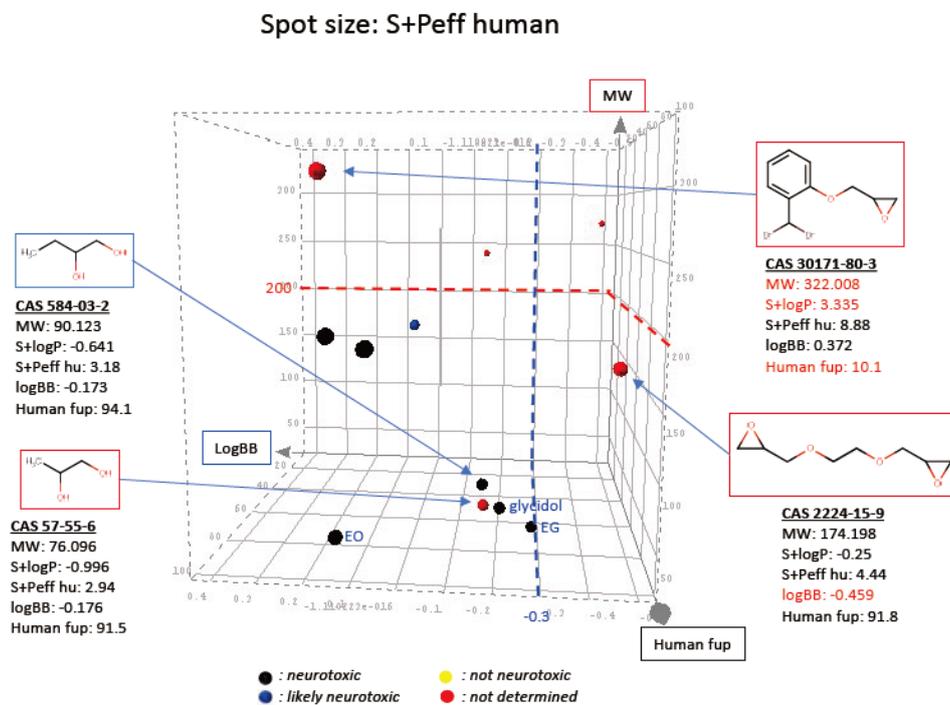
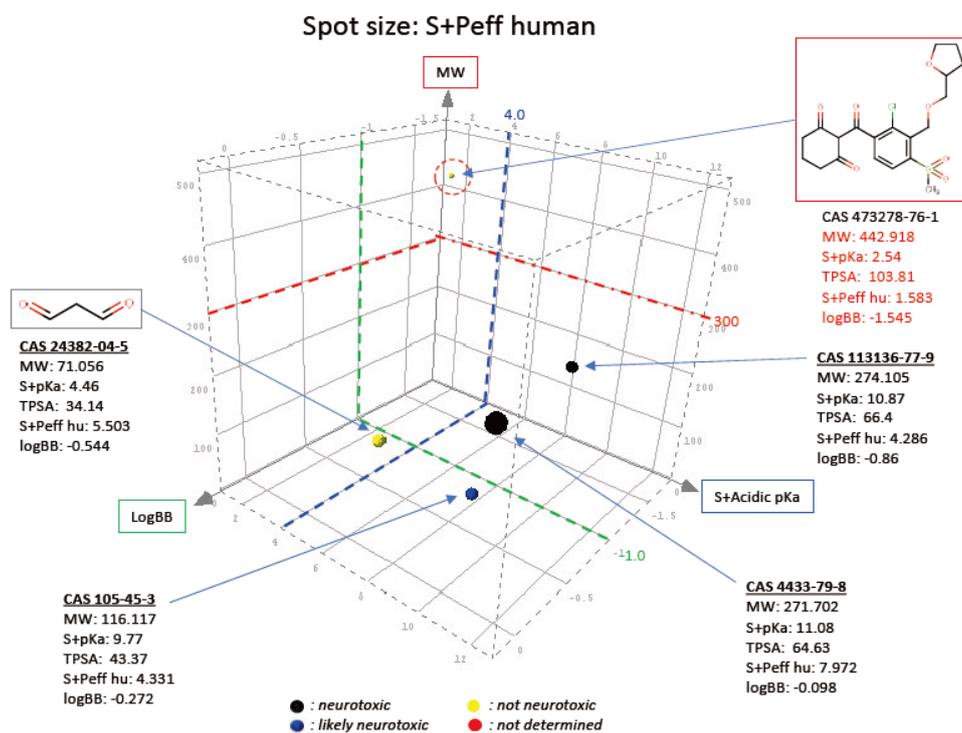


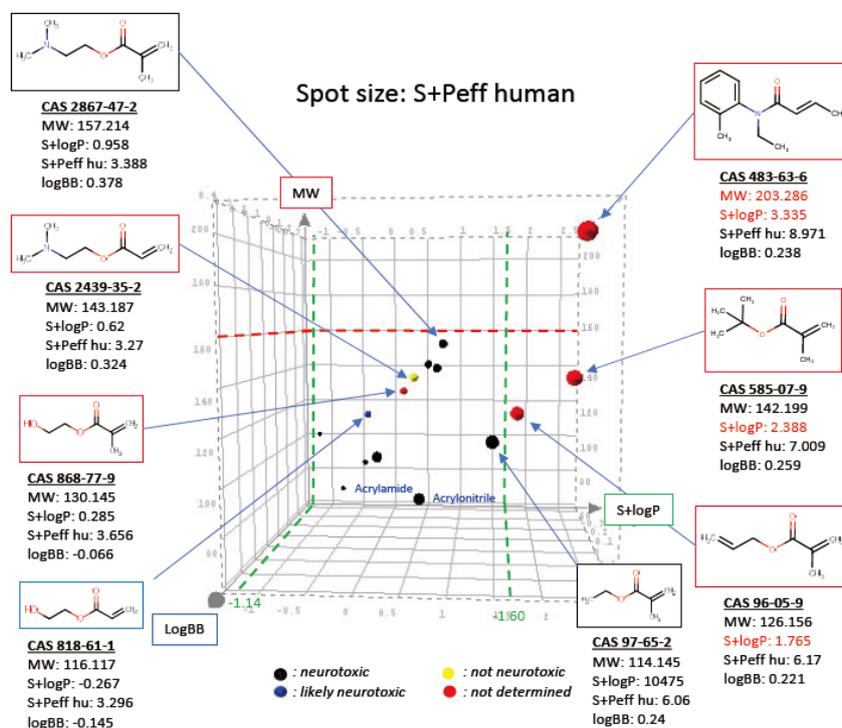
図6 Selection Criteria for KFG 1

①MW: 40 -200 ②S+logP: -1.467 – 2.11 ③S+Peff human > 2.0 ④LogBB > -0.3 Human fup (%) > 60



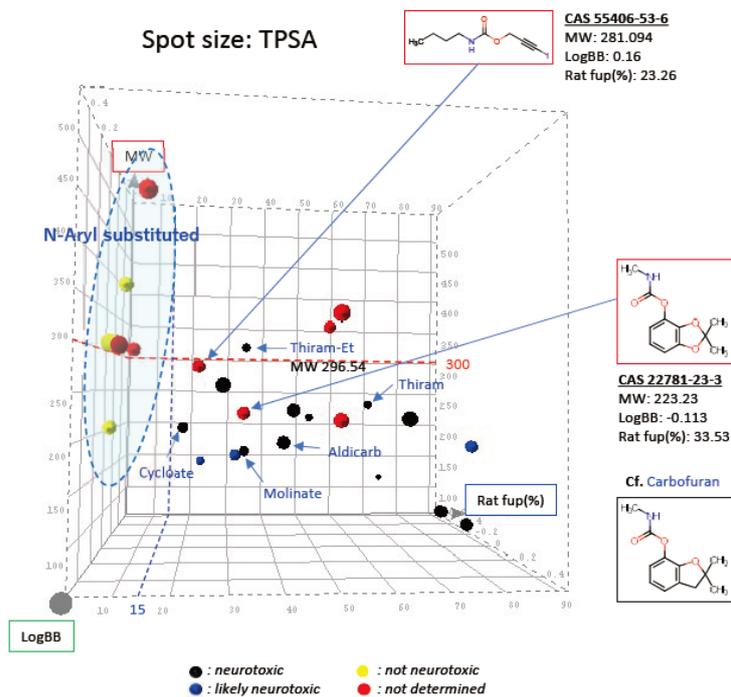
☒ 7 Selection Criteria for KFG 2

- ①MW: 70 – 300 ②S+pKa (acidic) >4.0 ③TPSA <70 ④S+Peff human >4.0 ⑤LogBB: > -1.0



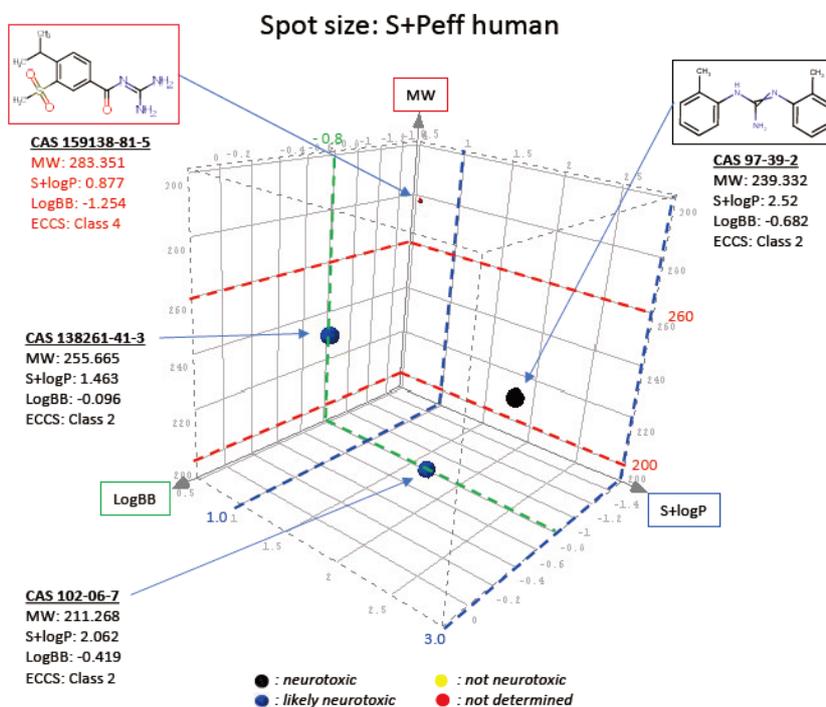
☒ 8 Selection Criteria for KFG 3

- ①MW: 60 – 160 ②S+logP: -1.14 – 1.60 ③S+Peff human >2.0 ④LogBB: > -0.2



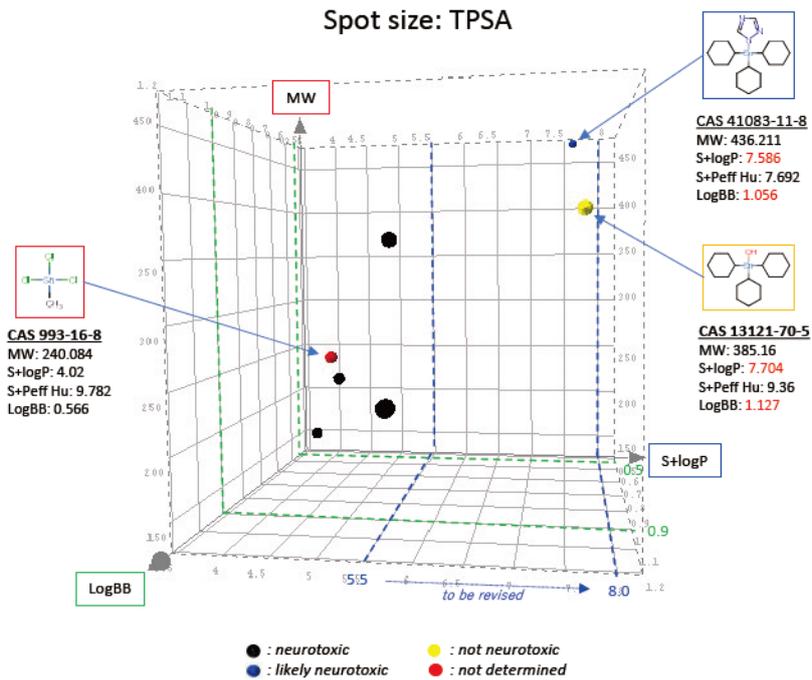
☒ 9 Selection Criteria for KFG 9

①MW < 300 ②LogBB > -0.6 (> -1.0) ③Rat fup (%) > 15 ④N-substituents: *better flexible/rotatable**



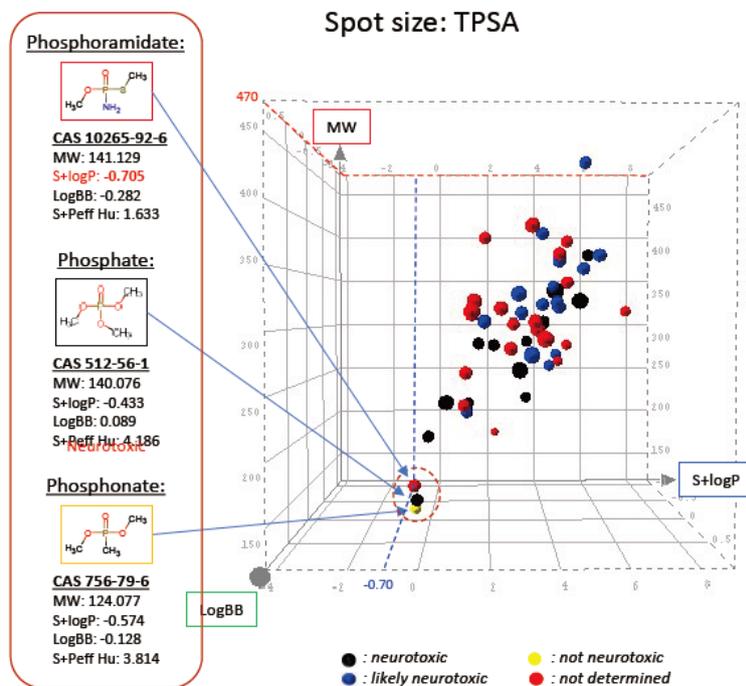
☒ 10 Selection Criteria for KFG10

①MW: 200 – 260 ②S+logP: 1.0 – 3.0 ③LogBB > -1.0 ④ECCS: Class 2



☒ 11 Selection Criteria for KFG16

①MW: 124 – 480 ②S+logP: -0.70 – 5.85 ③LogBB > -1.1 ④S+Peff hu: 1.41 – 9.02



☒ 12 Selection Criteria for KFG 18

①MW: 164 – 370 ②S+logP: 3.9 – 5.5 ⇒ 3.9 – 8.0 ③S+Peff hu: 9.25 – 11.49 ④LogBB: 0.5 – 0.9

令和 2 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	重田 善之	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	村田 康允	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	Susanne Stalford	ラーサ研究所		
	Adrian Fowkes	ラーサ研究所		
	Alun Myden	ラーサ研究所		
	Emma Hill	ラーサ研究所		

研究要旨

令和 2 年度は、昨年度に生殖発生毒性に関するリードアクロスの精度向上を目指して行われた毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして特定された標的に対して、ゴナドトロピン放出ホルモン受容体 (GnRHR) とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) に関連した AOP (毒性発現経路) の開発を検討した。その結果、GnRHR 結合阻害による妊娠損失と、HDAC 阻害による発生毒性の AOP を開発することができた。GnRHR リガンドを用いた生殖発生毒性試験では、生殖能の低下および胚・胎児毒性の可能性が示されており、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) システムが着床および胎盤機能に関与すること考えられた。その結果、GnRH に関連した AOP として GnRHR 結合から妊娠損失の増加に至る 2 系統の AOP を開発した。一方、HDAC 阻害剤として分類されるいくつかの化合物は、実験動物に催奇形性反応として心欠陥、骨格奇形および神経管閉鎖障害などを引き起こす。発生毒性に関する文献調査の結果、HDAC 阻害から中軸骨格欠損に至る 3 系統の AOP を開発することができた。本研究では、生殖毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして特定された標的に対して、より詳細な文献調査を行えば生殖毒性を引き起こす AOP を開発できることが明らかとなった。これらの AOP の開発は、リードアクロスに対する知識を拡大できる可能性があることに加え、これらの AOP ネットワークを利用して未解明の部分に新たな毒性機序に関する仮説を立てるなどして、AOP 内の各イベントを各種 (*in vitro*) 試験法等に関連付けることで検証を行いながら、新たな試験戦略を構築できるという可能性も拓がると考えられた。

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。そこで、反復投与毒性の毒性予測モデル開発の一環として、令和2年度は、昨年度より取りかかった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行われた毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして新規のAOPを開発するという手法をに基づき、更に2つのAOPの開発を検討した。

B. 研究方法

昨年度は、毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連性のあるデータセットに含まれる標的から、GnRHRと生殖毒性の間のシグナルについてのAOPの作成を試みたが、その中に多く含まれるニトロベンゼン類の調査では、本来の受容体を介する影響ではなく、グルタチオンの枯渇を伴う酸化ストレスによる精巣毒性のAOPを作成することとなった。今年度はGnRHRによる本来の生物学的影響の蓋然性に基づき、様々なDARTエンドポイント(雌の受胎率、催奇形性および発生毒性等)とGnRHR変調の間の因果関係を明らかにするため、さらなる文献調査を実施し、GnRHR阻害によるAOPの作成を試みた。また、昨年度のデータセットとToxCast試験結果との相関マイニングによって、発生生殖毒性傾向が潜在すると特定

されたタンパク質標的の一つとして、HDACの阻害と生殖毒性の間の弱いシグナルも特定されており、さらなる文献検索の結果に基づき、発生毒性と関連したHDACの阻害によるAOPを作成した。

(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. GnRHR 阻害 AOP の作成

標的の役割

GnRHは、GnRHRの活性化を通じて生殖を調節する、デカペプチドである(Flanagan, 2017)。GnRHとGnRHRはいずれも視床下部-下垂体-性腺(HPG)軸の主要な構成要素であり、男性および女性の生殖能の維持に不可欠である(Oyola, 2017)。HPG軸では、視床下部から分泌されたGnRHがGnRHRに結合し活性化する。下垂体でこの受容体が活性化されることにより、下垂体における黄体形成ホルモン(LH)および卵胞刺激ホルモン(FSH)の両方の放出が調節される(Desaulniers, 2017; Flanagan, 2017)。続いて、LHおよびFSHは、配偶子形成、性腺細胞の増殖および性腺におけるステロイド産生など、生殖能の鍵となるプロセスを調節する(Flanagan, 2017)。

哺乳類では、2種のGnRHデカペプチドと2種のGnRHRアイソフォームが同定されており(Desaulniers, 2017; Lee, 2010; Maggi, 2016)、各GnRHは特定の受容体に作用すると考えられている。しかし、GnRH IIおよびGnRHR IIは、すべての哺乳類種で検出または発現されておらず、例えばラットにはGnRH IIの遺伝子が含まれていない。さら

に、ヒトは GnRHR II 遺伝子を保有しているが、完全長タンパク質を産生することはできない。そのため、GnRH II および GnRHR II の役割はまだ完全に解明されていない。

また、GnRH および GnRHR は、生殖能以外の生物学的過程を調節し、HPG 軸から独立していると考えられている。例えば、GnRH およびその受容体は、視床下部および下垂体以外の器官（胎盤、腎臓、卵巣、精巣など）で発現することが明らかになっている(Lee, 2010; Rama, 2001)。雌の生殖器および胎盤に発現する GnRH および GnRHR は、着床や胎盤形成などの過程で重要な役割を果たすと考えられているため(Chou, 2004; Lee, 2010)、妊娠維持に GnRH が重要である可能性がある。ヒトでは、胎盤性 GnRH がヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)

(胎盤形成や胎盤の脈管形成など、いくつかの重要な過程を調節するホルモン)の発現を調節することが明らかになっている(Cole, 2010; Keay, 2004)。

AOP 概要

GnRH 系が生殖能、着床および胎盤形成において重要な役割を果たすことを考慮すると、GnRH シグナル伝達障害が生殖能および妊娠転帰の異常につながり得ることは、生物学的に妥当である。この AOP は、GnRHR の結合阻害が、特に着床と胎盤の発生および機能の妨害を通して妊娠損失の増加を引き起こす可能性があるという裏付けのエビデンスを示している。この経路を裏付けるエビデンスには以下が含まれる。

- ・ GnRH アゴニストおよびアンタゴニストの両方を用いた前臨床 *in vivo* 毒性試験では、これらのタイプの化合物の投与により胚・胎児毒性が生じる可能性がある

ことが示されている。妊娠中のラットおよびウサギに GnRH 受容体アンタゴニスト（および1種類のアゴニスト）を投与した試験では、胎仔生存率の低下が認められた。妊娠中のヒヒに受容体アンタゴニストおよびアゴニストを投与したところ、死産仔および胎盤重量の減少が認められた。

- ・ GnRH により調節されるシグナル伝達分子の遺伝子 (ERK1 および ERK2) を胎盤で選択的にノックアウト (KO) したマウスの試験では、妊娠期間延長、胎盤構造の異常、産仔数減少および新生児死亡率増加が認められた(Brown, 2019)。

この経路は、以下の関連試験によりヒトへの適用可能性も裏付けられている。

- ・ ヒト胎盤細胞（栄養膜細胞および脱落膜間質細胞）を用いた *in vitro* 試験で、GnRH デカペプチドと GnRHR-I はともに胎盤で発現するだけでなく、hCG の発現を調節することが示されている(Chou, 2004; Lee, 2010)。hCG は、妊娠初期における黄体の維持など、妊娠を支援する重要な生物学的過程を調節する(Cole, 2010; Keay, 2004)。さらに、hCG は胎盤に十分な血液を供給するために子宮の脈管形成を調節していると考えられている(Cole, 2010)。したがって、GnRH 受容体の拮抗作用を介した GnRH の胎盤機能への影響は、上記のような調節過程を乱し、流産を増加させる可能性があると考えられる。
- ・ GnRH は哺乳類において着床を調節する重要な因子として特定されている(Desaulniers, 2017; Maggi, 2016)。ヒトにおける GnRHR の不活性化が着床障害につ

ながら得るといのは生物学的に妥当である。この主張を裏付ける実験に基づくエビデンスは限られており、現在のところ結論は出ていない。

- 体外受精(*In Vitro* Fertilization: IVF)治療計画において、GnRH アゴニストおよびアンタゴニストは、FSH および LH 分泌を抑制するために使用される(Depalo, 2012; Santos, 2010)。しかし、IVF で GnRH アンタゴニストを使用すると着床率が減少し、早期妊娠損失が増加するという懸念が複数の文献で提起されている(Blumenfeld, 2001; Hernandez, 2000; Kol, 2000)。
- IVF における GnRHR 調節因子の使用が着床に及ぼす影響を検討した複数のコホート研究が発表されている。これらの研究の結果はまちまちであり、例えば入手可能なメタデータのレビューから、GnRH アンタゴニストおよびアゴニストに基づく IVF が着床成功率の低下を引き起こす可能性があることが示唆された(Santos, 2010)。しかし、別の研究では、IVF 治療計画において GnRH 調節因子を使用した場合、GnRH 調節因子を使用しなかった場合と比較して、IVF 治療計画を通じて妊娠率が改善することが示された(Depalo, 2012)。

GnRHR 調節と着床障害の関連性を直接に裏付ける実験的データはないが、GnRHR 系の既知の役割と生物学的妥当性に基づいて、この AOP に含めた。

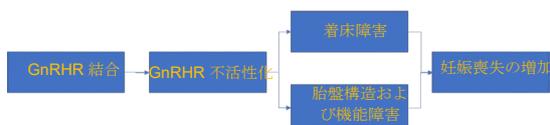


図 1. GnRHR 結合の AOP による妊娠損失の増加

GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化

GnRH は、GnRHR に結合することで下垂体からの FSH および LH の放出を調節する視床下部デカペプチドであることが最大の特徴である(Desaulniers, 2017; Flanagan, 2017)。哺乳類では、2 種の GnRH (GnRH I と GnRH II) および 2 種の GnRHR (GnRHR I と GnRHR II) が特定されている(Desaulniers, 2017)。GnRH がその受容体に結合すると、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) カスケードが活性化され、遺伝子転写が変化する。GnRHR I と II はともに MAPK ERK1 と 2 を活性化することが知られているが、GnRHR I は MAPK p38 MAPK およびビッグ MAPK も活性化させることが実証されている(Desaulniers, 2017; Liu, 2009)。

GnRH およびその受容体は、胎盤、卵巣、子宮内膜など、その他の多くの器官および組織に認められている(Cheng, 2000; Desaulniers, 2017; Terashima, 2016; Maggi, 2016)。GnRH 受容体にアンタゴニストが結合すると、受容体が不活性化される。GnRH アンタゴニストは競合的に受容体に結合し、GnRH アンタゴニストへの長期曝露により、受容体の発現が低下する可能性がある(Hernandez, 2000)。したがって、GnRH 受容体アンタゴニストの結合が、受容体の不活性化および関連する遺伝子発現の減少につながる可能性がある。GnRHR アンタゴニストの例としては、アバレリックス、ガニレリックス、セトロレリックスがある(FDA, 2003; EMA, 2004)。

GnRHR アゴニストへの長期曝露により GnRHR 発現が減少するため、受容体の活性が低下することも示されている(Kol, 2000;

Hernandez, 2000)。ゴセレリンは、長時間の投与により GnRHR 活性が低下する GnRHR アゴニストの一例である(Zeneca, 1998)。

GnRHR 不活性化 => 着床障害

GnRH および GnRHR は、特定の子宮内膜細胞(上皮細胞および間質細胞)で発現することが分かっている(Maggi, 2016)。これらの細胞における GnRH および GnRHR の発現は月経周期の黄体期に増加し、着床のための子宮内膜の準備に働くと考えられている。このことから、GnRHR アンタゴニストまたは強力なアゴニストの投与により着床障害が起こる可能性があることは生物学的に妥当である。

GnRH 調節因子が着床を阻害することを示す実験データは限られている。ゴセレリンは、長期使用により GnRHR 活性を低下させる作用を有する GnRHR アゴニストであり、投与された雌動物群において生殖能の障害を引き起こした(Zeneca, 1998)。投与終了後、交尾成立は回復したが、排卵率および着床率は低下したままであった。

この生物学的妥当性および動物での限られたエビデンスにも関わらず、GnRHR 調節因子は IVF 治療計画で使用されている(Depalo, 2012; Santos, 2010)。IVF 治療における GnRHR 調節因子の使用に伴う着床へのリスクに関する懸念は、いくつかのグループによって検討されている(Blumenfeld, 2001; Hernandez, 2000; Kol, 2000)。公表された試験の結果は、例えば以下のように様々である。

- 入手可能なメタデータのレビューから、GnRH アンタゴニストおよびアゴニストに基づく IVF が着床成功率の低下を引き起こす可能性があることが示唆された

(Santos, 2010)。

- IVF での GnRHR アゴニストの使用は、GnRHR アンタゴニストを使用する IVF に比べて、子宮内膜厚が増し、妊娠率を高めることが観察されている(Maggi, 2016)。
- Tug らにより、ガニレリクスを着床期の初期に4日間連日投与する治療計画が着床率に影響しないことが観察された(Tug, 2011)。

IVF 治療計画において GnRH 調節因子を使用した場合、GnRH 調節因子を使用しなかった場合と比較して、IVF 治療計画を通じて妊娠率が改善することが示された(Depalo, 2012)。この KER (Key Event Relationship) を裏付ける上述のエビデンスは、ばらつきのある限られた実験的エビデンスと共に、主に生物学的妥当性に基づいている。この KER を裏付けるエビデンスは限られているが、IVF 治療における着床率低下への関与の可能性から、これを本 AOP に含めることは妥当といえる。

着床障害 => 妊娠損失の増加

着床の成功は妊娠に不可欠である(Schoenwolf, 2014)。ヒトでは、着床後の栄養膜細胞から hCG が分泌され、これが妊娠初期に胎盤が十分に発育するまで黄体を補助する。着床の過程が乱されると、妊娠損失が増加する可能性がある。着床しなければ直ちに妊娠損失が生じる一方、着床に障害が生じた場合には黄体の補助が不十分になることがある。妊娠第 1 三半期の妊娠損失の主要な原因に関する研究から、着床障害から生じる可能性がある黄体の維持の失敗が、早期妊娠損失の一般的な原因であることが明らかになった(Baird, 2009)。

GnRHR 不活性化 => 胎盤の構造および機能障害

GnRH は、GnRHR との結合を通して胎盤機能を調節することが実証されている (Desaulniers, 2017; Maggi, 2016)。したがって、GnRHR の不活性化が胎盤機能障害をもたらす可能性があることは生物学的に妥当である。

GnRHR の不活性化が胎盤の構造および機能の障害をもたらす可能性があることが示す、動物モデルを用いた試験には、以下のものがある。

- ・ マウスを用いた組織選択的 KO 試験から、妊娠中の胎盤 GnRHR 活性の重要性が裏付けられている (Brown, 2019)。これらの試験では、胎盤 GnRHR により活性化されるシグナル伝達分子 ERKI および ERKII を KO した。その結果、妊娠期間の延長、胎盤構造の異常、産仔数の減少、新生仔死亡率の増加が認められた。
- ・ 妊娠中に GnRH アンタゴニストを投与した 3 匹のヒヒのうち、1 匹は低出生体重仔を出産し、2 匹は死産した (Siler-Khodr, 1984)。死産の 1 匹から摘出した胎盤は正常胎盤の半分の大きさであった。ヒヒは CG (絨毛性ゴナドトロピン: GnRH により調節されるホルモンで、黄体機能の維持およびプロゲステロンの発現を通じて妊娠を補助することが知られている) を発現する。しかし、CG と GnRH アンタゴニスト投与との間に相関は認められなかった。妊娠した雌に対し、CG のピーク後 (これ以降 CG の濃度が低下すると予測される) に GnRH アンタゴニストを投与した。したがって、著者らは、化合物投与が CG 濃度に及ぼす影響を明

らかにすることができなかった。投与された動物では、プロゲステロン、エストロゲンおよびエストラジオールの減少が認められた。

- ・ また、長時間作用型 GnRH アゴニストであるゴセレリンを投与した妊娠したヒヒでは、胎盤機能障害が認められた (Kang, 1989)。これらの試験では、対照群と比較して CG およびプロゲステロンの平均濃度がいずれも低下した。長時間または高用量の GnRHR アゴニストを投与すると、GnRHR が下方制御され、受容体が不活性化されるため (Kol, 2000; Hernandez, 2000)、ゴセレリンが GnRHR を不活性化する可能性がある。
- ・ GnRHR アンタゴニストであるオルガノン-30276 を投与したヒヒでは、平均 CG 濃度の低下とプロゲステロン濃度の不安定化が認められた (Kang, 1989)。投与された 5 匹のヒヒのうち 3 匹では、対照濃度よりもはるかに高いプロゲステロン濃度が示された。これらの異常に高いプロゲステロン濃度は、胎盤のフィードバック制御の結果であるとの見解が提案された。ヒヒ CG に対する用量依存性の影響が観察され、50 mg 投与群の 3 匹のヒヒは正常なヒヒ CG 濃度を示したが、100 mg 投与群の 2 匹は対照群に比べてピーク CG が低かった。
- ・ GnRHR アンタゴニストであるセトロレリクスをラットに子宮内投与した試験では、胎盤発生が抑制された (Tug, 2011)。一方、ヒトに適用可能な KER のエビデンスとしては、GnRH が GnRHR を介して作用し、hCG の発現を用量依存的に調節することが示されている (Lin, 1995)。GnRH-I、

GnRH-II、GnRHR-I mRNA およびタンパク質は、妊娠満期に分離されたヒト胎盤細胞（栄養膜細胞、脱落膜間質細胞、不死化細胞株）で発現することが明らかになっている（Lee, 2010）。これに加えて、GnRH-I または GnRH-II で処理した栄養膜（および栄養膜由来）細胞では用量依存性の hCG 産生の増加が認められた。上記の用量反応試験の一環として、他のサイトカイン（インターロイキン 8、血管内皮増殖因子など）の調節を評価したところ、GnRH-I または-II には反応しないことが明らかになった。これは、栄養膜細胞では、GnRH とその受容体が主として hCG の発現を調節することを示している。妊娠満期および妊娠第 1、2 三半期での治療的流産における GnRH 投与とヒト胎盤の hCG 産生との間にも、同様の関係が認められた（Lin, 1995）。9 週で終了した妊娠において胎盤を摘出したところ、beta-hCG の増加が最も大きかった。GnRH アンタゴニスト（Nal-Glu）の併用投与により、beta-hCG の発現増強が抑制された。これらの胎盤組織での GnRH 受容体 mRNA の試験では、妊娠第 1 三半期の胎盤外植片では GnRH 受容体が高濃度で存在し、9 週の外植片では発現量が最大であることが示された。この GnRH 受容体の発現パターンは、妊娠中の hCG 濃度パターンと一致する。

これらの試験は、胎盤 GnRH 受容体の活性低下が hCG 濃度の低下につながる可能性があることを示している。さらに、子宮内膜細胞は GnRH および GnRHR を発現することが示されており、胚-子宮内膜付着後にこの系がパラクライン作用で hCG の発現をサポートするとの見解が提案されている（Maggi, 2016）。

胎盤の構造および機能障害 => 妊娠損失の増加

胎盤は、母体から発育中の胚/胎児へ栄養を供給するとともに、主要なホルモン [CG (ヒトおよび高等霊長類)、プロゲステロン、およびエストロゲン] の調節および産生を通じて妊娠を補助している（Schoenwolf, 2014）。胎盤の正常構造および生物学的機能を損なうことにより妊娠の補助が低下し、結果として妊娠損失が増加する可能性がある。GnRHR の不活性化によって誘発される胎盤の構造および機能の障害と妊娠損失増加との関連性を裏付ける哺乳動物に適用可能な KER のエビデンスエビデンスを以下に示す。主に、妊娠中の動物（サル、ラット、ウサギ）への GnRHR アンタゴニスト投与および KO マウスモデルにより、生仔出生数の減少と胎盤構造障害との間に関連性があることが示されている。

- ・胎盤 GnRHR 活性を選択的に KO したマウスの KO 試験では、胎盤発生障害とそれに伴う産仔数の減少および新生仔死亡率の上昇が認められた（Brown, 2019）。
- ・GnRHR アンタゴニストを投与した妊娠中のサル 3 匹のうち、2 匹は死産、1 匹は出生時低体重であった（Siler-Khodr, 1984）。このうち 1 匹の胎盤を観察したところ、正常な胎盤の大きさの半分であった。さらに、CG、エストロゲン、プロゲステロンの産生が損なわれていた。
- ・GnRHR アゴニストであるゴセレリンを妊娠 14~21 日目から投与したヒヒでは、妊娠損失が増加した（Kang, 1989）。ゴセレリンを投与した 6 匹のヒヒのうち、3 匹が死産に至り、2 匹が流産し、1 匹が低出生体重で出生した。プロゲステロンおよ

びCGの濃度はいずれもゴセレリンの投与により損なわれていた。著者らは、観察された妊娠損失の増加は胎盤の障害による可能性があることを示唆している。

- ・ **GnRHR** アンタゴニストであるオルガノン-30276 を妊娠中に投与したヒヒでは、妊娠損失が増加した(Kang, 1989)。オルガノン-30276 を投与した 5 匹のヒヒのうち、1 匹は死産 (50 mg 投与群)、2 匹は流産 (100 mg 投与群)、2 匹は生仔出産 (50 mg 投与群) した。この試験では、投与を行った全ヒヒの平均CG濃度は対照群よりも低かったが、出産した2匹および死産の1匹のヒヒのプロゲステロン濃度は対照群よりもはるかに高かった。著者らは、この正常よりも高いプロゲステロン産生が、胎盤のフィードバック制御の結果である可能性を示唆している。一方、ヒトに適用可能なKERのエビデンスとしては、hCGの発現が黄体細胞におけるプロゲステロン合成の促進、着床、脈管形成、栄養膜細胞の合胞体細胞への分化、および胎児の成長に応じた子宮の成長など、いくつかの重要な過程の制御を通じて妊娠を促進することが知られている(Cole, 2010)。GnRH受容体の不活性化による胎盤でのhCG産生の減少は、hCGの機能に影響を及ぼし、胚・胎児死亡に至る可能性が知られている。
- ・ hCGは、子宮脈管構造における血管新生および脈管形成を促進することが示されている(Cole, 2010)。子宮脈管構造は、胎盤浸潤に不可欠な血液を供給し、胎児に栄養を供給する。
- ・ hCGは、早期の妊娠の維持に重要な黄体

とプロゲステロンおよびレラキシンの合成を維持する(Keay, 2004)。

- ・ hCGは免疫抑制を調節し、胎盤浸潤を補助していることが、多くの研究で示されている(Cole, 2010)。

AOPと関連する医薬品の例

市販されているいくつかの医薬品(アゴニストおよびアンタゴニストの両方)がGnRHRを標的とするよう開発されている(Tarlatzis, 2007)。アンタゴニストは受容体に競合的に結合するため、GnRHが介在する作用(LSおよびFSHの放出など)を阻害する。一方、アゴニストは受容体と結合して活性化する(LHおよびFSHの急激な放出など)。しかし、アゴニストによって受容体が長時間刺激されると、受容体が下方制御されてGnRHに対して脱感作が起こるため、下垂体ホルモンの放出が減少する。したがって、GnRHアゴニストおよびアンタゴニストはいずれもGnRHRを不活性化する可能性がある。

アンタゴニスト:

動物モデルに投与した場合、いくつかのGnRHアンタゴニストで同様の有害性発現(雌雄の生殖能に対する可逆的な障害、胎仔吸収の増加、催奇形性の欠如)が誘発された。

● アバレリックス

雌ラットに0.3~10 mg/kgの用量でGnRHRアンタゴニストであるアバレリックスを皮下投与したところ、生殖能に対する用量依存性の影響が認められた(FDA, 2003)。

● ガニレリクス

ガニレリクス(GnRHRアンタゴニスト)をそれぞれ0.1 ug/kg/日および0.5 ug/kg/日

を超える用量でラットに投与したところ、雄および雌の生殖障害が観察された(EMA, 2004)。妊娠中（器官形成期）にガニレリクスを投与したラットおよびウサギでは、胎仔吸収率が増加したが（ラットで 10 ug/kg/日、ウサギで 30~50 ug/kg/日）、催奇形性は認められなかった。別の生殖毒性試験でも、雌雄ラットが高用量（100 ug/kg/日以上）で不妊となり、この作用は投与終了時に回復することが示された(Merck, 2019)。

- セトロレリクス

雌雄ラットにセトロレリクスを投与したところ、用量依存性の生殖毒性が認められた(EMA, Cetrotide Scientific Discussion, 2004)。雌ラットでは生殖能の低下も認められ、いずれの影響も可逆的であった。異常または催奇形性は認められなかった。

- オルガノン-30276

5匹の妊娠したヒヒに、GnRH アンタゴニストであるオルガノン-30276 を 50 または 100 mg の用量で妊娠第 14~21 日から継続投与した(Kang, 1989)。低用量群の 3 匹では、対照群と比較して 3 匹とも正常なヒヒ CG (bCG) 濃度であった。1 匹は死産となり、他の 2 匹は正常な妊娠転帰となった。しかし、19 日目に 1 匹の新生仔が死亡した。高用量群の 2 匹では、いずれの妊娠も流産し、低濃度の bCG が観察された。プロゲステロン濃度は、妊娠初期に流産しなかった投薬動物の方が高かった。この所見は、GnRH シグナル伝達系の乱れによる胎盤の正常な恒常性の破綻に起因すると考えられている。

アゴニスト：

GnRHR アゴニストは生殖能を（可逆的に）低下させ、胚・胎児毒性を引き起こす可能性がある。

- ゴセレリン

ヒトの推奨用量（500~1000 ug/kg/日）の 30~60 倍のゴセレリンを投与した雄ラットでは、精巣、精巣上体、精嚢および前立腺の重量減に加え、萎縮性の組織学的変化が認められ、精子形成が完全に抑制された(FDA, 1998)。同様の用量を投与した雌ラットでは卵巣機能が抑制され、卵巣の大きさおよび重量の減少、卵胞発達の停止、黄体の大きさおよび数の減少が引き起こされた。これらの所見の大部分は投与終了後に回復可能であったが、生殖能は低下し、着床数および成功した妊娠における生存胎仔数は減少した。妊娠したヒヒ 6 匹に対して、妊娠第 14 日にゴセレリンを低用量（3.6 mg）または高用量（7.2 mg）投与した(Kang, 1989)。低用量を投与した 2 匹の妊娠のうち、1 匹は bCG が緩やかに増加して流産に至り、もう 1 匹は対照群と同程度の bCG 濃度であったが死産に至った。高用量群では、2 匹が流産し（いずれも対照群よりも著しく低い bCG 濃度であった）、1 匹は低出生体重仔が生まれて新生仔死亡に至ったが、もう 1 匹は正常妊娠であった。このことは、GnRH アゴニストを妊娠初期に投与すると、妊娠期間を通して黄体機能と胎盤機能に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。

- レウプロレリン

成人を対象とした臨床試験では、レウプロレリンを 24 週間にわたり投与した結果、生殖能が抑制されたが、投与中止後に回復した(FDA, 2012)。妊娠したウサギを用いた毒性試験では、用量依存性の胎仔異常の増加が認められ、高用量群では胎仔体重の減少が認められた。ラットを用いた同様の試験では異常は認められなかったが、高用量

群で胎仔死亡の増加および胎仔体重の減少が認められた。

C.2. 発生毒性を引き起こす HDAC 阻害 AOP の作成

標的の役割

HDAC は、ヒストン尾部での特定のアセチル化リジン残基の脱アセチル化を促進する酵素のファミリーである (Seto, 2014)。HDAC とヒストンアセチルトランスフェラーゼのいずれも、クロマチン/ヌクレオソームの構造を変えることによって遺伝子発現を制御する働きをする。ヒストン尾部の脱アセチル化によってヒストンの正電荷が増加し、同様に負に帯電した DNA に対する親和性が増加する (Bradley, 2011)。このヒストンと DNA の親和性の増加によってクロマチン/ヌクレオソーム構造のコンパクションおよび、究極的には遺伝子発現の抑制が生じる (Bradley, 2011; Haberland, 2009)。HDAC がクロマチン構造の調節で演じる重要な役割に加え、HDAC は転写因子に存在するタンパク質を含むヒストン以外のタンパク質を脱アセチル化することが可能であり、その結果 HDAC が遺伝子発現の調節に関与する別の機序を提供することも研究で明らかにされている (Bradley, 2011)。HDAC にはそのイースト HDAC 相同性によって定義される 4 つの異なるクラスに分類される多数のイソフォームがある (Seto, 2014)。クラス I、II、および IV の HDAC は亜鉛依存性酵素であり、一方、クラス III の HDAC は NAD⁺依存性である。HDAC は核および細胞質内で触媒機能を果たす (Haberland, 2009)。例えば、HDAC6 (クラス IIb の HDAC) は、細胞骨格タンパク質 (例えば、 α -チュー

ブリン) および膜貫通タンパク質 (例えば、IFN α R) を脱アセチル化する主要な細胞質内デアセチラーゼであるが、クラス I の HDAC は主として核に局在している。

発生毒性に関する推測

HDAC は遺伝子発現の調節に関与し、そこで HDAC によって促進されるヒストンの脱アセチル化によって遺伝子発現の抑制が生じる (Haberland, 2009)。正常な胎芽・胎児発生のためには、遺伝子発現の慎重な調節が必要であり、不規則な遺伝子発現による HDAC 機能障害は心奇形や骨発生障害などの多くの発生異常を示す (Haberland, 2009)。バルプロ酸 (VPA) は HDAC 阻害薬であり、神経管、中軸骨格および心欠損に加え、胎芽・胎児死亡率の増加と関連する既知のヒト催奇形性物質である (Shepard, 2007)。培養されたラット胎芽およびマウスとヒトの肝細胞に VPA を投与すると、全般的遺伝子発現のパターンに変化が生じた (Li, 2016)。遺伝子発現への HDAC 阻害の幅広い影響 (VPA によって実証されたような) は多数の毒性機序を許容し、その結果、毒性機序の描写が困難である可能性がある。アポトーシス経路の攪乱、DNA メチル化の攪乱、レチノイン酸 (RA) の不均衡または Runt 関連転写因子 2 (Runx2) シグナル伝達の攪乱など、HDAC 阻害に起因するいくつかの催奇形性機序が文献で提案されている (Giavini, 2014; Paradis, 2013)。また、HDAC 阻害の観察された毒性を生じる機序は時間依存性である可能性がある (Paradis, 2013)。例えば、HDAC 阻害薬は発生時の中軸骨格欠損を引き起こすことが明らかにされているが、この毒性を介する機序がいくつか文献で提案されており、それぞれの機序は胎芽・胎児発

生の様々な段階(原腸形成、軟骨形成および骨形成)で起きる(Li, 2016; Paradis, 2013)。HDAC 阻害は、不規則な RA 媒介遺伝子転写の結果として、原腸形成時の不規則な軸パターンと関連している(Li, 2016)。軟骨内骨化は、軟骨組織が骨形成時に骨と置き換えられる軟骨形成時の鋳型を形成する(Paradis, 2013)。HDAC 機能障害は、それぞれ Sox9 シグナル伝達障害または Runx2 シグナル伝達障害のいずれかを介し、これらのプロセスの両方に悪影響を与えることが明らかにされている(Haberland, 2009; Paradis, 2013)。骨格奇形は HDAC 阻害薬を用いると認められることが多く、これらの奇形は上記の妥当な機序の結果である可能性がある。

AOP の根拠

AOP の根拠は、多数のマウス HDAC KO モデル、および *in vivo* と *in vitro* の両方の齧歯類モデルにおける用量反応試験から得られた。単一および多数の両方の HDAC アイソフォームを標的とするマウス KO モデルから、様々な HDAC のクラス/アイソフォームの役割と冗長性に関する実質的な根拠

が得られている(Haberland, 2009)。特定の HDAC を標的とする KO モデルによって、2、3 例を挙げると、原腸形成(HDAC3)、心臓/血管発生(HDAC1、HDAC2、HDAC5 および HDAC9)、および骨発生(HDAC4)に 関与することが明らかにされている(Haberland, 2009)。VPA、エンチノスタット、サーチノール、トリコスタチン A などの HDAC 阻害薬として記載されたいくつかの化合物は、動物モデルにおける骨および心臓の発生を害する能力が明らかにされている(Giavini, 2014; Paradis, 2015; Shepard, 2007)。VPA は、二分脊椎、心臓および骨の欠損を含むヒトにおける欠損を伴う既知のヒト催奇形性物質である(Ornoy, 2009)。KO 法または低分子阻害薬の使用のいずれかによる *in vivo* での HDAC の阻害は、骨発生障害、心臓発生障害および胎芽・胎児の死亡をもたらす可能性がある。以上の試験によって、HDAC が発生毒性の影響を媒介する可能性が明らかになった。この文書は、HDAC の阻害が骨格奇形を生じ得る機序を裏付ける根拠に焦点を置いている。

HDAC 阻害 AOP の概要

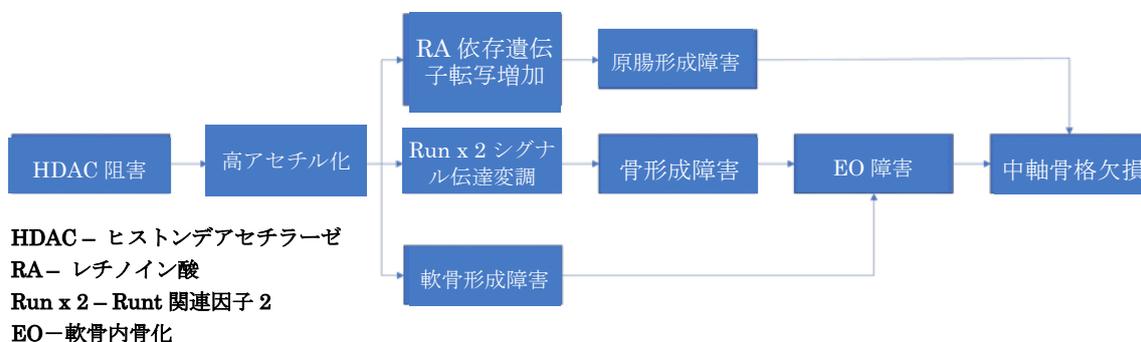


図 2 HDAC 阻害から中軸骨格欠損に至る重要な事象

HDAC 阻害 => 過剰アセチル化

HDAC は、ヒストン尾部の特定のアミノ酸からアセチル基を除去する働きをする酵素のファミリーである(Seto, 2014)。HDAC は、アセチル基の除去によって、DNA により強固に接続し遺伝子転写を減らす正電荷のヒストン尾部を生じる時、重要な後成的役割を演じる。HDAC の活性を阻害する化合物は、ヒストンからのアセチル基の除去を妨げる可能性がある。これにより、過剰アセチル化とその後のヒストン複合体の弛緩が引き起こされ、遺伝子転写因子に DNA が曝露される可能性がある。

HDAC は、Runx2 や他の転写因子などのヒストン以外のタンパク質のリジン残基を脱アセチル化し、それらの遺伝子発現プログラムを改変する(Bradley, 2011)。同様に、HDAC を阻害する化合物も、ヒストン以外のタンパク質の過剰アセチル化を生じ得る。VPA、トリコスタチン A、アピシジン、エンチノスタット、酪酸ナトリウム、ボロン酸およびサリチル酸などのいくつかの化合物は、HDAC を阻害し、過剰アセチル化を引き起こすことが知られている(Giavini, 2014)。例えば、VPA で処理されたマウス胎仔の肢は、ヒストン-4-アセチル化のレベルで測定したように過剰アセチル化が生じる(Bradley, 2011)。急速なヒストン-4 の過剰アセチル化が VPA 投与後 1 時間で認められ、6 時間検出可能であった。VPA 誘導体であるバルプロミドは、催奇形性が限られており、HDAC を阻害しないと考えられ、マウス胎仔の肢に投与した場合にヒストン-4-アセチル化の濃度の増加を生じなかった。

過剰アセチル化 => RA 依存性遺伝子転写の増加

VPA は、原腸形成の *in vitro* モデルにおける様々な RA 依存性遺伝子の転写を促進する(Li, 2016)。この試験で、RA 依存性遺伝子転写の増加は RA の濃度の増加と相関しないことが強調された。ヒストン複合体の過剰アセチル化は RA 依存性遺伝子へのアクセスの増加とその後の転写の増加をもたらすことが提案された。RA 依存性遺伝子は、Cdx1 および Hox1a などであった。*in vitro* モデルにおける RA 受容体拮抗薬を同時投与すると、VPA によって促進された Cdx-1 および Hox1a の発現の増加が消失した。用いた VPA の用量はヒトの医薬品の用量に相当した。

RA 依存性遺伝子転写の増加 => 原腸形成障害

VPA で処理された *in vitro* の胚様体モデルによって、RA 依存性遺伝子転写(例えば、Cdx1 および Hox1a) の増加、並びにパターン形成障害や軸方向伸長などの形態発生異常が実証された(Li, 2016)。これらの奇形は、RA 受容体拮抗剤の同時投与によって部分的に回復した。この所見は、VPA 処理モデルで認められた RA 依存性遺伝子転写の増加の逆転と共に認められた。著者らは、観察された原腸形成障害は少なくとも部分的には RA 依存性遺伝子転写への VPA の影響から生じたものであると結論した。同様の原腸形成障害が、胚様体モデルを HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A で処理した場合においても認められた。

VPA が誘発する RA 依存性遺伝子転写は HDAC 阻害によって起きると考えられる。マウス胚性幹細胞 HDAC1、2 および 3 は、RA 依存性遺伝子である Hox1 遺伝子の RA 応答配列のエンハンサー領域に結合するこ

とが知られている(Li, 2016; Urvalek, 2014)。上記の HDAC 阻害薬のそれぞれのノックダウンは、Hoxa1 転写の増加をもたらした(Li, 2016; Urvalek, 2014)。HDAC3 KO マウスは、原腸形成障害の結果、胎生期 9.5 日前に死亡した(Haberland, 2009)。

原腸形成障害 => 中軸骨格欠損

原腸形成障害は中軸骨格欠損をもたらす可能性がある (Li, 2016)。VPA は、原腸形成を障害し、中軸骨格欠損を引き起こすことも立証されている(Li, 2016)。

過剰アセチル化 => 軟骨形成障害

軟骨形成は骨のための軟骨テンプレート形成であり、軟骨内骨化の最初の部分である(Paradis, 2013)。いくつかの研究で、ヒストン脱アセチラーゼ (HDAC) の阻害または KO のいずれかの結果、過剰アセチル化と軟骨形成障害の関連が特定されている。この KER を裏付ける根拠は以下の通りである：

- ・ HDAC 阻害薬の VPA で処理された胎仔マウスの肢芽は、Sox9 およびその下流標的 (Sox5 および Sox6) 並びにコラーゲン 2a1 (col2a1) を含む過剰アセチル化および軟骨形成を調節する遺伝子の発現の用量依存的減少を生じた(Paradis, 2013)。これらの結果は、他の HDAC 阻害薬に関する所見と一致した。トリコスタチン A とベリノスタットは、Wnt5a により介在される効果であるウサギ関節軟骨におけるコラーゲン 2 の発現を低下させると報告されている(Paradis, 2013)。

- ・ クラス I の HDAC 阻害薬であるエンチノスタットは、軟骨形成を攪乱することが報告されている(Paradis, 2015)。また、エンチノスタットは、子宮内で処理された

マウスの胎仔に過剰アセチル化を引き起こすことも明らかになっている(Di Renzo, 2007)。

- ・ VPA で処理された培養ラットの成長軟骨板は、軟骨発生障害を示した(Wu, 2004)。

- ・ HDAC1 は、軟骨内骨化時に軟骨形成を調節する Nkx3.2 と関連することが知られている(Bradley, 2011)。したがって、HDAC1 阻害の結果としての過剰アセチル化は骨形成障害を引き起こす可能性がある。また、HDAC4 と HDAC5 は Smad シグナル伝達を調節することも知られており、その結果軟骨形成において役割を果たす可能性があると考えられている。

軟骨形成障害 => 軟骨内骨化障害

軟骨内骨化は、軟骨が最初にテンプレートを形成し、次いで軟骨形成のプロセス時に骨化することができる骨形成のプロセスである(Paradis, 2013)。そのため、軟骨形成の攪乱は軟骨内骨化の障害をもたらすことがあり得る。

軟骨内骨化 => 中軸骨格欠損

軟骨内骨化は、長骨や椎骨を含む骨格中のほとんどの骨の形成につながるプロセスである(Bradley, 2011)。軟骨内骨化の障害は中軸骨格欠損をもたらす可能性がある。ヒストン脱アセチラーゼ (HDAC) 阻害薬は、マウス並びにヒトにおいて中軸骨格欠損を引き起こすことが明らかにされている(Di Renzo, 2007; Shepard, 2007)。HDAC 阻害薬または HDAC KO モデルを用いた機構研究から導かれた根拠から、軟骨形成障害または骨形成障害のいずれかの結果としての軟骨内骨化障害がこれらの骨格欠損を引き起

こす可能性があることが示唆される (Haberland, 2009; Paradis, 2013)。例えば、以下の HDAC 阻害薬、すなわちトリコスタチン A、ホウ酸、VPA、アピシジン、エンチノスタットおよび酪酸で処理された齧歯類では高い比率で中軸骨格欠損が認められた (Di Renzo, 2007; Shepard, 2007)。

過剰アセチル化 => Runx2 シグナル伝達変調

HDAC 阻害または HDAC KO モデルのいずれかの結果としての過剰アセチル化は、Runx2 のシグナル伝達の増加もしくは減少をもたらすことがあり得る (Haberland, 2009; Paradis, 2013)。例えば：

- ・ HDAC4 KO マウスモデルは、Runx2 シグナル伝達の増加をもたらした (Haberland, 2009)。

- ・ HDAC4 および 5 によるリジンの脱アセチル化は、Runx2 活性を負に調節することが知られている (Paino, 2014)。

- ・ VPA 処理されたマウス胎仔肢芽は、Runx2 発現の用量依存的減少を示した (Paradis, 2013)。VPA は HDAC 阻害薬であり、過剰アセチル化を引き起こすことが明らかにされている。HDAC 阻害特性が無い VPA の類似物であるバルプロミドで処理されたマウス胎仔肢芽は、最も高い試験用量でも Runx2 発現の有意な減少を示さなかった。

- ・ マウス胎仔肢芽は、クラス I の HDAC 阻害薬であるエンチノスタットで処理されると、コラーゲン 10a1 (col10a1) 発現の減少を示した (Paradis, 2015)。この Col10a1 発現の変化は、Runx2 シグナル伝達の変調に起因した。

- ・ HDAC 阻害薬はさらに、間葉系肝細胞および頭蓋冠由来の初代骨芽細胞における Runx2 発現を増加させると報告されている (Paradis, 2013)。上記の試験における Runx2 の発現の差は、組織特異かつ発生段階の反応の結果であると推定されている。

Runx2 シグナル伝達変調 => 骨形成障害

骨形成は、骨の石化が起きるプロセスである (Paradis, 2013)。Runx2 は、骨の石化を促進するコラーゲン 10a1 の転写を調節する。いくつかの研究によって、HDAC 阻害薬の阻害が、軟骨の過剰石化の促進または軟骨の石化の抑制のいずれかが明らかにされている Runx2 の発現の減少または増加のいずれかに関連付けられている。 (Haberland, 2009; Paradis, 2013)。例えば：

- ・ マウス胎仔肢芽を HDAC 阻害薬である VPA で処理した試験によって、Runx2 転写および Col10a1 の減少が実証された (Paradis, 2013)。これらの所見は、骨形成の障害をもたらすと結論された。

- ・ HDAC4 KO マウスモデルは、軟骨内軟骨の異所性骨化と一体となった過剰な Runx2 シグナル伝達をもたらすことが明らかになっている (Haberland, 2009)。

- ・ マウス胎仔肢芽は、クラス I の HDAC 阻害薬であるエンチノスタットで処理されると、コラーゲン 10a1 (Col10a1) 発現の減少および骨形成の障害を示した (Paradis, 2015)。著者らは、骨形成障害は Runx2 シグナル伝達の変調の結果であると推測した。

骨形成障害 => 軟骨内骨化障害

軟骨内骨化は、軟骨が最初にテンプレートを形成し、次いで軟骨形成のプロセスにおいて、骨形成時に骨化することができる骨形成のプロセスである(Paradis, 2013)。軟骨形成の攪乱は、軟骨内骨化の障害をもたらすことがあり得る。

AOP と関連する HDAC 阻害化合物の例

HDAC 阻害薬に分類されるいくつかの化合物は、実験動物に同様な催奇形性反応を示している(Giavini, 2014)。HDAC 阻害薬と関連する催奇形性には、心欠陥、骨格奇形および神経管閉鎖障害などがある(Giavini, 2014; Shepard, 2007)。神経管欠陥は、ヒトとマウスのモデルのみで認められた (Giavini, 2014)。同様な催奇形性転帰にかかわらず、これらの化合物は、短鎖脂肪酸、ベンズアミドおよび環状テトラペプチドなどの多様な構造的特徴を示す(Giavini, 2014)。いくつかの HDAC 阻害薬の発生毒性研究の要約を以下に述べる。検証した HDAC 阻害薬のうち、1つ(ポリノスタット)を除いた全てが動物モデルにおいて催奇形性を示した。

• アピシジン

アピシジンに子宮内曝露されたマウスでは、対照より有意に高い比率で骨格異常が認められた(Di Renzo, 2007)。妊娠したマウスにアピシジン 10 mg/kg を性交後 8 日目に腹腔内注射した。認められた欠陥の種類は、いずれも融合(椎骨、肋骨および胸骨分節)およびセグメントのホメオティックな再特異化(形態変化、頸肋)であった。認められた全ての異常は中軸骨格に限定され、他の HDAC 阻害薬(例えば、VPA およびトリコスタチン A)で見られた異常と同等であった。アピシジンに曝露された胎子の妊娠中

に明らかな過剰アセチル化が認められ、著者らはこれが催奇形性を引き起こす機序であると示唆している。

• ホウ酸

子宮内においてホウ酸で処理されたラットは、水頭症および骨格異常を示した(Shepard, 2007)。マウスでは異常の増加は見られなかったが、ウサギでは心血管異常の増加が認められた。高熱症と併せてホウ酸に曝露されたラットも、椎骨や肋骨などの骨格異常の増加を示した。神経管欠陥などいくつかの主要な形成異常がヒトにおける試験で認められているが、データはヒトでの発生または生殖毒性について結論するには不十分である。

• 酪酸

酪酸に子宮内曝露されたマウスでは、対照より有意に高い比率で骨格異常が認められた(Di Renzo, 2007)。妊娠したマウスに酪酸 2000 mg/kg を性交後 8 日目に腹腔内注射した。見られた欠陥の種類は、セグメントのホメオティック再特異化(形態変化、頸肋)で、肋骨の融合は生じたが有意なレベルではなかった。認められた全ての異常は中軸骨格に限定され、他の HDAC 阻害薬(例えば、VPA およびトリコスタチン A)で見られた異常と同等であった。酪酸に曝露された胎子の妊娠中に明らかな過剰アセチル化が認められ、著者らはこれが催奇形性を引き起こす機序であると示唆している。

• エンチノスタット

エンチノスタットに子宮内曝露されたマウスでは、対照より有意に高い比率で骨格異常が認められた(Di Renzo, 2007)。妊娠したマウスにエンチノスタット 25 mg/kg 体重を性交後 8 日目に腹腔内注射した。認めら

れた欠陥の種類は、いずれも融合（椎骨、肋骨および胸骨分節）およびセグメントのホメオティックな再特異化（形態変化、頸肋）であった。認められた全ての異常は中軸骨格に限定され、他の HDAC 阻害薬（例えば、VPA およびトリコスタチン A）で見られた異常と同等であった。エンチノスタットに曝露された胎仔の妊娠中に明らかな過剰アセチル化が認められ、著者らはこれが催奇形性を引き起こす機序であると示唆している。

- トリコスタチン A

トリコスタチン A に曝露された場合、マウス胎仔において神経管および体節の尾末端で過剰アセチル化が誘発され、さらに肋骨および椎骨の融合が認められた (Shepard, 2007)。中軸骨格の重複やホメオティック再特異化など、VPA に関連する奇形と同様の奇形が認められた。著者らは、催奇形性機序はヒストン脱アセチル化の阻害であると結論した。

- VPA

妊娠時に摂取した VPA の影響に関するヒトについての試験が多数行われている (Shepard, 2007)。神経管欠損、二分脊椎、頭囲縮小、心臓欠損および四肢欠損などの奇形のかかりの発生が認められた。いくつかの試験で、VPA を他の薬剤と同時投与していない場合、欠陥のリスクが高いことが見出された。胎児性 VPA 症候群は、顔の小奇形、指の大奇形および発達遅延を特徴とする。妊娠初期の毒物に関する種間の検証から、ヒトは他の種より VPA の影響に敏感であることが示唆された。マウス、ラット、ウサギおよびサルにおける VPA の催奇形性を評価した試験は多数存在する (Shepard,

2007)。誘発される奇形には、神経管欠損、四肢欠損、骨格異常、心奇形、二分脊椎および頭蓋顔面欠陥などがある。ある試験で、VPA はマウス胎仔の尾側神経管における過剰アセチル化を誘発することが見出され、VPA によって誘発される催奇形性機序はヒストン脱アセチル化の阻害であると結論された。

追加試験で、HDAC を阻害しない VPA 類似物は催奇形性ではないことが実証された (Giavini, 2014)。

- ポリノスタット

ラットとウサギを用いた発生毒性試験において、妊娠している動物にポリノスタット（それぞれ、妊娠 6～20 日に 0、5、15 または 50 mg/kg/day、妊娠 7～20 日に 0、20、50 または 150 mg/kg/day）を毎日投与した (Wise, 2007)。母体毒性は認められず、胎仔の生存に対する影響は見られなかったが、両種とも最高用量で胎仔の体重の低下が認められた。ラットの場合、全ての用量で外面、内臓または骨格の異常の発生はなかったが、最高用量で骨格変異が生じた。これらの変異には、四肢、椎骨、胸骨分節または頭蓋骨の不完全な骨化、および脊椎骨数、頸肋および過剰肋骨の変異などがある。ウサギでは、最高用量群で骨格奇形は認められなかったが、多少の骨格変異、短い第 13 肋骨および中手骨の不完全な骨化が生じた。ポリノスタットが VPA より強い HDAC 阻害薬で同じ催奇形性転帰が認められなかったことから、著者らは VPA の発生毒性機序は HDAC 阻害によるものではないと示唆した。特に、この試験におけるポリノスタットの母体中濃度は、VPA を用いたそれ以前の試験よりはるかに高かった。

D. 考察

昨年度の毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連性、データセットに含まれる物質の数から、GnRHR と生殖毒性の間のシグナルについての AOP の作成を試み、そのデータセットに多く含まれるニトロベンゼン類を対象として調査では、結果的にグルタチオンの枯渇による酸化ストレスが引き起こす精巢毒性という初期の想定とは異なる AOP が見いだされることとなった、今年度は GnRHR による生物学的影響の蓋然性に基づき、さらなる文献調査を実施した結果、裏付けとなるエビデンスのレビューおよびこれを整理することにより、標的に関連した発生毒性の原因が存在し、有害性発現に至る妥当な機序が説明可能であると考えられたため、GnRHR 結合を介した妊娠損失の増加に関する AOP を構築することができた。しかし、不確実性として、複数の動物種から得られたエビデンスは、妊娠維持における GnRHR の重要性を裏付けているものの、hCG を介した系はヒトおよび一部の高等霊長類でしか観察されていない(Cole, 2010)こと、GnRHI および II は、hCG の胎盤発現に関与すると考えられる(Lee, 2010)が、受容体の正確な分子シグナル伝達メカニズムは完全には解明されておらず (Desaulniers, 2017)、この AOP で定義した各イベントは、特定のアイソフォームではなく、より広範な GnRH シグナル伝達系を指すこと、さらに、GnRH 類似体は下垂体 GnRHR のアゴニストまたはアンタゴニストに割り当てられることが多く(Kang, 1989)、これらの類似体が非下垂体 GnRHR に与える影響は、下垂体 GnRHR に与える影響とは異なる可能性があるなどの課題がある。

一方、HDAC 阻害 AOP については、HDAC の阻害から生じ得るいくつかの有害転帰を記述している。個々の HDAC アイソフォームの固有の機能はマウスの遺伝子 KO 試験によって解明されているが、機能の冗長性は全てのアイソフォームに存在し(Haberland, 2009)、HDAC 阻害薬が多数のアイソフォームをターゲットにする可能性があるため(Ververis, 2013)、特定の有害転帰が特定のアイソフォームの攪乱に起因する確実性は低いこと、HDAC は Sox9 転写因子などのヒストン以外のタンパク質を脱アセチル化し、これらの脱アセチル化の阻害は、観察された HDAC 阻害薬の毒性および KO モデルにおいて影響力のある役割を果たす(Bradley, 2011; Di Renzo, 2007; Murko, 2010)こと、および多数の HDAC 阻害薬は動物モデルで催奇形性であり、有害転帰の中でもとりわけ中軸骨格欠損を生じることが明らかにされているが、妊娠したラットとウサギの両方をポリノスタットで処理した場合、クラス I および II の HDAC 阻害薬は骨格変異を生じたが、奇形や催奇形性の転帰は生じなかった(Wise, 2007)ことから、VPA および他の HDAC 阻害薬の毒性はそれらの HDAC に対する影響に起因する可能性はないことも示唆されていることなどの、不確実性が残っている。

本研究では、生殖毒性を引き起こす GnRHR 結合や HDAC 阻害についての AOP が合成できる可能性があることが明らかとなった。これらの経路の開発は、Lhasa の AOP DART ネットワークにおける既存の知識(エストロゲンシグナル伝達知識と重複)を活用し、データベースにおける経路の知識を拡大する可能性がある。提示した事例

研究では、単一の AOP の観点からデータを評価することに焦点を当てた。これらの AOP ネットワークを利用して未解明の部分に新たな毒性機序に関する仮説を立て、AOP 内の各イベントを各種 (*in vitro*) 試験法等に関連付けることで検証を行いながら、新たな試験戦略を構築できる可能性も広がると考えられた。

E. 結論

昨年度に行った毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして新規の AOP を開発するという手法に基づき、特定された標的のうち、GnRHR と HDAC に関連した AOP の開発を検討した。その結果、GnRHR 結合阻害による妊娠損失と、HDAC 阻害による発生毒性の AOP を開発した。

GnRHR リガンドを用いた生殖発生毒性試験では、生殖能の低下および胚・胎児毒性の可能性が示されている。観察された主要な胚・胎児毒性は、胚吸収、死産および産仔数減少の形をとるが、催奇形性は限られた例でしか観察されていない。GnRH システムは、生殖能の鍵となる HPG 軸の一部であり、妊娠維持における GnRH の役割や妊娠に及ぼす影響について、文献では十分に説明されていないものの、本調査では、GnRH が着床および胎盤機能に関与することが明らかになった。したがって、[GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化 => 着床障害 => 妊娠損失の増加] 及び [GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化 => 胎盤の構造および機能障害 => 妊娠損失の増加] という 2 系統の AOP が開発できた。

HDAC 阻害薬に分類されるいくつかの化合物は、実験動物に催奇形性反応を示し、心

欠陥、骨格奇形および神経管閉鎖障害などがある。神経管欠損は、ヒトとマウスのモデルのみで認められた。HDAC は遺伝子発現の調節に関与し、HDAC によって促進されるヒストンの脱アセチル化によって遺伝子発現の抑制が生じる。正常な胎芽・胎児発生のためには遺伝子発現の慎重な調節が必要であり、不規則な遺伝子発現による HDAC 機能障害は心奇形や骨発生障害などの多くの発生異常を示す。文献調査の結果、阻害から中軸骨格欠損に至る 3 系統の AOP

(HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => RA 依存性遺伝子転写の増加=>原腸形成障害 => 中軸骨格欠損; HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => Runx2 シグナル伝達変調 => 骨形成障害 => 軟骨内骨化障害 => 中軸骨格欠損; HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => 軟骨形成障害 => 軟骨内骨化障害 => 中軸骨格欠損) を開発した。

本研究では、生殖毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして、特定された標的に対して、より詳細な文献調査を行えば、生殖毒性を引き起こす AOP を開発できることが明らかとなった。これらの AOP の開発は、リードアクロスに対する知識を拡大できる可能性があることに加え、これらの AOP ネットワークを利用して未解明の部分に新たな毒性機序に関する仮説を立てるなどして、AOP 内の各イベントを各種 (*in vitro*) 試験法等に関連付けることで検証を行いながら、新たな試験戦略を構築できるという可能性も広がると考えられた。

F. 参考文献

Baird DD. The gestational timing of pregnancy loss: adaptive strategy? *American Journal*

- of *Human Biology*. 2009, 21, 725-727
- Blumenfeld Z. Gonadotropin-releasing hormone antagonists instead of agonists: a change for the better? *Fertility and Sterility*. 2001, 76, 443-444.
- Bradley EW, McGee-Lawrence ME, Westendorf JJ. Hdac-mediated control of endochondral and intramembranous ossification. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2011, 21, 101-113.
- Brown JL, Sones JL, Angulo CN, Abbott K, Miller AD, Boehm U, Roberson MS. Conditional loss of ERK1 and ERK2 results in abnormal placentation and delayed parturition in the mouse. *Scientific Reports*. 2019, 9, 9641.
- Cheng KW, Nathwani PS, Leung PC. Regulation of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene expression in placental cells. *Endocrinology*. 2000, 141, 2340-2349.
- Chou CS, Beristain AG, MacCalman CD, Leung PC. Cellular localization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II in first-trimester human placenta and decidua. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004, 89, 1459-1466.
- Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2010, 24, 1-14.
- Depalo R, Jayakrishan K, Garruti G, Totaro I, Panzarino M, Giorgino F, Selvaggi LE. GnRH agonist versus GnRH antagonist in *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012, 10, 1-8.
- Desaulniers AT, Cederberg RA, Lents CA, White BR. Expression and Role of Gonadotropin-Releasing Hormone 2 and Its Receptor in Mammals. *Frontiers in Endocrinology*. 2017, 8, 269.
- Di Renzo F, Broccia ML, Giavini E, Menegola E. Relationship between embryonic histonic hyperacetylation and axial skeletal defects in mouse exposed to the three HDAC inhibitors apicidin, MS-275, and sodium butyrate. *Toxicological Sciences*. 2007, 98, 582-588.
- EMA, Cetrotide Scientific Discussion, 2004
- EMA, Orgalutran Scientific Discussion, 2004.
- FDA, Zoladex Professional Information Brochure, 1998.
- FDA, Plenaxis Pharmacology Review Part 2, 2003.
- FDA, LUPRON DEPOT® safety sheet, 2012.
- Flanagan CA, Manilall A. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding. *Frontiers in Endocrinology*. 2017, 8, 274.
- Giavini E, Menegola E. Teratogenic activity of HDAC inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20, 5438-5442.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics*. 2009, 10, 32-42.
- Hernandez ER. Embryo implantation and GnRH antagonists: embryo implantation:

- the Rubicon for GnRH antagonists. *Human Reproduction*. 2000, 15, 1211-1216.
- Kang IS, Kuehl TJ, Siler-Khodr TM. Effect of treatment with gonadotropin-releasing hormone analogues on pregnancy outcome in the baboon. *Fertility and Sterility*. 1989, 52, 846-853.
- Keay SD, Vatish M, Karteris E, Hillhouse EW, Randeve HS. The role of hCG in reproductive medicine. *BJOG*. 2004, 111, 1218-1228.
- Kol S. Embryo implantation and GnRH antagonists: GnRH antagonists in ART: lower embryo implantation? *Human Reproduction*. 2000, 15, 1881-1883.
- Lee HJ, Snegovskikh VV, Park JS, Foyouzi N, Han KT, Hodgson EJ, Guller S, Norwitz ER. Role of GnRH-GnRH receptor signaling at the maternal-fetal interface. *Fertility and Sterility*. 2010, 94, 2680-2687.
- Li AS, Marikawa Y. Adverse effect of valproic acid on an *in vitro* gastrulation model entails activation of retinoic acid signaling. *Reproductive Toxicology*. 2016, 66, 68-83.
- Lin LS, Roberts VJ, Yen SS. Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1995, 80, 580-585.
- Liu J, Maccalman CD, Wang YL, Leung PC. Promotion of human trophoblasts invasion by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) I and GnRH II via distinct signaling pathways. *Molecular Endocrinology*. 2009, 23, 1014-1021.
- Maggi R, Cariboni AM, Marelli MM, Moretti RM, Andrè V, Marzagalli M, Limonta P. GnRH and GnRH receptors in the pathophysiology of the human female reproductive system. *Human Reproduction Update*. 2016, 22, 358-381.
- Merck, Orgalutran Product Monograph, 2019.
- Murko C, Lagger S, Steiner M, Seiser C, Schoefer C, Pusch O. Expression of class I histone deacetylases during chick and mouse development. *The international Journal of Developmental Biology*. 2010, 54, 1527-1537.
- Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*. 2017, 20, 476-494.
- Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reproductive Toxicology*. 2009, 1, 1-10.
- Paino F, La Noce M, Tirino V, Naddeo P, Desiderio V, Pirozzi G, De Rosa A, Laino L, Altucci L, Papaccio G. Histone deacetylase inhibition with valproic acid downregulates osteocalcin gene expression in human dental pulp stem cells and osteoblasts: evidence for HDAC2 involvement. *Stem Cells*. 2014, 32, 279-289.
- Paradis FH, Hales BF. Exposure to valproic

- acid inhibits chondrogenesis and osteogenesis in mid-organogenesis mouse limbs. *Toxicological Sciences*. 2013, 131, 234-241.
- Paradis FH, Hales BF. The Effects of Class-Specific Histone Deacetylase Inhibitors on the Development of Limbs During Organogenesis. *Toxicological Sciences*. 2015, 148, 220-228.
- Rama S, Rao AJ. Embryo implantation and GnRH antagonists: the search for the human placental GnRH receptor. *Human Reproduction*. 2001, 16, 201-205.
- Santos MA, Kuijk EW, Macklon NS. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction*. 2010, 139, 23-34.
- Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's Human Embryology*. 2014.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014, 6, a018713.
- Shepard TH, Lemire RJ. *Catalog of Teratogenic Agents*. 2007, 12th edition.
- Siler-Khodr TM, Kuehl TJ, Vickery BH. Effects of a gonadotropin-releasing hormone antagonist on hormonal levels in the pregnant baboon and on fetal outcome. *Fertility and Sterility*. 1984, 41, 448-454.
- Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH agonists vs antagonists. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2007, 21, 57-65.
- Terashima R, Laoharatchathanin T, Kurusu S, Kawaminami M. Augmentation of gonadotropin-releasing hormone receptor expression in the post-lactational mammary tissues of rats. *The Journal of Reproduction and Development*. 2016, 62, 495-499.
- Tug N, Uslu U, Cumbul A, Eyuboglu S, Cam C, Karateke A, Yilmaz B. Effects of the gonadotropin-releasing hormone antagonist cetrorelix in the early postimplantation period on rat pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2011, 155, 166-170.
- Urvalek AM, Gudas LJ. Retinoic acid and histone deacetylases regulate epigenetic changes in embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014, 289, 19519-19530.
- Ververis K, Hiong A, Karagiannis TC, Licciardi PV. Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents. *Biologics: Targets & Therapy*. 2013, 7, 47-60.
- Wise LD, Turner KJ, Kerr JS. Assessment of developmental toxicity of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in Sprague-Dawley rats and Dutch Belted rabbits. *Birth Defects Research Part B: Developmental and reproductive toxicology*. 2007, 80, 57-68.
- Wu S, Legido A, De Luca F. Effects of valproic acid on longitudinal bone growth. *Journal of Child Neurology*. 2004, 19, 26-30.
- Zeneca, *Professional Information Brochure*. 1998.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Igarashi T, Suzuki H, Ushida K, Matsumoto M, Inoue K, Kanno T, Miwa Y, Ishii T, Nagase T, Katsumata Y, Hirose A. Initial hazard assessment of 1,4-dichlorobutane: Genotoxicity tests, 28-day repeated-dose toxicity test, and reproductive/developmental toxicity screening test in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2020 Apr; 112:104610. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104610. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32032664.
- 2) Kawashima A, Inoue K, Yoshizaki Y, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Takano M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Yamada T, Hirose A. Combined repeated-dose and reproductive/developmental oral toxicity of 3-methylpentane, isooctane, and isononane in rats. *Fundamental Toxicological Sciences*. 2020, 7, 259-279.
- 3) Shigeta Y, Iso T, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VI). *Bull. Natl Inst. Health Sci*. 2020, **138**, 33-39.

2. 学会発表

- 1) Development of initial environmental risk assessment methods for pharmaceuticals by using Eco-QSAR system. Hirose A, Kobayashi N, Kurimoto M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Yamada T. SETAC Europe 30th Annual Meeting (May 2020, Online)
- 2) OECD における Wnt/beta-catenin シグナルがん悪性化に関連する Adverse Outcome Pathway (AOP)の開発, 田邊 思

- 帆里, 青柳 一彦, Sabina QUADER, Horacio CABRAL, 小野 竜一, 広瀬 明彦, 横崎 宏, 佐々木 博己, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 3) 化学物質の生殖発生毒性の新しいデータベースの開発とその特徴解析, 三浦 稔, 栗本 雅之, 川村 智子, 牛田 和夫, 井上 薫, 山田 隆志, 栗形 麻樹子, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
 - 4) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用ー構造類似物質候補の収集・選択法の確立, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
 - 5) 一般化学物質のスクリーニング評価におけるリードアクロスの適用ーノナンー1ーオール(C₉H₂₀O)の人健康影響評価, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 吉崎 芳郎, 松本 真理子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
 - 6) 食品用器具・容器包装のポジティブリストに記載されているナノ物質も含む無機化学物の遺伝毒性評価, 磯 貴子, 松本 真理子, 鈴木 洋, 杉山 圭一, 本間 正充, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
 - 7) 短期的緊急時における人の健康を守るための水道水中汚染物質濃度の提案, 松本 真理子, 重田善之, 川村 智子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦, 日本毒性学会 (2020 年 6 月 Web 開催)

- 8) Derivation of Subacute Guidance Values of Inorganic Metal Contaminants Controlled by the Drinking Water Quality Standards in Japan. Matsumoto M, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Iso T, Hirose A. 2021 SOT Annual Meeting and ToxExpo (March. 2021, Online)

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

令和2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 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、標的部位への到達量や反応性代謝物の生成量等に依存するため、量-反応評価での体内動態の考慮が重要である。本年度は、エチル *tert*-ブチルエーテル (ETBE) を検討物質として、昨年度に作成したモデルパラメータ・データベース (DB) のデータを基に回帰式を得て、ETBE のモデルパラメータの値とそれらの不確かさを推定した。これらの推定値を用いて ETBE のヒト血中濃度を Monte Carlo-PBPK モデルで 95%信頼区間とともに推定し、測定値と比較するとともに、推定された内部曝露指標 (C_{max} 、AUC) の感度と不確実性を解析した。測定値は全て推定血中濃度の信頼区間内に入ったが、2 倍程度過大推定であった。一方、曝露後の血中半減期は、測定値とほぼ同レベルであった。また、感度と不確実性の分析結果から、推定値を用いて PBPK モデルで計算された内部曝露指標の信頼性は C_{max} で高、AUC で中程度と判定された。以上の結果から、*in silico* 推定法は、生理学的薬物動力学 (PBPK) モデルパラメータ補充に利用可能と示唆された。また、OECD で整備中のガイダンスのケーススタディで検討された 10 物質のラット血中濃度を PBPK モデルで計算の結果、ケーススタディでの報告値と良い一致が見られ、*in vitro* 試験の最低影響濃度から *in vitro-in vivo* 外挿した各物質の経口用量も、ほぼ再現できた。Monte Carlo 法による定量的な信頼性評価は、*in vitro-in vivo* 外挿 (IVIVE) における PBPK モデルによる”reverse dosimetry”導入の妥当性の判定を容易にすると考えられた。

A. 研究目的

有害性情報がない化学物質の健康リスク評価の実施が大きな課題となっている。また、動物福祉の観点から動物毒性試験削減

の流れも着実に進んでいる。

定量的構造活性相関 (QSAR) やカテゴリーアプローチが、動物試験を行わずに、短期間で多物質について推定できる代替法とし

て有害性評価での活用が検討されている。

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量 (NOEL) 等の有害性指標を推定する際には体内動態を考慮することが重要である。

本研究は、その体内動態を PBPK モデルで推定し、得られる標的組織中濃度およびその最大値 (C_{max}) や濃度時間曲線下面積 (AUC) 等の内部曝露指標 (internal dose metrics) をカテゴリーアプローチで考慮することで、より適切な量-反応評価を可能にすることを目指す。

本年度は、PBPK モデルに必要なパラメータ (血液/空気および組織/血液の間の分配係数、代謝に関する V_{max} と K_m) の *in silico* 推定値を用いてヒトでの化学物質の動態を推定し、既報の情報と比較して、*in silico* パラメータ推定法の有用性を評価した。

検討対象物質には、含酸素ガソリン添加剤である ETBE を選定し、昨年度に作成した PBPK モデルパラメータ DB から ETBE と同一カテゴリーの物質を抽出するなどして、ヒトに対するパラメータ値と物性値や構造情報との回帰式を得た。これらの相関式で推定された ETBE の分配係数と代謝パラメータの値を用い PBPK モデルによりヒトでの血中濃度-時間プロファイルを推定し、測定値と比較した。さらに、モデルで推定された内部曝露指標 (C_{max} 、AUC) の感度と不確実性を解析した。

また、OECD で整備中のガイダンスのケーススタディに採用された *in silico* 体内動態推定モデルに関する検討も行った。

B. 研究方法

B.1. ETBE のモデルパラメータ値の推定

ETBE と同様に、分子間相互作用として van der Waals 力と双極子-双極子相互作用が主に寄与する脂肪族系の含酸素物質を PBPK モデルパラメータ DB から抽出した。その中でヒトの分配係数値が DB にある物質に対して、血液/空気 (P_{ba})、肝臓/血液 (P_{lb})、脂肪/血液 (P_{fb})、高血流組織/血液 (P_{rb})、低血流組織 (P_{sb}) の各分配係数の対数値とヘンリー則定数 (Henry) またはオクタノール/水分配係数 ($\log D, pH7.4$) の間の線型回帰式を得た。そして、ETBE の Henry と $\log D$ の値を線型回帰式に代入し、ETBE の各分配係数の値をそれらの 95%信頼区間とともに推定した。

ヒトの代謝パラメータ (V_{max} と K_m) もモデルパラメータ DB から同様に抽出したが、値が利用可能な物質が少なかったため、脂肪族と芳香族の炭化水素、ハロゲン化炭化水素およびエーテル結合を有する物質をまとめて、それらの V_{max} 、 K_m と分子構造フラグメントの数の間の重回帰分析で分子構造フラグメントの寄与率を求めた。

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

ここで、 M は V_{max} または K_m 、 C_i と f_i は、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、フッ素、塩素、臭素およびエーテル基とした。ETBE の各分子構造フラグメント出現数を重回帰式に代入し、ETBE の V_{max} と K_m の値とそれらの 95%信頼区間を推定した。

B.2. PBPK モデルによる体内動態の推定

ETBE のヒトでの体内動態推定のため、肺、肝臓、脂肪、高血流組織、低血流組織、消化管、動脈血および静脈血の各コンパートメントから成る Ramsey & Andersen 型の PBPK モデル (図 1) を作成した (モデルの予測能は、Marchand et al. (2015)でのトルエンと *m*-キシレンのヒト吸入曝露試験と Clewell et al. (2001)での *iso*-プロパノールのヒト投与試験の結果で確認)。さらに、モデルパラメータ推定値の不確かさも含めて定量的に解析するために、Monte Carlo 法でシミュレーションを行った。シミュレーションでは、Nihlén, et al. (1998)によるヒト曝露試験での測定血中濃度と比較するために、5、25、50 ppm の ETBE を 2 時間、軽い運動 (50 W) 中に曝露し、その後 4 時間運動しない状態での血中 ETBE 濃度を推定した。Monte Carlo シミュレーションでは、分配係数と代謝パラメータの全ての値の確率密度関数を対数正規分布、計算の繰り返しを 1000 回とし、濃度-時間プロファイルの中央値と 95 パーセント信頼限界値を得た。そして、Nihlén らの測定値と比較し、推定結果の妥当性を評価した。

さらに、肝臓、腎臓、副腎、卵巣/精巣、脂肪、高血流組織、低血流組織および血液の 8 コンパートメントから成るラット経口曝露用 PBPK モデル (図 2) を作成し、Acetaminophen、Bisphenol A、17 α -Ethinyl-estradiol 等 10 物質のラット血中最大濃度を計算し、OECD でのケーススタディ (Fabian et al, 2019)で使用された *in silico* 体内動態推定モデルによる計算結果と比較した。その際、モデルパラメータ、吸収速度定数等はケーススタディと同じ手法で推定した。

B.3. 感度および不確実性の解析

量-反応評価で使用される内部曝露指標の C_{max} や AUC に及ぼす各分配係数と代謝パラメータの感度と不確実性の影響を、WHO (2010)の文書に従って判定するために、感度比と不確実性の指標を計算した。感度比の絶対値が 0.5 以上の場合、感度は高い、0.2~0.5 の場合は中程度、0.2 未満の場合は低いと判定した。また、不確実性の指標が 2 より大きい場合、不確実性が高い、0.3 から 2 の間の場合は中程度、0.3 以下の場合は低いと判定した。さらに、感度と不確実性の両判定結果から、PBPK モデルにより推定された C_{max} や AUC の信頼性を評価した。

(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. ETBE のモデルパラメータ値の推定

ETBE と同じ分子間相互作用カテゴリーの 28 物質のヒトの P_{ba} の対数値と Henry の対数値の間の直線回帰式の補正済み決定係数は 0.88 であった (図 3)。一方、ヒトの P_{lb} 、 P_{fb} 、 P_{rb} 、 P_{sb} の各分配係数の対数値と $\log D$ 、pH7.4 の間の直線回帰式の補正済み決定係数はそれぞれ 0.65、0.82、0.60 および 0.64 であった。ETBE の Henry (166 Pa-m³/mol) と $\log D$ (1.479)の値はいずれも、各線型回帰式の適用範囲内の値であった。これらの値から推定された P_{ba} 、 P_{lb} 、 P_{fb} 、 P_{rb} 、 P_{sb} 値はそれぞれ、16、1.4、18、1.4 および 1.5 であり、Nihlén et al. (1999)によるヒトでの測定値や推定値の 0.6~1.5 倍の値であった。

一方、 V_{max} および K_m と構造フラグメント数の間の重回帰式の補正済み決定係数はそれ

ぞれ、0.80 と 0.60 であった。重回帰分析で得られた構造フラグメントの寄与率と ETBE での構造フラグメントの出現数から、 V_{\max} と K_m はそれぞれ、29.6 $\mu\text{mol/hr/kg}$ および 10.7 μM と推定された。これらの値はラット PBPK モデル (Borghoff et al., 2016) で使用された V_{\max} (499 $\mu\text{mol/hr/kg}$) および K_m (1248 μM) に比べるとかなり小さい値であった。

C.2. PBPK モデルによる体内動態の推定

ETBE の血中濃度推定値の 95%信頼区間は、曝露期間中では推定中央値の 1/2~2 倍程度であったが、曝露終了 240 分後では 95%信頼区間は中央値の 1/5~5 倍程度であった。Nihlén et al. (1998) の測定値はいずれの曝露濃度でも、95%信頼区間内にあったが、血中濃度は全体的に 2 倍程度過大推定の傾向にあった。また、曝露後の推定血中濃度は 2 相性で消失し、算出された半減期は、Nihlén et al. (1998) が報告している第 2 相と第 3 相の半減期の値とほぼ同じレベルであった。

OECD のケーススタディで報告された 10 物質のラット血中濃度を作成した PBPK モデルで計算し、比較した結果、ケーススタディの値と良く一致した。さらに、モデルで推定された投与量と血中濃度の関係を基に内分泌かく乱関連の *in vitro* の試験の最低影響濃度から外挿した各物質の *in vivo* の経口用量も、ケーススタディの値とほぼ一致した。

C.3. 感度および不確実性の解析

50 ppm の ETBE 吸入曝露に対して推定された C_{\max} と AUC の分配係数と代謝パラメータによる不確実性とこれらのパラメータに対する感度の分析した結果、 P_{ba} の C_{\max} へ

の感度は高かったが、他の分配係数と代謝パラメータへの C_{\max} の感度は低いと判定された。また、全ての分配係数と代謝パラメータによる C_{\max} の不確実性も低いと判定された。一方、AUC の感度は、 P_{ba} に対して高く、 V_{\max} に対して中程度、他の分配係数と K_m に対しては低いと判定された。また、AUC に対する不確実性は P_{ba} 、 V_{\max} 、 K_m では中程度で、他のパラメータでは低いと判定された。以上の感度および不確実性の分析結果から、*in silico* 法で推定されたパラメータ値を用いて PBPK モデルで計算された ETBE の C_{\max} の信頼性は高、AUC の信頼性は中程度と判定された。

D. 考察

In silico 法で推定された分配係数と代謝パラメータを用いて計算された ETBE のヒト血中濃度-時間プロファイルと曝露後の血中濃度の半減期は、測定値と大きく異ならず、*in silico* 推定法が、PBPK モデルパラメータの補完に利用できる可能性を示した。

パラメータ推定値が濃度-時間プロファイルや内部曝露指標に及ぼす感度と不確実性を定量的に評価することで、より精緻化が必要なパラメータの有無や種類を明確にすることができる。今回の ETBE では、濃度と AUC は P_{ba} に対して高感度と判定された。このような場合には可能であれば、他の推定法も併用する等して、値の妥当性を重み付けることが有効と思われる。今回推定した P_{ba} 値は、Nihlén et al. (1999) の測定値に比べて 1.3 倍高く、測定値よりも高い血中濃度を推定した要因の 1 つと考えられる。

V_{\max} と K_m の推定値の不確かさは、分配係数に比べて 1 桁大きかったが、濃度-時間

プロフィール等には不確実性はそのまま伝播されることはなく、累積の内部曝露指標である AUC で、 V_{max} と K_m の不確かさが若干累積され、不確かさは中程度と判定された。このような不確かさと感度の状況は、分配係数の場合と同様に、物質ごとに異なると考えられるので、*in silico* 法による補完時には、不確かさと感度を定量的解析し、PBPK モデルを使用する目的に合った信頼性を有することを確認することが重要であろう。また、 V_{max} と K_m の推定に、構造フラグメントを用いた Free-Wilson 法を適用できる可能性があると思われる結果を得たが、*in vivo* の V_{max} と K_m は既報値が少なく、今後も大幅な増加は期待できないため、これらのパラメータ値の補完には、*in vitro* 試験等の別のアプローチがより有効と思われる。

PBPK モデルは、吸入曝露濃度や経口摂取量からヒトや実験動物での内部曝露指標を推定する”forward dosimetry”だけでなく、*in vitro* 試験濃度を *in vivo* 投与等価量に変換する”reverse dosimetry”にも適用可能なことを示唆している。これにより、PBPK モデルは今後ますます一般化学物質の有害性情報の補完においても重要な位置を占めると考えられる。

E. 結論

体内動態予測システムの基盤整備では、PBPK モデルが”forward dosimetry”および”reverse dosimetry”に有用であることを示した。これらの推定には、PBPK モデルのパラメータの欠損値を適切かつに迅速に推定できるか否かが重要となる。QSAR やカテゴリーアプローチは有望な *in silico* 推定法ではあるが、推定に伴う不確かさが PBPK モデル

計算の結果まで伝播される懸念もある。しかし、PBPK モデルによる体内動態の推定に Monte Carlo シミュレーションを組み込むことにより、*in silico*-PBPK 法による体内動態推定の信頼性評価が可能であることが示唆された。このような定量的な信頼性評価は、IVIVE における PBPK モデルによる”reverse dosimetry”導入の妥当性の判定を容易にすると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 環境化学物質の生理学的薬物動力学 (PBPK) モデリングで使用されるパラメータの構造特異的な特性の評価, 吉田 喜久雄, 明関 由里子, 松本 さおり, 石田 誠一, 山田 隆志, 第47回日本毒性学会学術大会 (2020年6月 Online)

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

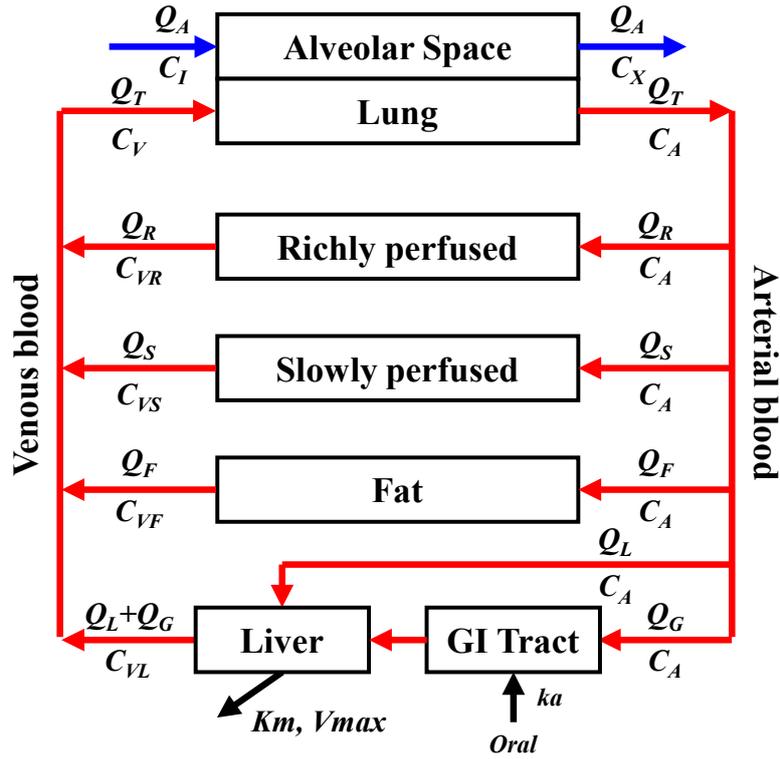


図1 ETBEの検討に使用した Ramsey & Andersen 型の PBPK モデルの構造

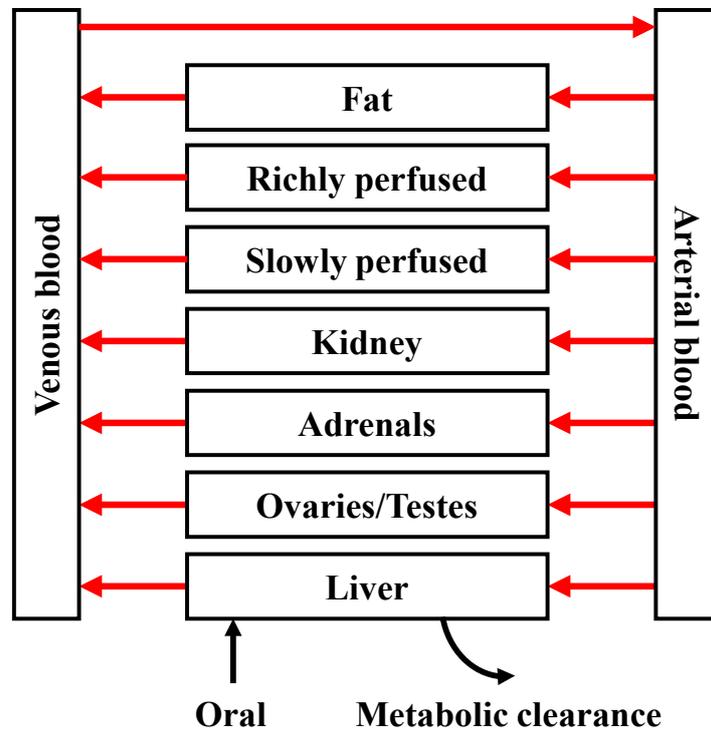


図2 OECD のケーススタディ検討用の PBPK モデルの構造

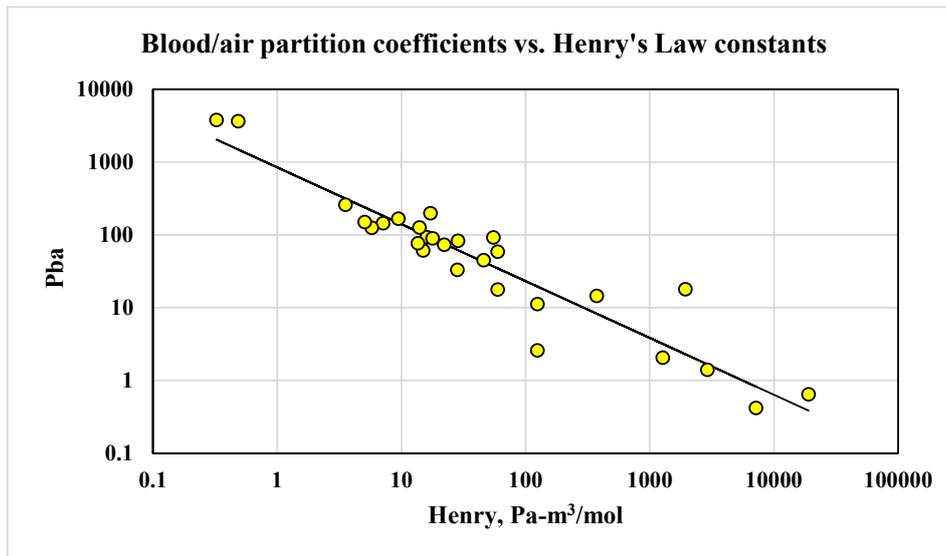


図3 血液/空気分配係数とヘンリー則定数の相関

表1 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

Chemical	Dose, mg/kg	C_{max} , μM		
		Measured <i>in vivo</i>	Calculated	
			Fabian et al.	This study
Acetaminophen	5	6.6 ± 1.9	6.8	6.7
	200	309 ± 169	272	267
Bisphenol A	10	0.2	7	6.8
	100	10	70	68
Caffeine	1	1.7 ± 0.8	3.9	3.8
17 α Ethynylestradiol	1	0.0034	0.0078	0.0077
Genistein	154	0.7 ± 0.1	40	41
	308	1.1 ± 0.2	80	82
	40	9.6 ± 0.024	10	10.6
Ketoconazole	10	6.2 ± 3.6	2.6	2.5
	10	2.9 ± 1.7	2.6	2.5

別添5

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
Honma M	An assessment of mutagenicity of chemical substances by (quantitative) structure-activity relationship.	Genes Environ.	42:23	doi: 10.1186/s41021-020-00163-1. PMID: 32626544.	2020
Van Bossuyt M, Raitano G, Honma M, Van Hoeck E, Vanhaecke T, Rogiers V, Mertens B, Benfenati E.	New QSAR models to predict chromosome damaging potential based on the in vivo micronucleus test.	Toxicol Lett.	329	80-84	2020
Honma M, Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama K, I.	Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship.	Genes Environ.	42:32	doi: 10.1186/s41021-020-00171-1.	2020
Shigeta Y, Iso T, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M.	Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VI).	Bull. Natl Inst. Health Sci.	138	33-39	2020
Kawashima A, Inoue K, Yoshizaki Y, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Takano M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Yamada T, Hirose A.	Combined repeated-dose and reproductive/developmental oral toxicity of 3-methylpentane, isooctane, and isononane in rats.	Fundam. Toxicol. Sci.	7	259-279	2020

Yamazoe Y, Yamada T, Nagata K.	Prediction and Characterization of CYP3A4-mediated metabolisms of azole fungicides: an application of the fused-grid template system.	Food Saf (Tokyo).	8	34-51	2020
Rovida C, Barton-Maclaren T, Benfenati E, Caloni F, Chandrasekera PC, Chesné C, Cronin MTD, De Knecht J, Dietrich DR, Escher SE, Fitzpatrick S, Flannery B, Herzler M, Hougaard Bennekou S, Hubsch B, Kamp H, Kisitu J, Kleinstreuer N, Kovarich S, Leist M, Maertens A, Nugent K, Pallocca G, Pastor M, Patlewicz G, Pavan M, Presgrave O, Smirnova L, Schwarz M, Yamada T, Hartung T.	Internationalization of read-across as a validated new approach method (NAM) for regulatory toxicology.	ALTEX	37	579-606	2020
山田隆志	IATAの実践および毒性データベースとin silicoツールの利用から学んだ知見.	フロンティア	2(3)	133-139	2020
Rovida C, Escher SE, Herzler M, Hougaard Bennekou S, Kamp H, Kroese DE, Maslankiewicz L, Monné MJ, Patlewicz G, Sipek N, van Aerts L, White A, Yamada T, van de Water B.	NAM-supported read-across: From case studies to regulatory guidance in safety assessment.	ALTEX	38	140-150	2021
Yamazoe Y, Yamada T, Hirose A, Murayama N.	Deciphering key interactions of ligands with CYP3A4-Template system.	Food Saf (Tokyo).	9	10-21	2021
Yamada T, Kurimoto M, Hirose A, Yang C, Rathman J.	Development of a new threshold of toxicological concern database of non-cancer toxicity endpoints for industrial chemicals.	Front. Toxicol.	3	1-9	2021

Igarashi T, Suzuki H, Ushida K, Matsumoto M, Inoue K, Kanno T, Miwa Y, Ishii T, Nagase T, Katsumata Y, Hirose A.	Initial hazard assessment of 1,4-dichlorobutane: Genotoxicity tests, 28-day repeated-dose toxicity test, and reproductive/developmental toxicity screening test in rats.	Regul Toxicol Pharmacol.	112:1046-1050	doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104610.	2020
Shigeta Y, Iso T, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M.	Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VI).	Bull. Natl Inst. Health Sci.	138	33-39	2020

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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 第四室 室長
(氏名・フリガナ) 山田 隆志・ヤマダ タカシ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職名 所長
氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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・主任研究官
(氏名・フリガナ) 古濱 彩子・フルハマ アヤコ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職 名 所長
氏 名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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) 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 部長
(氏名・フリガナ) 杉山 圭一 (スギヤマ ケイチ)

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 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3年 3 月 29 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職名 所長
氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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) 副所長
(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3年3月29日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所
所属研究機関長 職名 所長
氏名 合田 幸広 印

次の職員の令和2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) 安全性生物試験研究センター・客員研究員
(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 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。