

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

In silico 予測手法の高度化と New Approach
Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト
健康リスク評価系の基盤構築に関する研究
(21KD2005)

令和3年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 隆志

令和4年(2024年)5月

目 次

I. 総括研究報告	
<i>In silico</i> 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の 統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究	
山田 隆志.....	1
II. 研究分担報告	
1. 遺伝毒性評価に資する Ames/QSAR の深化	
杉山 圭一、古濱 彩子.....	14
2. 代謝予測に基づく反復投与毒性リードアクロスモデルの高度化に関する研究	
山田 隆志.....	24
3. AOP に基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究	
広瀬 明彦.....	42
4. <i>In vitro</i> - <i>in vivo</i> 外挿 (IVIVE) 用の生理学的動力学 (PBK) モデル構築のための 基盤整備に関する研究	
松本 真理子.....	55
5. 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と化学物質のリスク評価への 活用に関する研究	
安部 賀央里.....	65
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	73

令和3年度 厚生労働行政推進調査事業費 補助金（化学物質リスク研究事業）
（21KD2005）総括研究報告書

In silico 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の
統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

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、Ames 変異原性を対象とした QSAR の高度化と、*in vivo* 毒性を対象とした New Approach Methodology (NAM) の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤整備を行う。

Ames データベースの精緻化については、安衛法試験結果のデータベース精密化を完了させるとともに、Ames 陽性の懸念が高いが既存データベースでは陰性の報告に偏っている芳香族 N-ニトロソ 6 化合物の実試験を完了させ、結果の整理および考察を進めている。

代謝予測に基づく反復投与毒性リードアクロスモデルの高度化については、ジクロロニトロベンゼン異性体を対象に、種々の代謝予測モデルと類似物質の既存の代謝データを活用することにより、予測の不確実性を減少させ、代謝の類似性に基づく毒性発現を予測する方法の妥当性を検証した。

生殖発生毒性予測系構築では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害の有害性発現経路 (AOP) を用いてケーススタディを行い、リスク予測における AOP に基づくアプローチの有用性と課題を検証した。アッセイ結果を経路に関連付けることができるデータモデルで AOP の枠組みを拡張し、更なるデータ及び知識をレビューし、AOP を安全性評価の改善に使用できる3つのシナリオを検証した。

In vitro-in vivo 外挿 (IVIVE) 用の生理学的動力学 (PBK) モデル構築のための基盤整備では、R 言語で構築した各 PBK モデルで、既報と同様に血中濃度や NOAEL を推定する事が出来た。モデルパラメータについては、情報源により値にバラツキがある事が確認された。各種情報源より入手したパラメータを用いて IVIVE を試行した結果 8 物質中 4 物質について期待値の 1/10~10 倍の範囲の値が得られ、大きな感度を有するパラメータの特定が出来た。

機械学習による皮膚感作性の予測モデル構築については、既存の文献情報から *in vitro* 実験結果を予測する高性能なモデルが得られた。また、化学物質の構造情報のみからヒトでの皮膚感作性の有無を判別する高性能なモデルも構築した。

上記 5 つの分担研究は、着実に結果を積み重ねていずれも初年度の計画を達成できる見込みであり、本研究は順調に推移している。

研究分担者

杉山 圭一

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
変異遺伝部 部長

古濱 彩子

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
変異遺伝部 主任研究官

本間 正充

国立医薬品食品衛生研究所
副所長

広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
安全性予測評価部 部長

松本 真理子

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
安全性予測評価部 主任研究官

安部 賀央里

名古屋市立大学 大学院薬学研究科
レギュラトリーサイエンス分野 講師

A. 研究目的

現在、数多くの化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、それら化学物質のリスク管理は世界的な課題となっている。化学物質の規制に関わる国際機関や諸外国の規制当局は、リスク評価の迅速化・効率化のために、*in silico* 予測手法の利用促進を図っているが、ヒト健康リスク評価における利用は限定的である。定量的構造活性相関（QSAR）は、ICH M7ガイドラインに基づいた医薬品不純物の遺伝毒性評価において利用されるようになったが、化学物質の規制上での使用を拡大させるためには、高品質のデータセットの使用、モデルの予測精度の更なる向上、予測結果の信頼性を評価する方法等、本アプローチの高度化が求められている。

また、動物福祉は国際的に大きな流れとなっており、段階的な動物試験の削減は不可避の情勢となっている。New Approach Methodology (NAM) は、有害性評価の文脈において、*toxicokinetics* や *toxicodynamics* を包含する動物を用いない *in silico*, *in vitro* 等のアプローチを意味し、

それらを統合して利用することにより、ヒト健康リスク評価の信頼性を向上させると期待されている。諸外国の規制当局は、新しい動物試験要求を最小限に抑え、NAMの活用を促進するビジョンやロードマップを近年相次いで公表している。一方で、NAMデータを活用した有害性評価の行政的受け入れは未だ限られており、ケーススタディによって、その信頼性や規制上のニーズを満たすことに貢献できるかを概念実証することが求められる。さらに、その受け入れを促進するために、NAMの知識をリスク評価の関係者が共有することが必要である。

そこで本研究では、Ames変異原性を対象としたQSARの高度化と、*in vivo* 毒性を対象としたNAMの活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤整備を行う。Ames変異原性については、安衛法試験結果を新規データセットとして世界中のQSARベンダー等に提供することにより、QSARモデルの改良を目指す第一回国際共同研究プロジェクトを先導し、予測精度の向上に貢献を果たした。本研究では、新規デー

タの追加と、専門家による既存試験データの再評価を実施することにより高信頼性のデータセットを開発する（令和3年度）と共に、国内外の専門家から知見を得てQSAR予測の向上に資する改良を推進し、情報共有する（令和4、5年度）。Ames QSARの結果を行政における判断基準として積極的に活用する統合的な遺伝毒性評価系開発の基盤を構築する。

反復投与毒性、生殖発生毒性については、リードアクロスの適用範囲の拡大を目指して、大規模毒性データベースの構築、カテゴリーの構築、有害性発現経路（AOP）の開発を行ってきた。そこで本研究では、機序に基づくリードアクロスの信頼性の向上へ向けて、NAMデータを活用した統合的アプローチの優位性を検証する。反復投与毒性では、化学物質の既知の代謝情報を収集し、種々の代謝予測モデルと類似物質の既知代謝情報を組み合わせて代謝予測の不確実性を減少させ、代謝カテゴリーの精緻化を図る（令和3年度）。継続してその適用範囲拡大を図るとともに、ヒト外挿性向上を考慮したヒト代謝予測モデルの化学物質に対するパフォーマンスを評価する（令和4、5年度）。生殖発生毒性では、毒性エンドポイントに関連するキーイベントに基づいたAOPを、リードアクロスに適用する際のケーススタディを検証する（令和3年度）。さらなる毒性データ収集と新規AOPを開発して、その利点や課題を抽出してAOPの適用拡大を目指すための基礎的な知見を得る（令和4、5年度）。

化学物質の体内動態シミュレーションに利用する生理学的動力学（PBK）モデルに必要なパラメータの既報値は限られており、適用範囲拡大のためには、*in vitro*試験データ/*in silico*推計データの利用が有効と考えられる。諸外国において*in vitro-in vivo*外挿（IVIVE）が活発に行われるようになってきたことを考慮し、モデルパラメータの*in silico*推定手法等の調査を行い、その精度評価を試みる（令和3年度）とともに、ケース

スタディによる有害性評価、ヒト健康リスク評価への適用の可能性を検討する（令和4、5年度）。

機械学習などの人工知能（AI）アプローチは、リスク評価の様々なステップで、急速に増加する多様で関連性のあるデータの有効活用をサポートする大きな可能性を有している。皮膚感作性を対象に、機械学習を活用して予測モデルを構築し、予測精度や適用範囲、結果の説明性等を評価する（令和3年度）。さらに、将来の他毒性エンドポイントへの適用を視野に入れ、皮膚感作性のケーススタディを行い規制安全性評価への受け入れへ向けた課題整理を行う（令和4、5年度）。

B. 研究方法

B.1. 遺伝毒性評価に資するAmes/QSARの深化（杉山・古濱・本間）

QSARによるAmes予測精度向上に必須となる高信頼性のデータセットを開発するため、i) 試験結果の再評価とii) Ames変異原性試験を実施した。i) 再評価対象は12140物質の安衛法試験結果である。精査に用いる結果報告書が入手可能なのは10694物質であった。令和3年3月末現在、A判定（Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg以上の強い陽性と判定される物質）およびB判定（Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質）は全て評価を終えており、C判定（Ames試験における陰性判定物質）の評価途中であった。今年度は、再評価未実施のC判定の2980物質に対し精査を行った。

ii) 芳香族N-ニトロソ化合物に注目し、6物質のAmes試験の計画を立てた。

更に、実施中の第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトについては、参加チームから結果の精査と共有を行った。

B.2. 代謝予測に基づく反復投与毒性リードアクロ

スモデルの高度化に関する研究 (山田)

代謝予測ツールとして、OECD IATA Case Studies Projectの複数の事例研究で使用実績があるLhasa社のMeteor (v.3.1.0)を使用した。さらに、医薬品の創薬・安全性研究においてしばしば使用されているとされるGLORYxを選定した。いずれのツールもPhase IIの代謝予測も可能である。対象物質として、二つのジクロロニトロベンゼン異性体を選んだ。既存の代謝情報や予測ツールによる既知の代謝物構造の再現など複数のエビデンスを用いて、毒性発現につながる代謝物の予測の信頼性を評価した。類似物質の構造と毒性情報をNIHS統合DBの反復毒性試験結果から収集し、代謝と毒性機序の類似性に基づきグループ化を行い、その反復投与毒性と毒性レベルをリードアクロスにより予測した。

動物試験結果のヒト外挿性向上とNAMデータ利用の留意点を代謝の観点から検討するため、ヒトCYPを対象に、代謝予測モデルの利用可能性を調査した。

B.3. AOP に基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究 (広瀬)

先行研究で開発した発達毒性に関連するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害のAOPを用いて、以下の事例研究を実施し、生殖発生毒性エンドポイント評価に対するAOPがどのように適用できるかを検証した。

Case 1 : 特定の化合物の評価に妥当なデータのレビュー

Case 2 : 機序に関する仮説を裏付ける試験系の優先順位付け

Case 3 : 新規物質などを含む類似化合物のレビューデータの活用

B.4. In vitro-in vivo外挿 (IVIVE) 用の生理学的動力学 (PBK) モデル構築のための基盤整備 (松本)

発生毒性や内分泌かく乱影響を対象としたIVIVEを検討している既存研究を調査し、PBKモデルの詳細等が記載され、外挿の過程が再現可能な研究論文を選択し、使用されている各PBKモデルの構造を解析し、R言語でモデルをコード化し、それらの予測再現性を確認した。また、投与量-血中濃度関係の確立に必要なパラメータの推定に使用された手法についても解析した。

さらに、解析したPBKモデルによる計算に必須のパラメータである血漿蛋白非結合率 (f_{up})、Caco-2 細胞膜透過速度 (P_{app}) および代謝クリアランス (CL_{int}) に関して、フリーでアクセス可能なオンライン推定ツールや検索ツールを検討し、得られる値を論文既報値等と比較することにより、それらの有用性の確認を行った。

調査したオンラインデータベースおよび推定ツールから得たパラメータ値を用いて、8物質の15 *in vitro* アッセイの結果をIVIVEに供した。

B.5. 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と化学物質のリスク評価への活用に関する研究 (安部)

皮膚感作性の*in silico*予測モデルの精緻化として、*in vitro*実験の予測モデル構築に着手した。AOPにおいて、分子開始イベントMIE (タンパク質との共有結合) を評価するDPRA (OECD TG442C) とKey Event2 (角化細胞における炎症性応答) を評価するKeratinoSensTM (OECD TG442D) に着目し、DPRAからKeratinoSensTMを予測する*in silico*モデルを構築した。既存の文献情報からKeratinoSensTMの陽性、陰性物質を抽出し、説明変数をDPRAの実験値とMOEを用いて算出した化学物質の構造情報である分子記述子とした。勾配ブースティング決定木系のアルゴリズムを使用して機械学習による予測モデルを構築した。

また、ヒトの皮膚感作性評価を*in silico*で予測する機械学習モデルを構築した。既存の文献情

報からヒトの皮膚感作性の有無に関するデータを抽出し、MOEを用いて化学物質の分子記述子を算出し、説明変数として使用した。勾配ブースティング決定木系のアルゴリズムにより予測モデルを構築した。

C. 研究結果

C.1. 遺伝毒性評価に資するAmes/QSARの深化 (杉山・古濱・本間)

i) 複数名の遺伝毒性専門家による精査を実施した結果、未評価であったC判定2980のうち17物質について陽性B判定の専門家判定を下した。なお、15物質の報告書については、一部欠落などで評価不能であり、C判定のままとした。

最終的な専門家判断では、A判定649、B判定1150、C判定10335、合計12134（評価不能6）の分類となった。評価前のA判定672、B判定1085、C判定10383、合計12140からは、A判定26物質、B判定18物質、C判定66物質に対し、評価の変更が行われた。

ii) ① 3-nitrosomethylaminopyridine; ② 4-nitrosomethylaminopyridine; ③ *n*-nitroso-*n*-ethylaniline; ④ benzenamine, *n*-nitroso-*n*-phenyl-; ⑤ *n*-nitrosodibenzylamine; ⑥ *N*-methyl-*N*-phenylnitrous amideの6物質の芳香族*N*-ニトロ化合物に対しAmes試験の実施計画をたてた。これら6物質のうち、ハンセンデータベースでは、⑥以外の5物質が陰性の報告であった。一方で、統計ベースQSARであるCaseUltraのGT1_BMUTモデルにおける陽性の可能性の高さは98%以上であり、①、②、④、⑤は既知の陽性、③、④は既知の陰性の予測結果となった。知識ベースQSARであるDerek Nexusでは6物質のうち④以外の5物質が陽性（PLAUSIBLE）の予測結果であった。既存データの結果とQSAR評価が一致しておらず試験による検証がAmes予測精度の向上に資する物質群であった。令和3年度Ames試験の実施を終え、6剤のうち5剤で陽性の結果であった。Hansenデー

タベースに記載された根拠となる原著論文の精査等、結果の解析を進めおり、令和4年度以降考察を進めていく。

更に、第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトについて、参加全19チームの同意を得て2021年7月に予測精度の統計値データ等の結果を参加チームメンバーに限定して共有した。第2回プロジェクトの結果では、モデルの特異度（陰性物質を陰性と判定できる能力）は比較的高いが、感度（陽性物質を陽性と判定できる能力）が低い傾向であった。学習データの陰性・陽性バランスや化学物質の構造を含めた精査の必要性等の問題点が整理された。なお、第2回プロジェクトでの参加チームは2チーム増え、11か国21チームの構成となった。2021年10月以降は第2回プロジェクトの参加者の追加を締めきり、21チームの予測結果を用いた議論を深め、指標の概要などを学会や学術論文で公開することとした。

C.2. 代謝予測に基づく反復投与毒性リードアクロ スモデルの高度化に関する研究 (山田)

代謝物予測に基づく毒性予測では、1,3-dichloro-2-nitrobenzeneと1,3-dichloro-5-nitrobenzeneを対象に、化審法スクリーニング評価を想定して、リードアクロスにより反復投与毒性の主要な毒性影響と毒性レベルを予測した。ニトロ基のアミノ基への還元のプロセスで生成されるN-水酸化体による生体高分子への作用およびGSHとの抱合反応によるGSH枯渇が溶血および肝毒性発現に関わると考えられた。そこで、評価対象物質の類似物質における実測の代謝物（GSH抱合体およびジクロロアニリン）を予測モデルが正しく予測できるかを検証した。このクラスの物質の代謝については、Meteorが正しい予測を適切な根拠情報とともに提示した。そこで、評価対象物質の代謝をMeteorで予測し、その類似性に基づき、毒性データの信頼性、毒性を過小に予測しないことなども考慮して適切な類似物質を選

定した後、対象物質の最も感受性が高いと考えられた毒性エンドポイント（溶血影響）と LOAEL をリードアクロスにより予測し、不確実性係数を除して、化審法スクリーニング評価の有害性クラス分類を行った。

ヒトの主要薬物代謝酵素である CYP3A4 を対象に、2D モデル（SMARTCyp、ADMET Predictor、GLORY）を適用した。44 基質について 3 番目までの代謝物構造または代謝部位の予測精度を検証したところ、いずれのモデルも比較的高い予測精度が得られたが、反応機序により予測精度は異なっており、特に N-脱アルキル化反応は高い予測性を示した。一方、環の水酸化反応は、反応を受ける部位の予測性が高くなかった。

C.3. AOP に基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究（広瀬）

AOP の事例検証を行う為に、まず HDAC 経路に関連し得る試験法を Derek Nexus および文献情報を用いて、AOP に関連する 6 つの試験法と 1 つの Derek アラートを特定し、各試験法を適切なキーイベント（KE）に関連付け、各試験法における関連物質の生物活性データを整理した。Case 1 では、催奇形物質として知られているバルプロ酸を例として取り上げ、HDAC 阻害に始まる各 KE に関連する試験法でも陽性結果を得ることができ、結果として当該 AOP を経由した発生毒性を示すことを確認できた。Case 2 では、TG422 試験が陽性であり且つ、HDAC 阻害 DB に含まれる 2-エチル酪酸を例として検証が行われたが、HDAC 阻害活性のデータが限定的であり、仮説の裏付けに必要な試験経験を選別することが可能となった。Case 3 では、いくつかの類似構造に HDAC 阻害活性があるが発生毒性データの無いスタチン類似構造化合物についての検討が行われ、そのうちの 2 つの化合物におけるゼブラフィッシュ陽性結果から HDAC 阻害による潜在的な発生毒性物質群の推定が可能となった。

C.4. In vitro-in vivo 外挿（IVIVE）用の生理学的動力学（PBK）モデル構築のための基盤整備（松本）

調査した 6 論文では、phenol 類、tebuconazole 等の抗菌剤、17 β -estradiol や bisphenol A 等のエストロゲン受容体（ER）アゴニスト、acetaminophen 等の医薬品を対象に、胚性幹細胞分化、ヒト乳がん培養細胞増殖、ヒト骨肉腫細胞 CALUX、酵母エストロゲンスクリーニング、酵母アンドロゲンスクリーニング、米国 high-throughput screening programs での 16 の *in vitro* アッセイ等の結果が IVIVE の検討対象であった。使用された PBK モデルの対象臓器コンパートメントは様々であったが、R 言語で構築した各モデルは、論文に記載された血中濃度推定結果を適切に再現した。また、Quantitative Structure-Property Relationships 等の *in silico* のモデルパラメータ推定法は、主に組織/血液間の分配係数に適用され、 f_{up} 、 P_{app} 、 CL_{int} への適用は限定的で、これらは主に *in vitro* 法で推定されていた。

次に、既存研究で検討された 35 物質を対象に、 f_{up} 、 P_{app} 、 CL_{int} を、解析した研究で使用された手法およびオンライン推定ツールや検索ツールで整備した結果、 f_{up} と P_{app} では手法間で推定値に大きな差はなかった。 CL_{int} については、既存の手法等が少なく、推定値間の比較はできなかった。PBK モデルに必須のパラメータと IVIVE に必要なパラメータ（ f_{up} 、 P_{app} 、 CL_{int} 等）について、フリーでアクセス可能なオンラインデータベースと推定ツールについて、既報文献値と比較した結果、 f_{up} と CL_{int} の値はかなりバラつく一方、 P_{app} 値にはあまりバラツキがなかった。

さらに、R 言語で構築した PBK モデルと、調査したオンラインデータベースおよび推定ツールから得たパラメータ値を用いて、8 物質の 15 *in vitro* アッセイの結果を IVIVE に供した。その結果 8 物質中の 4 物質の *in vitro* アッセイからの予測影響

量の中央値は、*in vivo* 試験のLELの中央値の1/10～10倍の範囲内に入った。また、予測影響量は、 f_{up} と $f_{up, in vitro}$ に大きな感度を有した。これらの結果から、現状でIVIVEの試行を行うことは可能と判断した。

C.5. 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と化学物質のリスク評価への活用に関する研究 (安部)

これまでに我々が開発した皮膚感作性の強度指標 (LLNA EC3 値) の予測モデルを基に、Defined Approachのガイドライン (No.497) において検討された化学物質の試験情報を使用してモデルの改良を行った。試験情報等が得られた171物質を訓練データと検証データに分割し、構築した回帰モデル (XGBoostとCatBoostを使用) において、検証データ30物質を用いて評価したところ、決定係数 R^2 値が0.8程度となり高性能なモデルが得られた。

In vitro 実験値の予測モデル化においてHoffmann (2018)らの文献から抽出・精査した122物質を訓練用データセットとし、Urbisch (2015)らの文献から抽出・精査した103物質を検証用データセットとした。MOEを用いて算出した分子記述子440種と、分子量、LogP、DPRAの実験値2種 (システインペプチド減少率とリジンペプチド減少率) の計444種を説明変数とした。KeratinoSens™の陽性、陰性を判別する機械学習モデルを構築したところ、検証用データセットにおいて、感度0.881、特異度0.629、ROC-AUC 0.8が得られ、高い予測性能を示した。モデルはPython3.8.5のXGBoostClassifierを使用した。

ヒトの皮膚感作性予測モデルにおいて、Golden(2020)らの文献から抽出・精査した437物質を訓練用データセットとし、Hoffmann(2018)らの文献から抽出・精査した29物質を検証用データセットとした。MOEを用いて算出した分子記述子53種を説明変数とし、ヒト

の感作性の有無を目的変数とした。検証用データセットにおいて、感度0.840、特異度0.670、ROC-AUCが0.907であり、高い予測性能を示した。モデルはPython3.8.5のCatBoostClassifierを使用した。

D. 考察

D.1. 遺伝毒性評価に資するAmes/QSARの深化 (杉山・古濱・本間)

i) 第1回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトで評価対象とした12140物質に対し可能な範囲で、安衛法試験結果を見直し精査を完了させた。結果取違の様な単純なミスも含むが、110物質 (約1%) は専門家判断による結果変更があった。今後は、どの様な構造・物性の特徴がある物質で専門家判断による変更が行われたのか考察を進めることで、優先的に専門家判断を必要とする物質の方向付けが可能となる。

ii) データベースの精緻化が望まれる物質として、陽性の懸念は高いが陰性の報告がされている物質やAmes/QSAR予測が難しい警告構造(Alert構造)が挙げられる。これらの物質に対し、Ames試験を行い、データをアップデートすることはAmes/QSARの改善に直接寄与する。本年度は前者の典型である芳香族N-ニトロソ化合物に注目して、試験を実施した。令和4年度以降も、芳香族を中心としたN-ニトロソ化合物を含む試験を実施し、比較検討することで、QSARの構築に必要な精緻なアラート構造および予測の基盤となる変異原性メカニズムの解明を目指す。

第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトについて、令和3年度は低感度な要因を一般的に整理していった。令和4年度には、チームが特定されない形で成果を発表し、議論を深める準備を完了させ、成果を学会発表および原著論文文化することを目標とする。

D.2. 代謝予測に基づく反復投与毒性リードアク

ロスモデルの高度化に関する研究 (山田)

毒性発現につながる代謝予測の不確実性を減少させる方法を検討した。多くの代謝予測ツールは、推定代謝物構造を数多く提示し、その取捨選択はユーザーに委ねられる。代謝予測の専門家判断を支援するエビデンスとして、類似物質の実測代謝を正しく予測できるか、すなわちローカルな予測精度を別途確認することが、代謝と毒性発現の予測を総合的に判断する上で有効であることが示唆された。

これらは、現在 OECD の QSAR Assessment Framework プロジェクトで検討されている予測結果の妥当性評価の方法の一部を取り入れたものである。複数のツールの利用と他の物質への展開を図って試行事例を積み重ねて、代謝の類似性に基づくカテゴリーアプローチにより反復投与毒性を予測できる範囲を拡大させることが期待される。本アプローチの効率化のためには、実測の代謝情報を集約する必要がある。今年度は、約1000の化学物質について、点在する既報の代謝物構造情報の収集と一元化を進めている。

CYP代謝予測モデルは、*in vitro*試験で検出が難しい代謝物を含めて予測される代謝物の構造情報を提示することから、毒性予測に有用である。CYP3A4の代謝はラットとヒト間の種差が比較的小さいと考えられており、ヒトCYP3A4代謝予測の結果は、動物試験の結果のヒトへの外挿に対し有益な情報を提供できると期待される。予測精度の評価を継続し、代謝予測の不確実性を低減する方法を充実させる必要がある。

D.3. AOP に基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究 (広瀬)

今回、検証した事例研究では、単一の HDAC 阻害 AOP を用いて各種試験法のデータを評価することに焦点を当てた。AOP ネットワークにおける各試験法の結果を利用することで、評価者が更なる仮説を立て、追加の試験戦略実施でき

るようになることや、更なる試験法の結果と解釈を関連付けることにより、複数の試験法からなら総合的な試験戦略の開発に役立つことも明らかとなった。

D.4. In vitro-in vivo外挿 (IVIVE) 用の生理学的動力学 (PBK) モデル構築のための基盤整備 (松本)

米国での IVIVE 研究は、high-throughput screening programsデータの活用を前提としたシンプルなモデルによる迅速な評価が基本であるのに対して、欧州の研究ではベンチマーク用量モデルによる濃度(量)－反応評価を含む丁寧な検討が行われており、現時点ではより参考になると思われる。外挿の対象とする*in vivo*毒性エンドポイント、それに関連する*in vitro*試験の選定については、参考となる先行研究があることや、*in vivo*及び*in vitro*の試験情報の多さの観点から、子宮肥大とそれに関わるエストロゲン作用の*in vitro*試験が適当であると考えられた。来年度はこれらの条件を満たす物質の選定を行う予定である。

D.5. 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と化学物質のリスク評価への活用に関する研究 (安部)

*In vitro*実験値の予測モデル化において、既存の文献情報から作成したKeratinoSens™の機械学習モデルは高い予測性能を示した。*In vitro*実験は動物を使用しない代替法として有用だが、*in silico*と比較するとコスト、時間がかかるため、高性能な予測モデルは皮膚感作性の評価において実験値が無い場合の穴埋めや、*in vitro*実験が必要かどうかのスクリーニングにも使用できる。また予測モデルの変数重要度の結果から、KeratinoSens™の予測にはDPRAのシステインペプチド減少率が大きく関連していることがわかった。これらの情報はAOPの検証やさらなる理解にも有益だと考えられる。

ヒトの皮膚感作性予測モデルにおいて、化学物質の構造情報のみから、感作性の有無を精度良く判別する機械学習モデルが構築できた。動物実験代替法において、最終的な目標はヒトでの有害事象の予測であるため、有益な結果となった。今後、変数重要度の検討や*in vitro*実験値を加えたモデルの構築が必要だと考えている。

E. 結論

Amesデータベースの精緻化については、安衛法試験結果のデータベース精密化を完了させるとともに、Ames陽性の懸念が高いが既存データベースでは陰性の報告に偏っている芳香族N-ニトロソ6化合物の実試験を完了させ、結果の整理および考察を進めている。

代謝予測に基づく反復投与毒性リードアクロモデルの高度化については、種々の代謝予測モデルと類似物質の既存の代謝データを活用することにより、予測の不確実性を減少させ、代謝の類似性に基づく毒性発現を予測する方法の妥当性を検証した。

生殖発生毒性予測系構築では、HDAC阻害から催奇形性へ至るAOPを用いてケーススタディを行い、具体例を基にリスク予測におけるAOPに基づくアプローチの有用性と課題を検証した。アッセイ結果を経路に関連付けることができるデータモデルでAOPの枠組みを拡張し、更なるデータおよび知識をレビューすることにより、AOPを安全性評価の改善に使用できる3つのシナリオを検証した。

IVIVE用のPBKモデル構築のための基盤整備では、発生毒性や内分泌かく乱影響を対象としたIVIVE手法を用いた米国および欧州の先行研究を調査し、そのうち6論文のPBKモデルについてR言語による予測モデルの再現を行うことができた。

機械学習による皮膚感作性の予測モデル構築については、既存の文献情報から*in vitro*実験結果

を予測する高性能なモデルが得られた。また、化学物質の構造情報のみからヒトでの皮膚感作性の有無を判別する高性能なモデルも構築した。

以上のことから本研究は順調に推移している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama K, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure–activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™. *Genes and Environ.* **43**, 16, 2021.
2. P.I. Petkov, H. Ivanova, M. Honma, T. Yamada, T. Morita, A. Furuhashi, S. Kotov, E. Kaloyanova, G. Dimitrova, O. Mekenyan, Differences between *in vitro* and *in vivo* genotoxicity due to metabolism: The role of kinetics. *Computat. Toxicol.* **22**, 100222, 2022.
3. Yamazoe Y, Yamada T, Hirose A, Murayama N. Deciphering Key Interactions of Ligands with CYP3A4-Template* system. *Food Safety (Tokyo)* **9**(1), 10-21, 2021.
4. 山田 隆志 : Cefic LRI/ILSI Europe Joint Workshop での Carcinogen Dose Response Database for Threshold of Toxicological Concern (TTC) の概要ならびに TTC に関する近年の国際動向. *イルシー 2022*, in press.
5. Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, Hirose A, Yamada T. A physiologically based kinetic modeling of ethyl tert-butyl ether in humans—An illustrative application of quantitative structure-property relationship and Monte Carlo simulation. *J. Toxicol. Sci.* **47**, 77-87, 2022.

6. Lee BM, Lee SH, Yamada T, Park S, Wang Y, Kim KB, Kwon S. Read-across approaches: Current applications and regulatory acceptance in Korea, Japan, and China. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* **85**(5), 184-197, 2022.
7. Yamada T, Kawamura T, Maruyama T, Kurimoto M, Yamamoto H, Katsutani N, Hirose A. Quantitative structure-activity relationship and a category approach to support algal toxicity assessment of human pharmaceuticals. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**, 195-204, 2021.
8. Yamada T, Miura M, Kawamura T, Ushida K, Inoue K, Kuwagata M, Katsutani N, Hirose A. Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J. Toxicol. Sci.* **46**, 531-538, 2021.
9. Tanabe S, Hirose A, Yamada T. Adverse Outcome Pathway on histone deacetylase inhibition leading to testicular atrophy. *OECD Series on Adverse Outcome Pathways No. 17*.
10. Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Girard P, Halamoda-Kenzaoui B, Hinton D, Hirose A, Hoeveler A, Honma M, Hugas M, Ishida S, Kass GE, Kojima H, Krefting I, Liachenko S, Liu Y, Masters S, Marx U, McCarthy T, Mercer T, Patri A, Pelaez C, Pirmohamed M, Platz S, Ribeiro AJ, Rodricks JV, Rusyn I, Salek RM, Schoonjans R, Silva P, Svendsen CN, Sumner S, Sung K, Tagle D, Tong L, Tong W, Eijnden-van-Raaij JVD, Vary N, Wang T, Waterton J, Wang M, Wen H, Wishart D, Yuan Y, Slikker W Jr. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **247**(1), 1-75, 2022.
11. Matsumoto M, Takano M, Takabe M, Yamaguchi N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Hirose A. Initial hazard assessment of ethyl(dimethyl)(tetradecyl)ammonium ethyl sulfate: Genotoxicity tests and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **122**, 104914, 2021.
12. Matsumoto M, Fujii S, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Inoue K, Hirose A. Repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening of polyoxymethylene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**(4), 103-116, 2021.
13. Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VII). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* **139**, 71-78, 2021.
14. Iso T, Natsume M, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse. *Fundam. Toxicol. Sci.* **9**(2), 31-36, 2022.
15. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a threshold of toxicological concern concept for skin sensitization by *in vitro/in silico* approaches. *Journal of Japanese Cosmetic Science Society.* **45**(4), 331-335, 2021.
16. Ambe K, Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M. Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **125**, 105019, 2021.

17. Ambe K, Ohya K, Takada W, Suzuki M, Tohkin M. *In Silico* Approach to Predict Severe Cutaneous Adverse Reactions Using the Japanese Adverse Drug Event Report Database. *Clin. Transl. Sci.* **4**(2), 756-763, 2021.
2. 学会発表
1. 古濱 彩子, 杉山 圭一, 本間 正充 : 毒性予測活用への取り組み : 第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト. CBI 学会 2021 年大会 (2021.10.27, Online)
 2. Furuhama A. Bigdata Analysis: Outcome of the 2nd AMES/QSAR International Challenge Project . 11th Annual Global Summit on Regulatory Science (GSR21) (2021.10.5, Online)
 3. 古濱 彩子, 杉山 圭一, 本間 正充 : Ames/QSAR の必要性・具体例と国内外のインシリコ研究. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7, 神戸-Online Hybrid)
 4. 山田 隆志 : Computational Toxicology の有効利用の実際と将来展望. 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11, 沖縄-Online Hybrid)
 5. 山田 隆志 : New Approach Method (NAM) の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の構築へ向けた事例研究の開発. 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11, 沖縄-Online Hybrid)
 6. Yamada T. Development and Improvement of *in silico* approaches for accelerating regulatory chemical risk assessment. The 9th congress of AsiaToxIV (2021.10.21, Hangzhou, China-Online Hybrid)
 7. Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Ohata H, Matsumoto M, Katsutani N, Hirose A. Development of mechanism-based hematotoxicity categories for read-across assessment using an integrated toxicity database of chemical substances. 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2021.8.27, Online)
 8. 山田 隆志, 栗本 雅之, 広瀬 明彦, Chihae Yang, James F Rathman : 化学物質の非発がんエンドポイントの TTC アプローチのための新しいデータベースの開発. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸 -Online Hybrid)
 9. 川村 智子, 山田 隆志, 辻井 伸治, 大畑 秀雄, 勝谷 成男, 広瀬 明彦 : リードアクロス評価のためのメカニズムに基づく血液毒性カテゴリーの開発と精緻化ー統合毒性データベースを利用した事例ー. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸 -Online Hybrid)
 10. 川島 明, 井上 薫, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦 : ラットを用いた 3-メチルペンタン、イソオクタン、イソノナンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸 -Online Hybrid)
 11. Yamada T. Improvement of QSAR and Read-across for Chemical Risk Assessment and Efforts toward Regulatory Acceptance in Japan. 2021 Korean Society of Toxicology (KSOT)/ Korean Environmental Mutagen Society (KEMS) Toxicology Workshop & Spring International Symposium (2021.5.31, Online).
 12. Ohno A, Watanabe M, Hirose A : Application to toxicity evaluation of ilicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method. The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021

- (2021.12.16- 21, Online)
13. 広瀬 明彦：ニトロソアミン曝露許容値設定の考え方. ICH M7/QSAR ワークショップ 日本環境変異原ゲノム学会 第 50 回記念大会 (2021.10.29, Online)
 14. 広瀬 明彦：BMD 法の基礎、活用の歴史について. 哺乳動物試験研究会 (JEMS・MMS 研究会) 第 79 回定例会 (2021.10.11, Online)
 15. Ohno A, Okiyama Y, Hirose A, Fukuhara K : Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes. 262nd ACS National Meeting & Exposition (2021.8.22- 26, Online)
 16. 広瀬 明彦：行政利用を目的とした定量的有害性評価手法の開発. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
 17. 田邊 思帆里, Sabina QUADER, 小野 竜一, Horacio CABRAL, 青柳 一彦, 広瀬 明彦, Ed PERKINS, 横崎 宏, 佐々木 博己：慢性的活性酸素種からヒト治療耐性胃がんへ至る有害性発現経路の開発及び分子ネットワーク解析. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
 18. Ohno A, Watanabe M, Hirose A : ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
 19. 井上 薫, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 川島 明, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦：リスク評価の優先順位付けのための発がん性定量評価における各種毒性指標の適用について. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
 20. Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Shigeta Y, Iso T, Hirose A : Hazard assessment of disinfection by-products, bromo chloroacetic acid and bromo dichloroacetic acid, in drinking water. EUROTOX 2021(2021.9.27- 10.1, Online)
 21. 井上 薫, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 川島 明, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦：リスク評価の優先順位付けのための発がん性定量評価における各種毒性指標の適用について. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
 22. 磯 貴子, 村田 康允, 重田 善之, 広瀬 望, 堀端 克良, 増村 健一, 杉山 圭一, 松本 真理子, 広瀬 明彦：食品用器具・容器包装のポジティブリスト収載物質「4, 4'-オキシビス(ベンゼンスルホノヒドラジド)」の遺伝毒性評価. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
 23. 村田 康允, 重田 善之, 磯 貴子, 広瀬 望, 松本 真理子, 広瀬 明彦：水道水要検討項目「ブロモジクロロ酢酸」の有害性評価. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
 24. 伊藤潤, 安部 賀央里, 足利太可雄, 頭金正博：ヒト皮膚感作性データを用いた機械学習による in silico 予測モデルの開発. 日本薬学会第 142 年会 (2022 年 3 月 Online)
 25. 家田 維哉, 安部 賀央里, 頭金 正博：医薬品副作用自発報告データベースを用いたアンサンブル機械学習モデルによる薬剤性急性腎障害の予測. 第 42 回日本臨床薬理学会学術総会 (2021 年 12 月 仙台-Online Hybrid)
 26. 土井 更良, 安部 賀央里, 頭金 正博：機械学習による薬物性肝障害の予測～大規模副作用報告データベースの活用～. 第 42 回日本臨床薬理学会学術総会 (2021 年 12 月 仙台-Online Hybrid)
 27. 安部 賀央里：機械学習法による特異体質性副作用の予測. シンポジウム 臨床薬理学と人工知能、第 42 回日本臨床薬理学会学術

- 総会 (2021年12月 仙台-Online Hybrid)
28. 秋田 彩佑, 魏 捷, 安部 賀央里, 頭金 正博: 既存の臨床試験データを用いた直接経口抗凝固薬の有効性と安全性に関する民族差の検討 Young Investigator Award 第31回日本医療薬学会年会 (2021年11月 Online)
 29. 東野 竜空, 中森 瑞季, 安部 賀央里, 頭金 正博, 佐々木 崇光, 吉成 浩一: 機械学習によるラット薬物代謝酵素および胆汁酸トランスポーターの阻害活性予測モデルの開発. 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021年11月 Online)
 30. 安部 賀央里: 化学物質の安全性評価における *in silico* 予測モデル. フォーカストセッション FS-07 創薬における WET 研究者と計算毒性学とのコラボレーション、および最新の安全性評価研究と Ames/QSAR 国際チャレンジプログラム. CBI 学会 2021 年大会 (2021年10月 Online)
 31. Saki Katayama, Sarara Doi, Takayuki Tachiki, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin, Toshimasa Jindo: Development of *in silico* prediction method for idiosyncratic drug-induced liver injury. CBI 学会 2021 年大会 (2021年10月 Online)
 32. 安部 賀央里: 毒性データベースを用いた化学物質のインシリコ毒性予測. シンポジウム S5: 計算機科学が拓く薬学の未来、第65回日本薬学会関東支部大会 (2021年9月 Online)
 33. 片山 早紀, 土井 更良, 立木 孝幸, 安部 賀央里, 頭金 正博: *in vitro* 試験情報を利用した薬物性肝障害の *in silico* 予測手法の開発. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021年7月 神戸-Online Hybrid)
 34. 中森 瑞季, 東野 竜空, 安部 賀央里, 頭金 正博, 佐々木 崇光, 吉成 浩一: 機械学習を用いた薬物代謝酵素阻害活性の *in silico* 予測手法の開発. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021年7月 神戸-Online Hybrid)
 35. 吉井 優花, 秋田 彩佑, 安部 賀央里, 頭金 正博: 臨床試験データを用いた疾患修飾性抗リウマチ薬とメトトレキサート併用時の有効性と安全性に関する研究. 医療薬学フォーラム 2021 (2021年7月 Online)
 36. 家田 維哉, 安部 賀央里, 頭金 正博: 医薬品副作用自発報告データベースを用いた機械学習による薬剤性急性腎障害の予測手法の開発. 医療薬学フォーラム 2021 (2021年7月 Online)
 37. 佐々木 裕, 三輪 誠, 安部 賀央里, 頭金 正博: 組み込み・除外判定を機械読解により実現した系統的レビュー. 第248回自然言語処理研究会・第226回コンピュータビジョンとイメージメディア合同研究発表会(2021年5月 Online)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

*In silico*予測手法の高度化とNew Approach Methodologyの活用に基づく化学物質の
統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

令和3年度 分担研究報告書

遺伝毒性評価に資する Ames/QSAR の深化

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
研究分担者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所	副所長	
研究協力者	笠松 俊夫	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部	研究員

研究要旨

行政での活用が進んでいる *in silico* 遺伝毒性評価手法のひとつである定量的構造活性相関（QSAR）を用いた Ames 変異原性予測（Ames/QSAR）の高精度化を目的として、国際共同研究の実施と Ames 変異原性データの精緻化を進めた。令和 3 年度は、2020 年に始動した第 2 回国際共同研究プロジェクト（Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト）の参加チームから得られた結果の概要を解析し、予測結果の傾向（低感度、高特異度）の考察を行った。更に、第 2 回同プロジェクトで学習データとして提供している労働安全衛生法安衛法に基づき実施された Ames 試験結果は、平成 31 年度に報告書が入手可能となった。平成 31 年度以降、継続して実施している Ames 試験結果の専門家判断を完了させ、QSAR に用いるためのデータベースにおける判定の精査を終えた。加えて、QSAR の構築に利用されている既存データベースの更新を図るため、Ames 試験を実施した。

A. 研究目的

本研究課題では、Ames 変異原性を対象とした定量的構造活性相関（QSAR）の高度化を行い遺伝毒性評価に資する *in silico* 予測手法の深化を目指す。Ames 変異原性については、これまで安衛法試験結果を新規データセットとして世界中の QSAR ベンダー等に提供することにより、QSAR モデルの改良を目指す第 1 回および第 2 回国際共同研究プロジェクト（Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト）を先導してきた。特に、完了した第 1 回同プロジ

ェクトの成果は予測精度の向上に貢献を果たしてきた。令和 3 年度は、第 2 回同プロジェクトの取りまとめを進めるとともに、新規データの追加と、専門家による既存試験データの再評価を実施することにより高信頼性のデータセットを完成させる。新規データの追加の一環として、QSAR 予測の向上に資する改良に必要な Ames 変異原性試験の収集の方針の決定と実試験実施を進めることとする。

B. 研究方法

QSAR による Ames 予測精度向上に必須となる高信頼性のデータセットを開発するため、B1.試験結果の再評価と B2.Ames 変異原性試験を実施し、B3.第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト（以下、第 2 回プロジェクトと記載）の概要の口頭発表を通して、プロジェクトを展開させた。

B1. 試験結果の再評価

再評価対象は 12140 物質の安衛法試験結果である。安衛法試験結果の詳細等については、厚生労働行政推進調査事業費（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）」における平成 31 年度および令和 2 年度分担研究報告書「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」に記載されている。

精査に用いる結果報告書のうち、令和 2 年度末現在で入手可能なのは 10694 物質であった。また、平成 31 年度で、A 判定（Ames 試験における比活性値が 1,000 rev/mg 以上であり、強い陽性と判定される物質）および B 判定（Ames 試験における比活性値が 1,000 rev/mg 未満である陽性判定される物質）は全て評価を終えており、平成 31 年度以降は C 判定（Ames 試験における陰性判定される物質）の評価途中であった。令和 3 年度は、再評価が実施されていない C 判定の 2980 物質に対する精査を進めた。

B2. Ames 変異原性試験

本課題内で実施可能な Ames 試験数は限られていることから、変異原性・遺伝毒性の懸念が高い物質であり、医薬品不純

物の懸念からも注目されている N-ニトロソ化合物を研究対象とし、ローカル QSAR の構築や知識ベース QSAR の基盤となるアラート構造の精緻化に資する知見を得ることとした。令和 3 年度は特に、芳香環が直接 N-ニトロソと結合した芳香族 N-ニトロソ化合物に注目し、6 物質の Ames 試験を計画した。また、今回対象とした物質は、既存の QSAR モデルの構築に広く使用されている Hansen らの報告（Hansen データベース, K. Hansen, et al, *J. Chem. Inf. Model.*, **49** 2077-2081, 2009）にも Ames 変異原性情報（陽性・陰性）が存在した。

Ames（細菌を用いる復帰突然変異）試験は全て外部委託により「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知）に適合する試験施設において、準 GLP で実施した。OECD 試験ガイドライン TG471 に準拠し、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を判定する試験を行った。

B3. 第 2 回プロジェクト

2020 年に始動し、現在進行中の第 2 回プロジェクトについて、参加チームから得られた結果の精査と共有を行い、国内外での学会発表を通じて構築したネットワークを基に、行政にかかわりのある所属に対し参加の窓口を開いた。

（倫理面への配慮）本研究課題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

C1. 試験結果の再評価

複数名の遺伝毒性専門家による Ames 試験結果の精査を実施したところ、令和 2 年度末の評価で C 判定であった 2980 のうち 17 物質について陽性 B 判定の専門家判定を下した。なお、15 物質の報告書については、一部欠落などで評価不能であり、C 判定のままとした。

最終的な専門家判断では、A 判定 649、B 判定 1150、C 判定 10335、合計 12134 (評価不能 6) の分類となった。評価前の A 判定 672、B 判定 1085、C 判定 10383、合計 12140 からは、A 判定 26 物質、B 判定 18 物質、C 判定 66 物質に対し、評価の変更が行われた。評価の変更理由については、表 1 に示した。

第 2 回プロジェクトの参加チームへの提供時および、今回取りまとめを終えた精査の最終結果を表 2 に示す。第 2 回プロジェクト始動以降、B 判定の物質が 50 物質増、C 判定の物質が 50 物質減となった。試験報告書が存在する 10679 物質のデータのうち 110 物質において判定の変更が行われ、全体として 1.03% の物質の判定が精査により変更となった。

C2. Ames 変異原性試験

表 3 に示した 6 物質の芳香族 N-ニトロソ化合物を Ames 試験の実施対象とした。n-nitrosodibenzylamine は N-ニトロソが直接フェニル基に結合した構造ではないが、N-methyl-N-phenylnitrous amide の類似構造として実試験対象とした。

対象とした 6 物質のうち Hansen データベースでは N-methyl-N-phenylnitrous amide 以外の 5 物質が陰性の報告であった。一方で、統計ベース QSAR である CASE ULTRA GT1_BMUT モデル (version 1.8.0.1)

における陽性の可能性の高さは全ての物質において 98% 以上であり、以下の 4 物質

- 3-nitrosomethylaminopyridine
- 4-nitrosomethylaminopyridine
- n-nitrosodibenzylamine
- N-methyl-N-phenylnitrous amide

は既知の陽性(Known Positive)、残り 2 物質は既知の陰性(Known Negative)の予測結果となった。ただし、6 物質全てで陽性確率(Probability)が 98% 以上であり、既知の毒性情報がなければ陽性予測に該当する物質となった。知識ベース QSAR である Derek Nexus (version 6.1, Nexus version 2.3.0) では N-methyl-N-phenylnitrous amide 以外の 5 物質が陽性 (PLAUSIBLE) の予測結果となった。5 物質において Hansen データベースの Ames 陽性・陰性と QSAR 評価結果が一致していなかった。令和 3 年度 Ames 試験の実施を終え、6 剤のうち 5 剤で陽性の結果であった。Hansen データベースに記載された根拠となる原著論文の精査等、結果の解析を進めおり、令和 4 年度以降考察を進めていく。

C3. 第 2 回プロジェクト

2020 年に参加した 19 チームの間では結果の概要に相当する予測精度の指標(感度 (Sensitivity) : 陽性物質を陽性と判定できる能力、特異度 (Specificity) : 陰性物質を陰性と判定できる能力、精度 (Accuracy): 総合判定能力、など)情報の共有は行ったが、2022 年 3 月末現在、参加チーム以外には指標の値を公開していない。第 48 回 日本毒性学会学術年会および 11th Annual Global Summit on Regulatory Science (GSR21)での第 2 回プロジェクトに関する口頭発表を通じ、変異原性予測システムの開発に取り組む国立研究開発法人お

よび海外の行政機関も 2021 年後期始動で 2022 年 3 月末に予測結果を国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部に提出する条件で参加することとなった。第 2 回プロジェクトの参加チームは 2 チーム増え、11 か国 21 チームの構成となった。2021 年 10 月以降は第 2 回プロジェクトの参加者の追加を締めきり、21 チームの予測結果を用いた議論を深め、指標の概要などを学会や学術論文で公開することとした。

学習データとして提供した約 12000 物質の Ames 試験結果の陰性データと陽性データの比は 85 : 15 であり、陰性に偏っている。同様に第 2 回プロジェクトで予測対象とした 1589 物質のデータは、A 判定が 80 物質、B 判定が 156 物質、C 判定が 1353 物質であり、第 1 回プロジェクトと同様に陰性に偏ったデータであった。そして、第 2 回プロジェクトでの予測結果は感度が低く、特異度が高い予測結果の傾向が見られた。この様な感度と特異度の傾向は第 1 回プロジェクトの結果 (M. Honma et al., *Mutagenesis* **34**, 2-16, 2019) と類似していた。

D. 考察

第 1 回プロジェクトで予測対象とした 12140 物質に関し、入手可能な報告書情報に基づく精査を終了させた。本調査の範囲内では、少なくとも 1%の結果は疑似がありうる。ただし、今回の精査の結果は安衛法の判定を変えるものではなく、QSAR を構築する上で判定を修正したほうが適切な物質の提案に過ぎない。この提案を受け入れるか否かは Ames 変異原性に精通した QSAR 開発者の判断に委ねられる。

一方、第 2 回プロジェクトの結果における低感度の要因として、

- 構造アラート情報をはじめとした、これまでの経験的ルールを加味していない
- 学習データとして用いる Ames 試験結果は、プロジェクトで提供したデータでは不十分
- データのキュレーション (精査) が不十分であり、化学物質の構造や陽性と陰性のデータのバランスの考慮が不十分

等が考えられる。特に 3 番目の化学物質の構造については、Ames 変異原性予測 QSAR では、脱塩処理 (図 1 参照) など、事前に構造のキュレーションを実施して、学習データの構築およびテストデータの整理を行うが、変異遺伝部で提供したデータはデータセット構築時期によって脱塩処理がされているものとされていないものが混在していた。万が一、構造キュレーションを行っていない場合にはモデルの性能や予測結果に影響を及ぼした可能性がある。また、第 2 回プロジェクトで提供した学習データ・今回遺伝毒性情報など多くのデータセットにおいて、陰性と陽性が理想的な 1 : 1 から外れたインバランスなデータセットが多く存在し、対応するためのモデルの研究が広範囲で進められている (G. Haixiang, et al., *Expert Systems with Applications*, **73**, 220-239, 2017)。遺伝毒性 (*in vivo* 小核) 予測モデルに Sub-modeling approach や Down-sampling approach を導入することで予測精度向上に寄与する示唆が報告されている (J.W. Yoo et al., *Regul Toxicol Pharmacol.* **113**,104620, 2020)。

今年度実施した 6 物質の N-ニトロソ化合物の Ames 試験結果では陽性の傾向をとらえるには情報が不十分であった。より系統的な考察を行うためには令和 4 年度

に芳香族を中心とした N-ニトロソ化合物を含む試験を実施し、比較検討することで、QSAR の構築に必要な精緻なアラート構造および予測の基盤となる変異原性メカニズムの解明を目指す。

E. 結論

令和3年度は、第1回プロジェクトの取りまとめを進め、予測精度の全体の傾向を明らかにした。更に、第1回プロジェクトで予測評価対象とした安衛法 Ames 試験データに対する専門家による再評価を完了させ、高信頼性のデータセットを完成させる。更に、QSAR 予測の向上に資する改良に必要な Ames 変異原性試験対象として N-ニトロソ化合物を決定し、試験の実施を進め、考察に必要な情報を整理した。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama K, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure–activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™. *Genes and Environ.* **43**, 16, 2021.
2. P.I. Petkov, H. Ivanova, M. Honma, T. Yamada, T. Morita, A. Furuham, S. Kotov, E. Kaloyanova, G. Dimitrova, O. Mekenyan, Differences between *in vitro* and *in vivo* genotoxicity due to metabolism: The role of kinetics, *Computat. Toxicol.*, **22**, 100222, 2022.
3. Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Girard P,

Halamoda-Kenzaoui B, Hinton D, Hirose A, Hoeveler A, Honma M, Hugas M, Ishida S, Kass GE, Kojima H, Krefting I, Liachenko S, Liu Y, Masters S, Marx U, McCarthy T, Mercer T, Patri A, Pelaez C, Pirmohamed M, Platz S, Ribeiro AJ, Rodricks JV, Rusyn I, Salek RM, Schoonjans R, Silva P, Svendsen CN, Sumner S, Sung K, Tagle D, Tong L, Tong W, Eijnden-van-Raaij JVD, Vary N, Wang T, Waterton J, Wang M, Wen H, Wishart D, Yuan Y, Slikker W Jr. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **247**(1), 1-75, 2022.

4. Iso T, Natsume M, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonylhydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse. *Fundam. Toxicol. Sci.* **9**(2), 31-36, 2022.

F.2. 学会発表

1. 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充 : Ames/QSAR の必要性・具体例と国内外のインシリコ研究. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021年7月 神戸)
2. Furuham A : Bigdata Analysis: Outcome of the 2nd AMES/QSAR International Challenge Project. 11th Annual Global Summit on Regulatory Science (GSR21) (2021年10月 オンライン)
3. 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充 : 毒性予測活用への取り組み : 第2回

Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト・CBI 学会 2021 年大会 (2021 年 10 月 オンライン)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

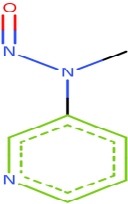
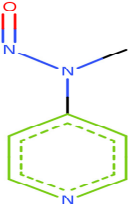
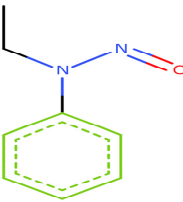
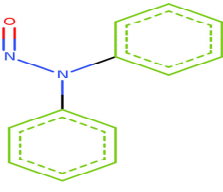
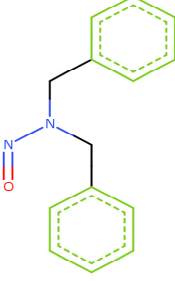
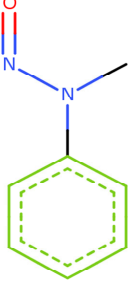
表 1 再評価によって判定が変更された物質一覧（令和2年度以降）

Registration No.	Result before review		Result after review	Note
12578	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
12998	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
12999	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
13388	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
13780	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
15107	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
15969	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
18542	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
18725	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
18746	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
19935	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
20083	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
20628	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
21008	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
21017	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
22021	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
22104	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.

表2 安衛法 Ames 試験データベースの再評価のまとめ

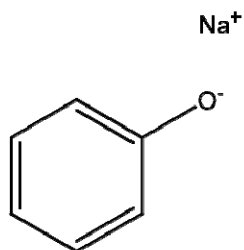
	A判定	B判定	C判定	計	備考
総化合物数：1stプロジェクト直後 (A)	672	1085	10383	12140	
2020年3月現在、試験報告書が存在せず (B)	44	164	1238	1446	所在確認とれず
2020年3月現在、試験報告書があり評価が可能 (C=A-B)	628	921	9145	10694	
2020年3月までに評価 (D)	628	921	16	1565	
2020年3月時点での専門家判断による評価結果訂正数 (E)	26	18	16		
2020年3月時点で専門家判断前後の評価Class増減 (E')	-23	15	2	-6	評価不能 (6)
2020年3月地点での判定結果 (A+E')	649	1100	10385	12134	第2回 Ames/QSAR プロジェクト 提供データ
2020年3月時点の未評価 (F=C-D)	0	0	9129	9129	
2021年5月時点での専門家判断による評価結果訂正数 (G)	0	0	50	50	2020年以降の更新
2021年5月時点で専門家判断前後の評価Class増減 (G')	0	50	-50	0	2020年以降の更新
2021年5月地点での判定結果 (A + E'+G')	649	1150	10335	12134	最終
2020年3月以降の未評価物質数 (評価不可能物質数)	0	0	15	15	試験報告書が欠損

表 3 令和3年度 Ames 試験対象物質のQSAR予測結果

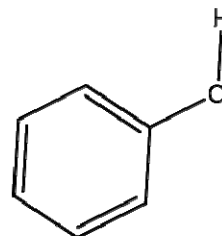
CAS番号	物質名	構造	Hansen et al.結果[1]	Derek NX result and Alert Nexus v230 DerekNx v61	CASE ULTRA GT1_BMUT Results 1802 Probability (%)
69658-91-9	3-nitrosomethylaminopyridine		陰性	PLAUSIBLE	Known Positive 98.2
16219-99-1	4-nitrosomethylaminopyridine		陰性	PLAUSIBLE	Known Positive 98.5
612-64-6	n-nitroso-n-ethylaniline		陰性	PLAUSIBLE	Known Negative 98.3
86-30-6	benzenamine, n-nitroso-n-phenyl-		陰性	INACTIVE	Known Negative 98.0
5336-53-8	n-nitrosodibenzylamine		陰性	PLAUSIBLE	Known Positive 99.1
614-00-6	N-methyl-N-phenylnitrous amide		陽性	PLAUSIBLE	Known Positive 98.0

[1] K. Hansen, S. Mika, T. Schroeter, A. Sutter, A. ter Laak, T. Steger-Hartmann, N. Heinrich, K.-R. Müller, Benchmark Data Set for *in Silico* Prediction of Ames Mutagenicity, J. Chem. Inf. Model., 49 (2009) 2077-2081.

提供した構造情報の例 Sodium phenoxideの構造



Non-washed SMILES(脱塩処理なし)
C1=CC=CC=C1[O-].[Na+]



Washed SMILES(脱塩処理)
C1=CC=CC=C1O

図1 脱塩処理しない構造 (左) と脱塩処理した構造 (右)

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

*In silico*予測手法の高度化とNew Approach Methodologyの活用に基づく化学物質の
統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

令和3年度 分担研究報告書

代謝予測に基づく反復投与毒性リードアクロス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	勝谷 成男	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	齊藤 亮子	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	丸山 多恵子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	山添 康	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	客員研究員

研究要旨

反復投与毒性は、化学物質安全性評価における主要な毒性エンドポイントである。リードアクロスの適用においては、構造類似性と生物学的類似性に基づき、評価対象物質と試験済みの類似物質をグループ化することが必要であるが、毒性機序の情報が限られている場合が多く、適用範囲の拡大は容易ではない。一方で、代謝を受けて共通あるいは極めて類似する毒性物質へ変換するケースのように、代謝の類似性に基づくグループ化は、複雑な全身毒性の予測に対して実際的なアプローチとして期待される。本研究では、反復投与毒性を対象としたリードアクロス手法の適用拡大を目指して、まず代謝予測ツールの調査を行い、続いて代謝予測の信頼性を評価する方法と代謝の類似性に基づく毒性予測を事例研究により検討した。評価対象物質の類似物質の実測代謝を予測できるかを確認することにより、対象物質について信頼性の高い代謝予測とそれに基づくグループ化およびリードアクロスが可能であることを実証した。さらなる事例の積み重ねは必要であるが、他の物質への適用は十分可能であり、規制安全性評価への実装へ向けて実用的なアプローチとなりうると考えられる。

A. 研究目的

反復投与毒性は、化学物質安全性評価における主要な毒性エンドポイントのひとつである。市場に流通する多数の未評価の化学物質について、その毒性評価を加速化させることが求められている。一方で、動物福祉は国際的に大きな流れとなっており、

段階的な動物試験の削減は不可避の情勢となっている。そこで代替アプローチの開発と、予測の不確実性を考慮した評価方法の確立およびその適用範囲の拡大が求められている。

反復投与毒性のような複雑な毒性エンドポイントの予測については、単一の QSAR

の適用は困難であり、OECD や欧米の規制行政機関では、試験と評価のための統合的アプローチ (IATA) の開発が進められている。New Approach Methodology (NAM)は、有害性評価の文脈において、toxicokinetics や toxicodynamics を包含する動物を用いない *in silico*, *in vitro* 等のアプローチを意味し、それらを統合して利用することにより、ヒト健康リスク評価の信頼性を向上させると期待されている。

我々は、上記の国際動向を見据えつつ、反復投与毒性についての予測と評価の方法の開発と実用化を目指している。これまで、化学物質の毒性情報を網羅的かつ容易に検索し解析することができるようにするため、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 を構築した。そして、IATA に基づくリードアクロスの適用範囲の拡大を目指して、有害性発現経路 (AOP) に基づくカテゴリーの構築に取り組み、その成果を積み重ねてきた。

反復投与毒性のリードアクロスの適用においては、化学的類似性と生物学的類似性に基づき、評価対象物質と試験済みの類似物質をグループ化することが必要であるが、毒性メカニズムの情報が限られている場合が多く、今なお適用範囲の拡大は容易ではない。その一方で、代謝を受けて共通あるいは極めて類似する物質へ変換するケースのように、代謝の類似性にもとづくグループ化は、特に化学物質の反復投与毒性の予測に対して実際的なアプローチであると考えられ、その適用拡大が期待される。その

ためには、信頼性の高い代謝予測と代謝の類似性評価の方法の確立が求められる。

最近では、さまざまな代謝予測モデルが開発されており、また実際の代謝物に関する実測データの蓄積が進められている。一方で、代謝予測モデルは多数の予測代謝物構造を提示し、その後の判断はユーザーに委ねられる。また、予測モデルには、予測性が高い領域と低い領域が混在していると考えられる。そこで、本研究では、代謝予測の結果の信頼性を評価する方法を検討し、その結果を海外機関で検討中のリードアクロスの標準化したワークフローに従って、毒性予測に適用する。以上の試行に基づき、代謝の類似性に基づく反復投与毒性のリードアクロス手法の確立と適用範囲の拡大を目指すことを目的とする。

さらに、本分担研究では、化学物質のヒトへの毒性影響を評価するために不足する情報を補う手段のひとつとして、ヒト代謝予測手法に着目し、その評価を検討した。毒性試験結果のヒトへの外挿において、評価対象物質のヒトにおける代謝情報は重要である。しかし、化学物質について、ヒトの代謝情報はほとんど利用できない。そこで、化学物質の Phase I 代謝に関わるヒト P450 について、どのような代謝予測モデルが利用可能であるか、さらにその予測精度ならびに利用にあたっての留意点を整理することにした。ヒト P450 代謝予測モデルについて高精度で化学物質代謝を予測できる領域を精査し、ヒト健康リスク評価への適用可能性について検討する。

B. 研究方法

B.1. 既存代謝予測ツールの調査

まず、本研究で使用する代謝予測ツールを探索するため、ツールの調査を行った。

予測ツールの開発や比較を行った学術文献と、予測ツールを俯瞰した総説を収集し、既存の代謝予測ツールについて、名称、製作者、概要、対象とする生物種、酵素や反応、関連文献、データセットの公開/非公開、有償/無償などの使用する上で有益な情報を整理し、表にまとめた。また、インターネット上で公開または紹介されている代謝予測ツールの情報を同様に収集し、整理した。

収集した代謝予測ツールの中から、本研究において解析や調査に用いるツールの選定を行った。

B.2. 代謝物予測に基づく毒性予測

代謝物が毒性発現に関与すると考えられる化学物質のグループにおいて、*in vivo* 毒性試験データおよび *in vivo* あるいは *in vitro* 代謝試験データを用いて、*in silico* 代謝物予測の妥当性を検証した。さらに、これらのデータが利用できないか一部が欠損している類縁物質について、代謝予測ツールを用いて予測される代謝物にもとづいて毒性の予測を行った。

In vivo 毒性データは NIHS 統合 DB の反復毒性試験結果から収集し、*in vivo* あるいは *in vitro* 代謝実験データは HESS (Hazard Evaluation Support System ver.4.2) データベースおよび QSAR Toolbox (ver.4.5) を用いて収集した。毒性が既知の物質については、その内容を精査し、化審法スクリーニング評価の有害性クラス (CSCL Hazard Class) に割り当てた。

検討した物質のグループはジクロロニト

ロベンゼン異性体である。ニトロ基が還元されてアニリンを生成すると考えられるが、一方で赤血球や肝臓での代謝の結果、グルタチオン (GSH) 枯渇を惹起し、血液毒性および肝毒性を引き起こす可能性がある。

In silico 代謝予測は、Lhasa 社の Meteor Nexus (v.3.1.0) と、MetaQSAR の代謝情報をもとに代謝物を予測する GLORYx (ver.1.0)を用いて行った。両ツールは、Phase Iおよび Phase II 代謝物を予測する。前者は、OECD IATA Case Studies Project での毒性予測の事例研究においてよく用いられており、後者はその前身の GLORY とともに、創薬分野で近年よく使用されているとされる。

さらに、同様の代謝と毒性メカニズムを有すると考えられる未評価の物質について、化学構造と *in silico* 代謝予測データにもとづいて、適切な類似物質を選定して正当化し、リードアクロスにより毒性影響と NOAEL または LOAEL を推定し、CSCL Hazard Class を割り当てた。

B.3. ヒト P450 代謝予測モデルの性能評価

SMARTCyp (コペンハーゲン大学、バージョン情報なし)、ADMET Predictor (ver. 10.3) (SimulationsPlus)、GLORY (ウィーン大学、バージョン情報なし)の 3 つの代謝予測ツールについて、ヒト CYP3A4 を対象に、代謝予測モデルを調査した。トレーニングデータセットへのアクセスの可能性、適用範囲に関する情報、予測結果の出力形式を比較することにより特徴を整理した。予測精度は、Yamazoe (2021)に記載されている CYP3A4 の基質 (44 物質) の構造情報を用いて、SMARTCyp については、上

位 3 位の代謝予測部位を Yamazoe らの報告¹⁾に記載されている代謝部位と比較した。ADMET Predictor と GLORY は代謝部位と代謝物を表示するので、収集した代謝マップから代謝物を確認し、予測代謝物の構造と比較した。

上位 3 位までの予測代謝部位から推測される代謝物または予測代謝物に実測代謝物が含まれているかを調べることにより予測精度を評価した。

(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. 結果

C.1. 既存代謝予測ツールの調査

収集した中から、比較的良好な文献などで引用、活用されている一部を表 1 にまとめた。

代謝予測ツールは、反応部位予測と代謝物予測に大別でき、さらに、生物種や対象とする酵素や反応によって分類できた。生物種はヒトやほ乳類を対象とするものが多かったが、明示されていないものや、腸内代謝などが選択できるツールもあった。専門家による知識をベースにルールを構築したものや、代謝物や代謝部位のデータセットの学習により予測を行うものがあった。P450 やその司る Phase I の代謝反応に限定したものや、Phase I 及び Phase II の個別の酵素ごとの反応を予測するもの、関連する酵素群によって最終的に生成される代謝物を導出するものなどがあった。

ツール開発に用いられたデータセットは、ツールの適用範囲などの確認に非常に有用であるが、企業の開発したツールについて

は公開されることは稀で、研究機関の開発したものでも、具体的なデータセット自体は非公開のものも多かった。

予測ツールの性能に関しては、一般に、予測が実測とどの程度一致しているかという正確性の指標として “Precision (適合率)”、予測が実測をどの程度カバーしているかという網羅性の指標として “Recall (再現率)” で評価されていた。以下に式を示す。

$$\text{Precision} = \frac{\text{True Positive 代謝物数}}{\text{(総予測代謝物数)}}$$

$$\text{Recall} = \frac{\text{True Positive 代謝物数}}{\text{(総実測代謝物数)}}$$

予測結果は部位または物質の一覧として出力されるが、独自のスコアにより確度の高い結果を提案するツールや、モードの切り替えにより確度の高い結果に絞り込んだり、可能性のある候補を幅広く示したりできるツール、関連する実測情報を参照できるツールなどもあった。

これらの中から、知識ベースの Meteor Nexus (Meteor)、機械学習モデルの GLORYx を選定し、今後の解析に用いることとした。

なお、これまでに多数の代謝予測ツールが開発されてきているが、開発者自身の研究に活用する目的で詳細が非公開のものや、開発後のメンテナンス、アップデート、公開が継続されていないものも多く、研究開発で得られた知見の継承、発展が難しいことが懸念された。

C.2. 代謝物予測に基づく毒性予測

1,3-Dichloro-2-nitrobenzene (member 1) と 1,3-dichloro-5-nitrobenzene (member 2) を対

象に、化審法スクリーニング評価を想定して、リードアクロスにより反復投与毒性の主要な毒性影響と毒性レベルを予測し、CSCL Hazard Class の分類を行った [ステップ 1 : 課題設定]。

評価対象物質は、NIHS 統合 DB および ECHA REACH のデータベースの検索の結果、反復投与毒性試験データが利用できないことが判明したので、当該物質とその類似物質について、毒性と関連すると考えられる物理化学性状、代謝、想定機序情報を収集することとした[ステップ 2 : データギャップ分析]。

ベンゼン環に塩素原子とニトロ基をもつ物質を NIHS 統合 DB 中で検索した結果、4 個のジクロロニトロベンゼン異性体 (member 3~6) と、2 個のモノクロロニトロベンゼン異性体 (member 7, 8) が確認された (表 2) [ステップ 3 : 類似物質の同定]。

Member 3-6 は、溶血影響が LOAEL の推定根拠となる leading effect であった。Member 5 のみ溶血影響と肝毒性影響が同用量から発現した。

本カテゴリーの溶血毒性機序は、GSH 抱合の進行に伴う GSH の枯渇と酸化ストレスの誘導と、ニトロ基の還元によるアニリン類縁体への変換に至るプロセスで生成すると考えられる、反応性が高い N-水酸化体のヘモグロビンへの作用である。肝毒性機序は複雑であるが、溶血機序と類似して GSH との抱合に伴う GSH 枯渇および反応性が高い N-水酸化体の生体高分子への作用が毒性発現に至るトリガーであると考えられる。

Meteor および GLORYx の代謝予測ツ

ルの結果は、おおむねハロゲンとの GSH 抱合を予測した。しかし、ニトロ基に対してメタ位にハロゲンを持つ member 7 (1-chloro-3-nitrobenzene)の予測結果が異なっていた。この代謝予測の結果の違いは、両予測ツールに登録されている代謝ルールの違いによるものであると考えられた (図 1)。

実測の代謝データが利用できる member 3, 6, および 7 の予測代謝物と、実際に検出された代謝物を比較すると、Meteor は、パラ位またはオルト位の GSH 抱合、およびニトロ基のアミノ基への還元を正しく予測した。さらに、メタ位は GSH 抱合を受けず、ニトロ基がアミノ基に還元されることを正しく予測した。よって、このグループの代謝予測には、Meteor を活用することが妥当と考えられた。

上記の結果から、評価対象物質 member 1 は、その代謝はオルト位の GSH 抱合、およびニトロ基のアミノ基への還元が優先的に進むと予測された。代謝の類似性および毒性を過小評価しないことを考慮して member 6 (2,4-dichloro-1-nitrobenzene)を適切な類似物質として選択した [ステップ 4 : 類似物質の評価 (member 1)]。

Member 6 の主要な毒性 (溶血) および LOAEL 値をリードアクロスして LOAEL は 8 mg/kg/d と推定された。有害性評価値 (D value) は不確実性係数 6000 (LOAEL 使用、慢性への外挿、ヒトへの外挿それぞれ 10、6、100) で除して 0.00013 と算出され、CSCL Hazard Class 2 が割り当てられた [ステップ 5 : データギャップ補完 (member 1)]。

Member 1 は member 6 の位置異性体であり、GSH 抱合が進む点において類似しているとしたが、その反応速度や GSH 枯渇の

レベルの違いにどの程度違いがあるか不確実性がある。しかし、既存の代謝情報を総合すると GSH 抱合はパラ位がオルト位より優先的であることが示唆されることから、member 6 の方が GSH 抱合は進みやすく、毒性（溶血影響）は強いと考えられる。また member 6 はもっとも厳しい CSCL Hazard Class 2 であることから、member 6 からのリードアクロス予測に基づく member 1 の有害性クラス分類は過小評価していないと考えられ、上記の不確実性は許容できる [ステップ 6：不確実性評価 (member 1)]。

一方、評価対象物質 member 2 (1,3-dichloro-5-nitrobenzene) は、2 カ所のメタ位に Cl 原子が置換しており、その代謝は GSH 抱合ではなくニトロ基の還元が優先的であると予測された。そこで、同様の代謝経路を示す member 7 をリードアクロスする類似物質として選択した [ステップ 4：類似物質の評価 (member 2)]。

Member 7 の主要な毒性（溶血）をリードアクロスして、LOAEL 値は 1 mg/kg/d と予測された。D-value は 0.00017 と算出され、CSCL Hazard Class 2 が割り当てられた [ステップ 5：データギャップ補完 (member 2)]。

Member 2 は member 7 と比較すると置換している Cl 原子の数が 1 個多いため、疎水性が高く、生体内への吸収がより大きい可能性がある。したがって、member 7 から member 2 へのリードアクロスによる毒性予測は過小評価の懸念がある。しかし、member 3-7 の 4 つの dichloronitrobenzene 異性体の毒性レベルは、member 7 のそれと同等かむしろ弱い傾向にあり、Cl 原子置換数 1 個の増加は毒性レベルの増強に大きな影

響は与えないことが示唆される。また、member 7 は CSCL Hazard Class 2 であることから、member 2 の有害性クラス分類は過小評価していないと考えられ、上記の不確実性は許容できる [ステップ 6：不確実性評価 (member 2)]。

C.3. ヒト P450 代謝予測モデルの性能評価

SMARTCyp、ADMET Predictor、GLORY の 3 つのツールについて、相互比較によりその機能の相違点を整理した。SMARTCyp は、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9 の代謝部位を予測する。このツールは Meteor や Toxtree などの代謝予測ツールにも実装されている。ADMET Predictor は 9 種類の P450 分子種の代謝部位を予測し、それをベースに代謝物の予測を行う。付属の MedChem Designer を組み合わせて、代謝物生成に各 P450 分子種が寄与する割合や各代謝物の生成比率を表示できる。さらに、PBPK モデルを作成する GastroPlus と一体的に利用することも可能である。GLORY は同じくウィーン大学で開発された代謝部位予測ツールである FAME 2 の予測結果に基づいて代謝物の構造を予測する。このツールは CYP3A4 を含む 3 つの P450 分子種の代謝物構造を予測する。これらのアウトプットの様式は付録 1-3 に示した。

次いで、ヒトで最も発現レベルが高い P450 分子種である CYP3A4 について、それぞれのモデルの代謝の予測精度を調べた。Yamazoe らの報告¹⁾に記載されている CYP3A4 の基質となる 44 物質について、それぞれ上位 3 位までの予測代謝物に実測代謝物が含まれるかを解析した。いずれのモデルも比較的高い予測精度が得られたが、

反応機序により予測精度は異なっており、特に N-脱アルキル化反応は高い予測性を示した。一方、環の水酸化反応は、反応を受ける部位の予測性が高くなかった。

使用事例として、クロロアセトアニリド系の Alachlor の構造を上記 3 モデルに供したところ、いずれのモデルも O-脱アルキル化中間代謝物を介して 2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl)-acetamide (CDEPA) が生成されることが示された。

さらに US EPA の Chemical Dashboard で Alachlor のハイスループット bioactivity プロファイルを調査したところ、human CYP3A4 ADME assay に対して positive であった。以上の証拠を統合することにより、Alachlor はヒトで CYP3A4 の基質となり、CDEPA へ代謝される可能性が高いことが示唆された。

以上の代謝予測の結果は、ヒト肝ミクロソームを用いた実試験データより確認できる。Alachlor は CYP3A4 と CYP2B6 により代謝され CDEPA が生成する。本代謝物はラット肝ミクロソームでも同定されている。CDEPA はヒトおよびラットにおいてさらなる代謝を受け、ベンゾキノニンイミン体が生成する²⁾。本代謝物は、反応性が高く閾値がある遺伝毒性発がんに関与すると考えられている。このことから、ヒトとラットは、共通の発がん性代謝物を生成することが示された。しかし、CDEPA の生成に関与する初発の酸化反応の反応速度は、ヒトの方がラットより 10 倍以上遅いことが知られている。

In silico 手法では対象化合物のヒト代謝物（検出が難しい反応性代謝物を含む）の迅速な予測が可能であり、*in vitro* 手法によ

る反応速度に関する情報を得て、動物試験結果に基づく毒性のヒト外挿の信頼性を向上させることができることが示唆された。

D. 考察

本研究では、代謝予測に対して知識ベースの Meteor、機械学習統計モデルの GLORYx を選択した。予測代謝物をスコアとともに提示するが、その確からしさの検証結果はない。代謝予測モデルが提示する複数の代謝物候補をどのように取捨選択していくかについて、確立した方法はない。学習データセットが公開されていないモデルでは、モデルの適用範囲が不明であり、外部検証は難しい。さらに、予測モデルには、予測性の高い領域と低い領域があると考えられる。このような予測の不確実性を把握し、代謝予測の結果の信頼性をどのように評価するかが課題である。

ジクロロニトロベンゼンのケースでは、Meteor は、主要な毒性（溶血影響）に関連すると考えられる GSH 抱合とニトロ基のアミノ基への還元について、実測代謝を正しく予測した。予測結果の根拠を確認したところ Cl 原子の置換位置によって GSH 抱合が進むかどうかを識別するルールが収録されていた。さらに Meteor では、ニトロベンゼン類がアニリン類へ変換されることを収録した根拠文献が提示された。

評価対象物質の類似物質について、実測の代謝を予測モデルが正しく予測できているかを確認することによって、ローカルな領域に限定して代謝予測結果の信頼性を評価することができると考えられる。

そこで適切なモデルの信頼できる予測結果に基づき、代謝の類似性から評価対象物

質と試験済み類似物質をグループ化した。このようなアプローチを導入することは、リードアクロスのための類似物質の選択の正当化、不確実性の低減化に役立つと考えられる。

本アプローチを他のカテゴリー物質の反復投与毒性予測へ拡大適用することを検討中である（ハロアルカン類の肝毒性と腎毒性）。試行を重ねて、このアプローチの妥当性と留意点を整理していく予定である。

OECD QSAR Assessment Framework プロジェクトでは、化学物質の規制安全性評価のエンドポイントについて、*in silico* モデルによる予測結果の信頼性を評価する方法の原則を取りまとめているところであり、本研究ではその検討の最新動向を考慮した。また、リードアクロスのワークフローについては、欧州食品安全機関（EFSA）において、近年の研究成果に基づいた整理が専門家グループにより進められており、本ケーススタディを実施するときの参考とした。

このアプローチの実行を効率化し、適用範囲を拡大するためには、実測の代謝データベースの充実が必要である。現在、約 1000 物質の代謝情報の一元化を進めている。

さらに、本分担研究では、化学物質のヒトへの毒性影響を評価するために不足する情報を補う手段のひとつとして、ヒト代謝予測手法に着目し、その評価を検討した。

まず、ヒトにおける主要な P450 分子種である CYP3A4 を対象にした。使用した 3 つの代謝予測モデル SMARTCyp、ADMET Predictor、GLORY はいずれも比較的高い予測精度が得られたが、反応機序により予測精度は異なっており、例えば N-脱アルキル化反応は、高い予測性を示した。一方

で、検証に用いたデータセットはいずれも医薬品であり、予測モデル構築に使われていた可能性があることから、データセットが公開されている SMARTCyp、GLORY については、検証データセットと学習データセットの重複を精査中である。したがって、外部データセットを用いたときには同様の予測精度は期待できない可能性に留意する必要がある。各モデルの予測結果にはスコアが提示されるが、スコアと予測性の関係の解析は、今後の課題である。

Alachlor のケーススタディでは、3 つのツール SMARTCyp、ADMET Predictor、GLORY の CYP3A4 代謝予測モデルは、いずれも O-脱アルキル化体を生成する可能性が最も高い代謝物として予測した。異なる学習データセットおよび異なるアルゴリズムに基づくモデルから得られた予測結果に一貫性があることを確認することによって、代謝予測の不確実性を低減できる可能性があると考えられる。

Yamazoe らによるヒト CYP3A4 テンプレートモデル³⁾は、44 物質の代謝部位の予測精度は 100%である¹⁾が、その適用には、ユーザーが手動でコンフォーマーの作成と基質テンプレートへの当てはめを行う必要がある。迅速性に欠け、極めて高い専門性が求められる。したがって、このモデルの活用には、手法の習得の他、手間のかかる作業の一部を自動化するなどの改善が求められる。本モデルによる化学物質代謝予測の試行と課題の整理は次年度に実施する予定である。

今回は、米国の Tox21 プログラムの *in vitro* ハイスループットアッセイのうち、CYP3A4 代謝に係るデータを収集して、陽

性であることを確認し、代謝予測モデルの予測結果の不確実性の低減を行った。ケーススタディを積み重ねることにより、P450代謝予測の不確実性を低減する方法を充実させる必要がある。

一方で、いずれの代謝予測モデルの結果も代謝物の生成速度についての情報はなく、その定量データの取得のためには *in vitro* 代謝試験を実施することが必要であると考えられる。また、*in silico* モデルは、(不安定で *in vitro* 試験で検出が難しい代謝物を含めて) 予測される代謝物の構造情報を提示する。これらの情報を活用することにより、実試験における代謝物の同定に要するコストや時間の低減化を図ることが可能になり、*in vitro* 代謝試験の効率化、さらには定量的なヒト安全性予測に寄与できると考えられる。

E. 結論

本研究では、反復投与毒性を対象に、リードアクロスアプローチの適用拡大を目指して、代謝予測の信頼性を評価する方法と代謝の類似性に基づく毒性予測を事例研究により検討した。評価対象物質の類似物質の実測代謝を予測できるかを確認することにより、対象物質について信頼性の高い代謝予測とそれに基づくグループ化とリードアクロスが可能であることを実証した。さらなる事例の積み重ねは必要であるが、他の物質への適用は十分可能であり、規制安全性評価への実装へ向けて有用であると考えられる。

F. 参考文献

1. Yamazoe Y. Tohkin M. Development of

template systems for ligand interactions of CYP3A5 and CYP3A7 and their distinctions from CYP3A4 template. *Drug Metab Pharmacokinet.* 38, 100357, 2021.

2. Coleman S, Linderman R, Hodgson E, Rose R L. Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environ Health Perspect.* 108, 1151-1157, 2000.
3. Yamazoe Y. Goto T. Tohkin, M. Reconstitution of CYP3A4 active site through assembly of ligand interactions as a grid-template: Solving the modes of the metabolism and inhibition. *Drug Metab Pharmacokinet.* 34, 113-125, 2019.

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. P.I. Petkov, H. Ivanova, M. Honma, T. Yamada, T. Morita, A. Furuhashi, S. Kotov, E. Kaloyanova, G. Dimitrova, O. Mekenyan, Differences between *in vitro* and *in vivo* genotoxicity due to metabolism: The role of kinetics. *Computat. Toxicol.* **22**, 100222, 2022.
2. Yamazoe Y, Yamada T, Hirose A, Murayama N. Deciphering Key Interactions of Ligands with CYP3A4-Template* system. *Food Safety (Tokyo)* **9**(1), 10-21, 2021.
3. 山田 隆志 : Cefic LRI/ILSI Europe Joint Workshop での Carcinogen Dose Response Database for Threshold of Toxicological Concern (TTC) の概要ならびに TTC に関する近年の国際動

- 向. イルシー 2022, in press.
4. Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, Hirose A, Yamada T. A physiologically based kinetic modeling of ethyl tert-butyl ether in humans—An illustrative application of quantitative structure-property relationship and Monte Carlo simulation. *J. Toxicol. Sci.* **47**, 77-87, 2022.
 5. Lee BM, Lee SH, Yamada T, Park S, Wang Y, Kim KB, Kwon S. Read-across approaches: Current applications and regulatory acceptance in Korea, Japan, and China. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* **85**(5), 184-197, 2022.
 6. Yamada T, Kawamura T, Maruyama T, Kurimoto M, Yamamoto H, Katsutani N, Hirose A. Quantitative structure-activity relationship and a category approach to support algal toxicity assessment of human pharmaceuticals. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**, 195-204, 2021.
 7. Yamada T, Miura M, Kawamura T, Ushida K, Inoue K, Kuwagata M, Katsutani N, Hirose A. Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J. Toxicol. Sci.* **46**, 531-538, 2021.
 8. Tanabe S, Hirose A, Yamada T. Adverse Outcome Pathway on histone deacetylase inhibition leading to testicular atrophy. *OECD Series on Adverse Outcome Pathways No. 17*.
 9. Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VII). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* **139**, 71-78, 2021.
 10. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a threshold of toxicological concern concept for skin sensitization by *in vitro/in silico* approaches. *Journal of Japanese Cosmetic Science Society.* **45**(4), 331-335, 2021.
- G.2 学会発表
1. 山田 隆志 : Computational Toxicology の有効利用の実際と将来展望. 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021.11.11, 沖縄-Online Hybrid)
 2. 山田 隆志 : New Approach Method (NAM) の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の構築へ向けた事例研究の開発. 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021.11.11, 沖縄-Online Hybrid)
 3. Yamada T. Development and Improvement of *in silico* approaches for accelerating regulatory chemical risk assessment. The 9th congress of AsiaToxIV (2021.10.21, Hangzhou, China-Online Hybrid)
 4. Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Ohata H, Matsumoto M, Katsutani N, Hirose A. Development of mechanism-based hematotoxicity categories for read-across assessment using an integrated toxicity database of chemical substances. 11th

World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2021.8.27, Online)

5. 山田 隆志, 栗本 雅之, 広瀬 明彦, Chihae Yang, James F Rathman : 化学物質の非発がんエンドポイントのTTCアプローチのための新しいデータベースの開発. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
6. 川村 智子, 山田 隆志, 辻井 伸治, 大畑 秀雄, 勝谷 成男, 広瀬 明彦 : リードアクロス評価のためのメカニズムに基づく血液毒性カテゴリーの開発と精緻化—統合毒性データベースを利用した事例—. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
7. 川島 明, 井上 薫, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦 : ラットを用いた3-メチルペンタン、イソオクタン、イソノナンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
8. 井上 薫, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 川島 明, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦 : リスク評価の優先順位付けのための発がん性定量評価における各種毒性指標の適用について. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
9. Yamada T. Improvement of QSAR and Read-across for Chemical Risk Assessment and Efforts toward Regulatory Acceptance in Japan. 2021 Korean Society of Toxicology (KSOT)/ Korean Environmental Mutagen Society (KEMS) Toxicology Workshop & Spring International Symposium (2021.5.31,

Online).

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

H.1. 特許取得
なし

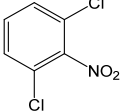
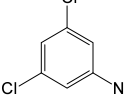
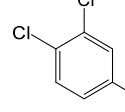
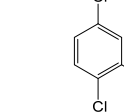
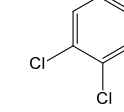
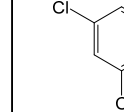
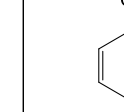
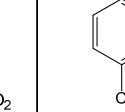
H.2. 実用新案登録
なし

H.3. その他
なし

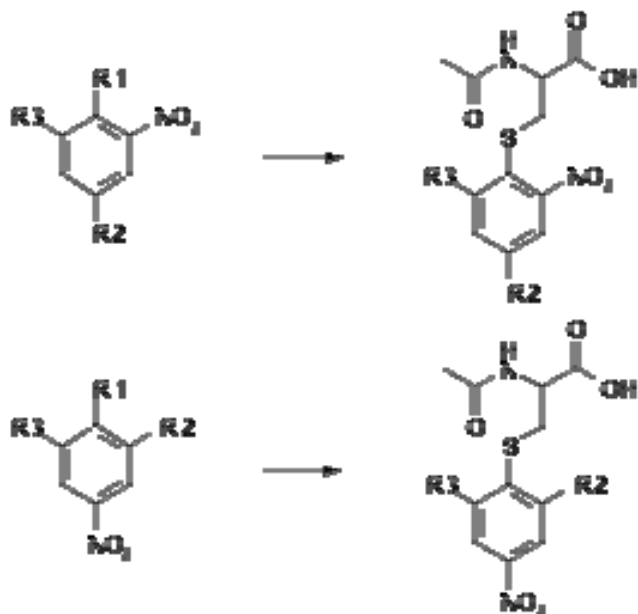
表 1 代表的な代謝予測ソフトウェアの調査結果

ソフトウェア	予測対象	予測手法	プラットフォーム	製作者	URL	生物種	酵素/反応	有償 無償	データ セット
BioTransformer	代謝物	知識ベース 機械学習	ブラウザ	The Metabolomics Innovation Centre	https://biotransformer.ca/	mammals, their gut microbiota, soil/ aquatic microbiota	EnzymeCommitted-based, CYP450, Phase 2, Human Gut Microbial and Environmental Microbial	無償	公開
ADMET predictor	代謝物 反応部位	機械学習	インストール	Simulations Plus	https://www.simulations- plus.com/software/admetpredictor/ metabolism/	不明	CYP (1A2/2A6/2B6/2C8/2C9/2C19/2D6/2E1/3A4), UGT, AOX	有償	非公開
Meteor Nexus	代謝物	知識ベース	インストール	LHASA	https://www.lhasalimited.org/produ cts/meteor-nexus.htm	不明	Phase 1 Phase 2	有償	非公開
FAME	反応部位	機械学習	ブラウザ	Univ. Hamburg University of Chemistry and Technology Prague	https://nerdd.univie.ac.at/fame3/	human	Phase 1 (CYP/3A4, 2D6, 2C9) Phase 2 (FAME3/ UGTs, GSTs, SULTs, MTs, and NATs)	無償	不明
GLORY	代謝物	機械学習	ブラウザ	Univ. Vienna	https://nerdd.univie.ac.at/glory/	human	Phase1 (CYP/3A4, 2D6, 2C9)	無償	公開 (GLORY xに内包)
GLORYx	代謝物	機械学習	ブラウザ	Univ. Vienna	https://nerdd.univie.ac.at/gloryx/	human	Phase1 (CYP/3A4, 2D6, 2C9) Phase 2 (UGTs, GSTs, SULTs, MTs, and NATs)	無償	公開
SMARTCyp	反応部位	機械学習	ブラウザ	Univ. Copenhagen	https://smartcyp.sund.ku.dk/mol_to _som	不明	Specific models: CYP (2C9, 2D6, 3A4) CYP(1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6, 2E1)に適用可能との報告あり	無償	公開
TIMES	代謝物	ヒューリス ティック	インストール	Laboratory of Mathematical Chemistry	http://oasis- lmc.org/products/software/times.as px	不明	Phase 1 (aliphatic C-oxidation, aromatic C-hydroxylation, oxidative N- and O-dealkylation, epoxidation, ester and amide hydrolysis, carbonyl group reduction, nitro and azo group reduction, N- hydroxylation, etc.) Phase 2 (glucuronidation, sulfation, glutathione conjugation, N- acetylation, etc.)	有償	公開
CypReact	反応の 有無	機械学習	インストール	Univ. Alberta	https://bitbucket.org/Leon_Ti/cypre act/src/master/	human	CYP(1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, or 3A4)	無償	公開
CyProduct	代謝物	機械学習	インストール	Univ. Alberta	https://bitbucket.org/wishartlab/cyp roduct/src/master/	human	CYP(1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, or 3A4)	無償	公開
MetaTrans	代謝物	機械学習	インストール	Rice University, USA	https://github.com/KavrakiLab/Met aTrans	human	Phase 1, Phase 2, others (CYP450 and other oxidasing enzymes for phase 1. UDP-GT, sulfotransferases for phase 2. hydrolases and enzyme not specified for other reactions.)	無償	公開

表2 ジクロロニトロベンゼンカテゴリーの反復投与毒性予測のためのデータマトリックス

		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8
Chemical info	CAS	601-88-7	618-62-2	99-54-7	89-61-2	3209-22-1	611-06-3	121-73-3	88-73-3
	Name	1,3-dichloro-2-nitrobenzene	1,3-Dichloro-5-nitrobenzene	1,2-Dichloro-4-nitrobenzene	1,4-Dichloro-2-nitrobenzene	1,2-Dichloro-3-nitrobenzene	2,4-Dichloro-1-nitrobenzene	1-Chloro-3-nitrobenzene	1-Chloro-2-nitrobenzene
	Structure								
	Molecular weight	192.0	192.0	192.0	192.0	192.0	192.0	157.6	157.6
Physico chemical property	logP (measured value)	2.2	2.2	3.1	3.1	3.1	3.1	2.5	2.2
	ACD logP (calculated value)	2.7	3.3	3.2	3.0	2.9	3.0	2.6	2.3
Toxicity information	Route/ Strain	NA	NA	Oral (Gavage)/ SD Rat	Feed/ F344 Rat	Oral (Gavage)/ SD Rat	Oral (Gavage)/ SD Rat	Gavage/ Cr:CD(SD)BR Rat	Feed/ F344 Rat
	Duration	NA	NA	42 days	92 days	44 days	45 days	28 days	91 days
	Hepatic effect	No data	No data	100 mg/kg/d	93 mg/kg/d	≥ 25 mg/kg/d	8 mg/kg/d	25 mg/kg/d	4 mg/kg/d
	Hematologic effect	No data	No data	≥ 20 mg/kg/d	106 mg/kg/d	≥ 25 mg/kg/d	8 mg/kg/d	1 mg/kg/d	4 mg/kg/d
	Integrated conclusion (eg. read-across)	R.A. from No.6, LOAEL: 8mg/kg/d	R.A. from No.7, LOAEL: 1mg/kg/d	NOAEL: 4 mg/kg/d	LOAEL:93 mg/kg/d	NOAEL: 5 mg/kg/d	LOAEL:8 mg/kg/d	LOAEL:1 mg/kg/d	LOAEL:4 mg/kg/d
	D value	0.00133	0.00017	0.00667	0.04650	0.00833	0.00133	0.00017	0.00200
	CSCL Hazard Class	Class 2	Class 2	Class 3	Class 3	Class 3	Class 2	Class 2	Class 2
Metabolism information	【Measured】	No data	No data	GSH Conjugation at p- position of Nitro group	No data	No data	GSH Conjugation at p- position of Nitro group	Nitro to Aniline	GSH Conjugation
									Nitro to Aniline
	in vivo / in vitro (species)			in vivo (rat)			in vitro (rat)	in vitro (rat)	in vitro (rat)
	【Predicted】	GSH Conjugation (1000)	Nitro to Aniline (373)	GSH Conjugation at p- position of Nitro group (1000)	GSH Conjugation at o- position of Nitro group (1000)	GSH Conjugation at o- position of Nitro group (1000)	GSH Conjugation at p- position of Nitro group (1000)	Nitro to Aniline (373)	GSH Conjugation (1000)
		Meteor Nexus: 3.1.0 (score)	Nitro to Aniline (873)		Nitro to Aniline (873)	Nitro to Aniline (872)	Nitro to Aniline (872)	Nitro to Aniline (872)	Hydroxylation of Benzene (p- position of Nitro group: 277, p- position of Chrolo: 269, o- position of Nitro group: 139)
	GLORYx (score)	GSH Conjugation (0.464)	GSH Conjugation (0.312)	GSH Conjugation at p- position of Nitro group (0.484)	GSH Conjugation at o- position of Nitro group (0.484)	Nitro to Aniline (0.412)	GSH Conjugation at o- position of Nitro group (0.464)	GSH Conjugation (0.312)	GSH Conjugation (0.484)
		Nitro to Aniline (0.436)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.292)	GSH Conjugation at m- position of Nitro group (0.376)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.412)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.412)	Nitro to Aniline (0.380)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.256)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.360)
		Hydroxylation of Benzene at p- position of Nitro group (0.436)	Nitro to Aniline (0.292)	Nitro to Aniline (0.256)			Hydroxylation of Benzene at o- position of Nitro group (0.380)	Nitro to Aniline (0.256)	Nitro to Aniline (0.360)
			Hydroxylation of Benzene at o- position of Nitro group (0.256)						

• 446 Conjugation of Glutathione with Electron Deficient Aromatic Compounds



R1 = Cl, Br, I, NO, NO₂, OPO(OR₄)₂

R2, R3 = NO₂, Cl, CF₃, H

R4 = carbon (not attached to further heteroatoms and bearing at least one hydrogen atom)

図 1. Meteor におけるニトロ基とハロゲンを持つベンゼン環の代謝予測ルール

ニトロ基に対して、パラ位とオルト位にあるハロゲンに対して、GSH との反応が起こるが、メタ位に対しては起こらない (Meteor Nexus のレポートから引用)。

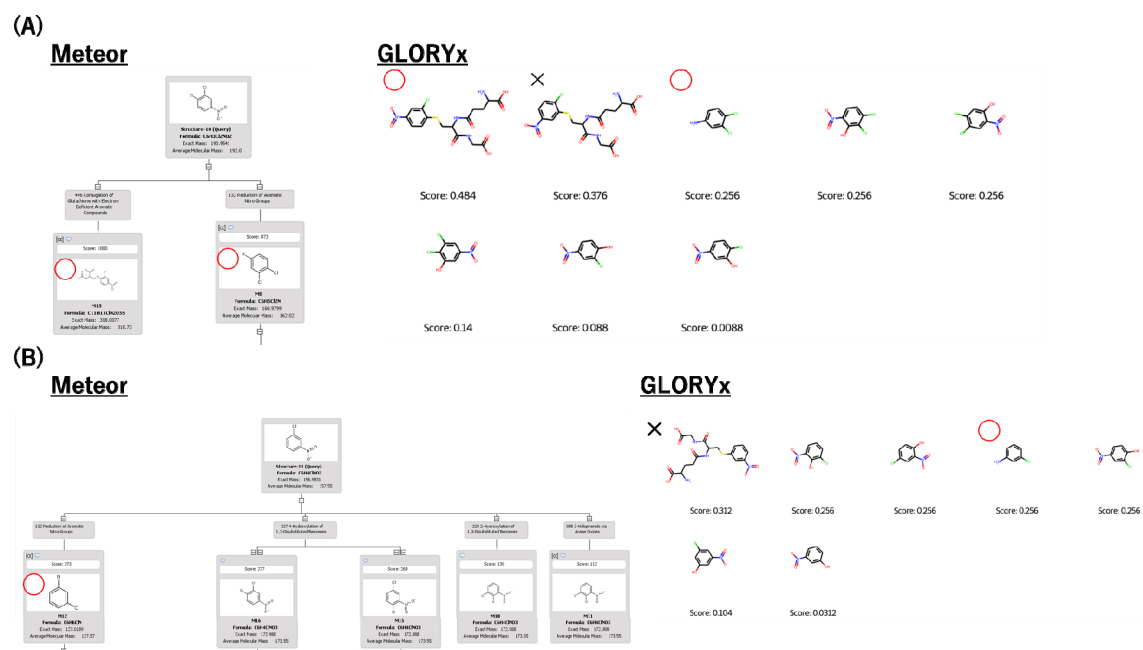


図 2. Meteor と GLORYx の予測代謝物の比較 (A) Member 7 (B) Member 12

両物質とも代謝の実試験データが利用できる。毒性発現に関連する代謝物である GSH 抱合体とアニリン類の実測代謝物と一致した予測代謝物の構造には○を、一致しなかった代謝物には×を示した。

付録 CYP3A4 代謝予測モデルのアウトプット

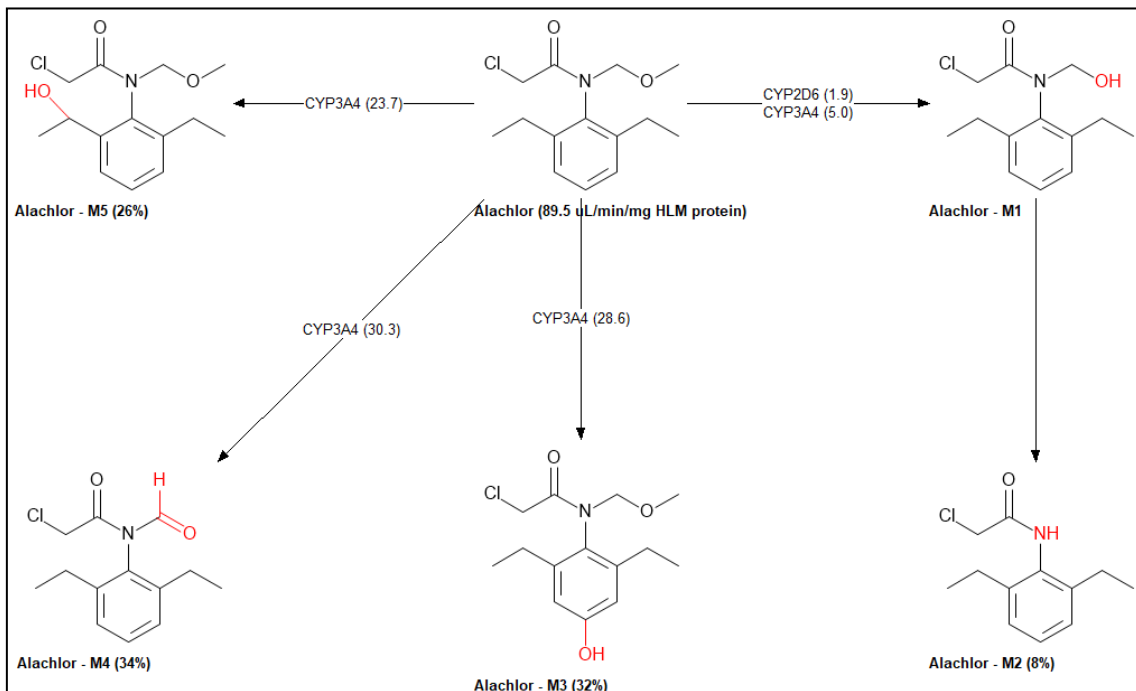
● SMARTCyp

Alachlor		3A4	2D6	2C9			
1							
3A4 Ranking	Atom	3A4 Score	Energy	2DSASA	Span2end	Relative Span	Similarity
1	C.18	51.5	62.2	67.8	0	1.0	0.7
2	C.16	55.6	62.2	22.0	2	0.7	0.4
3	C.8	58.4	66.4	28.2	1	0.9	0.7
4	C.3	68.0	75.9	26.0	1	0.9	0.4
5	C.11	77.1	86.3	30.8	0	1.0	1.0
6	C.10	78.4	86.3	26.6	1	0.9	0.7
7	C.9	79.2	89.6	60.7	0	1.0	1.0
8	N.5	85.1	89.6	-1.8	3	0.6	0.4

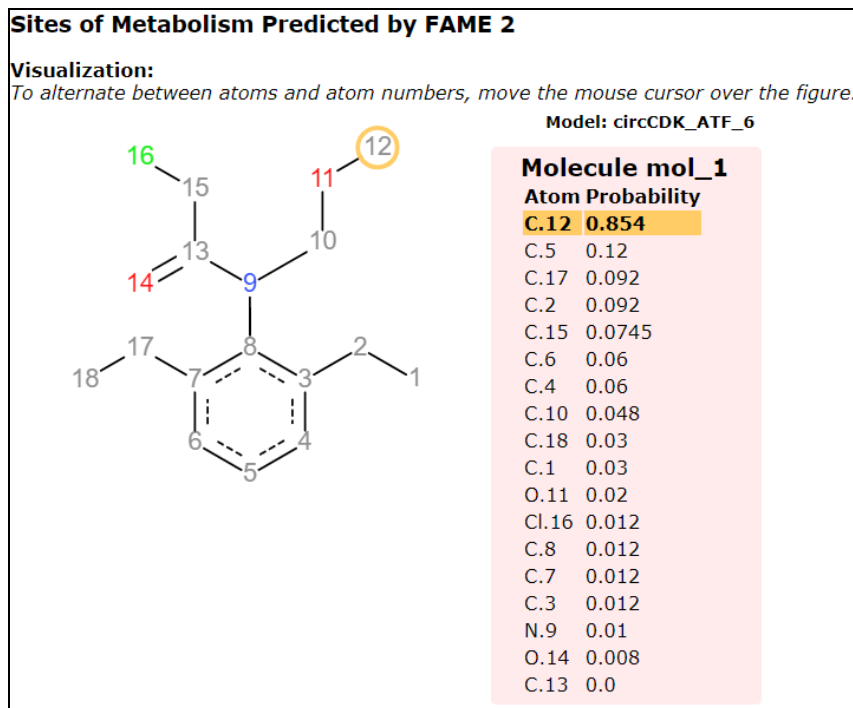
Molecule Name	Molecule Number	Atom Number	Atom Name	Atom	Span 2end	Span2end_d_N_Correction	Span2end_d_CO_Correction	COO-Dist	COO_Correction	N+dist	N_Correction	Relative Span	2DSASA	Reactivity	Energy	3A4 Score	2D6 Score	2C9 Score	3A4 Ranking	2D6 Ranking	2C9 Ranking	N_ox	Similarity	
Alachlor	0	0	O	0.1	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	0	999	999	992.1429	1005.7	1004.9	9	9	9	0	0.666667	
Alachlor	0	1	C	C.2	2	13.4	11.8	0	0	0	0	0.714286	3.975245	999	999	993.1267	1012.241	1010.641	10	10	10	0	0	
Alachlor	0	2	C	C.3	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	25.98947	75.9	75.9	68.00328	81.56042	80.76042	4	4	4	0	0.4	
Alachlor	0	4	N	N.5	3	20.1	17.7	0	0	0	0	0.571429	-1.83095	89.6	89.6	85.10181	109.7732	107.3732	8	8	8	0	0.4	
Alachlor	0	5	C	C.6	3	20.1	17.7	0	0	0	0	0.571429	1.189	999	999	994.381	1019.052	1016.652	12	12	12	0	0	
Alachlor	0	6	C	C.7	2	13.4	11.8	0	0	0	0	0.714286	1.861274	999	999	993.2113	1012.326	1010.726	11	11	11	0	0	
Alachlor	0	7	C	C.8	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	28.16479	66.4	66.4	58.41627	71.97341	71.17341	3	2	2	0	0.666667	
Alachlor	0	8	C	C.9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	60.6685	89.6	89.6	79.17326	87.17326	87.17326	7	6	6	0	1
Alachlor	0	9	C	C.10	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	26.83781	86.3	86.3	78.37734	91.93449	91.13449	6	7	7	0	0.666667	
Alachlor	0	10	C	C.11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	30.75828	86.3	86.3	77.06967	85.06967	85.06967	5	5	5	0	1
Alachlor	0	11	C	C.12	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	26.63781	86.3	86.3	78.37734	91.93449	91.13449	6	7	7	0	0.666667	
Alachlor	0	12	C	C.13	2	13.4	11.8	0	0	0	0	0.714286	1.861274	999	999	993.2113	1012.326	1010.726	11	11	11	0	0	
Alachlor	0	13	C	C.14	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	28.16479	66.4	66.4	58.41627	71.97341	71.17341	3	2	2	0	0.666667	
Alachlor	0	14	C	C.15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	60.6685	89.6	89.6	79.17326	87.17326	87.17326	7	6	6	0	1
Alachlor	0	15	C	C.16	2	13.4	11.8	0	0	0	0	0.714286	21.97626	62.2	62.2	55.60666	74.72095	73.12095	2	3	3	0	0.4	
Alachlor	0	16	O	O.17	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	0	999	999	992.1429	1005.7	1004.9	9	9	9	0	0	
Alachlor	0	17	C	C.18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	67.76639	62.2	62.2	51.48934	59.48934	59.48934	1	1	1	0	0.666667

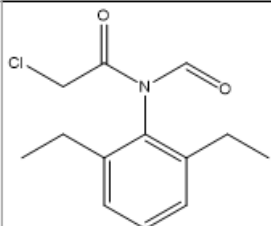
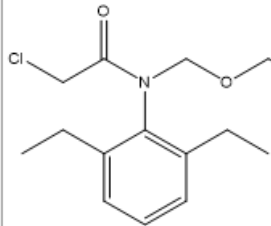
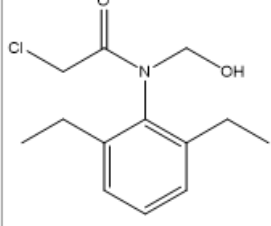
● ADMET Predictor (Map は MedChem Designer による)

Identifier	Canonical SMILES	Pair Count	Geometry	3D Quality	AP_FWeight	Met_CYP1A2	Met_CYP2C19	Met_CYP2C9	Met_CYP2D6	Met_CYP3A4	Met_Decomp_Form	Met_Encyme	Met_Level	Met_Mass_List	Met_PctYield	Met_Sum
Alachlor - M1	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N(C)CC(=O)Cl</chem>	0	2D		265.74626	0	0	0	1.87218128	5.01552194		1: CYP2A6; CYP2B6; CYP2D6; CYP2E1; CYP3A4	1	255.1022(75.8); 27.0992(24.2)		
Alachlor - M2	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N(C)CC(=O)Cl</chem>	0	2D		225.71982	0	0	0	1.87218128	5.01552194	Alachlor - M1	1: CYP2A6; CYP2B6; CYP2D6; CYP2E1; CYP3A4	1	225.0917(75.8); 27.0887(24.2)	8	6.88770322
Alachlor - M3	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N(C)CC(=O)Cl</chem>	0	2D		265.7727	0	0	0	0	28.63906463		1: CYP3A4	1	285.1127(75.8); 87.1097(24.2)	32	28.63906463
Alachlor - M4	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N(C)CC(=O)Cl</chem>	0	2D		253.73032	0	0	0	0	30.33683833		1: CYP3A4	1	253.0866(75.8); 55.0836(24.2)	34	30.33683833
Alachlor - M5	<chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N(C)CC(=O)Cl</chem>	0	2D		265.7727	0	0	0	0	23.66919485		1: CYP2E1; CYP3A4	1	285.1127(75.8); 87.1097(24.2)	26	23.66919485



- GLORY (代謝部位は FAME 2 による)



Structure	Rank	Priority_score	Reaction_type
 <chem>CCC1=CC=CC(CC)=C1N(C(CCl)=O)C=O</chem>	1	4.27	oxidative ether cleavage to one alcohol and one aldehyde/ketone
 <chem>CCC1=CC=CC(CC)=C1N(C(CCl)=O)COCO</chem>	1	4.27	aliphatic hydroxylation
 <chem>CCC1=CC=CC(CC)=C1N(C(CCl)=O)CO</chem>	1	4.27	oxidative ether cleavage to one alcohol and one aldehyde/ketone

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

*In silico*予測手法の高度化とNew Approach Methodologyの活用に基づく化学物質の
統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

令和3年度 分担研究報告書

AOPに基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究

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

研究要旨

これまでの研究では、反復投与毒性、生殖発生毒性への *in silico* 手法の適用に関して、機序に基づくリードアクロスの適用を目指して、データベースの構築、カテゴリーの構築、有害性発現経路（AOP）の開発を行ってきたが、本研究では機序に基づくリードアクロスの信頼性の向上へ向けて、AOP キーイベント等のデータを評価目的に適合するよう選択し、リスク評価に適用する場合のケーススタディを実施し、AOPアプローチの優位性を検証することを目的とした。令和4年5月20日3年度は、AOPに基づく生殖発生毒性の予測系構築に関して、既存化学物質点検結果あるいは文献情報等による生殖発生毒性エンドポイントを基にしたヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）結合阻害のAOPを用いてケーススタディを行い、具体例を基にリスク予測におけるAOPに基づくアプローチの有用性と課題を検証した。その結果、アッセイ結果を経路に関連付けることができるデータモデルでAOPの枠組みを拡張し、さらなるデータおよび知識をレビューすることにより、AOPを安全性評価の改善に使用できる3つのシナリオを検証し

A. 研究目的

現在、数多くの化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、それら化学物質のリスク管理は世界的な課題となっている。化学物質の規制に関わる国際機関や諸外国の規制当局は、リスク評価の迅速化・効率化のために、*in silico* 予測手法の利用促進

を図っており、医薬品不純物の遺伝毒性評価における行政利用として、ICH M7 ガイドラインの中で定量的構造活性相関（QSAR）が利用されるようになった。しかし現状では、遺伝毒性以外の毒性予測におけるリスク管理へのQSARの利用は極め

て限定的であると言わざるを得ない。これまでの研究では、反復投与毒性、生殖発生毒性への *in silico* 手法の適用に関して、機序に基づくリードアクロスの適用を目指して、大規模毒性データベースの構築、カテゴリーの構築、有害性発現経路（AOP）の開発を行ってきた。そこで令和4年5月20日3年度は、機序に基づくリードアクロスの信頼性の向上へ向けて、AOP キーイベント等のデータを評価目的に適合するよう選択し、組合せによりリスク評価に適用する場合のケーススタディを実施することにより、AOP アプローチの優位性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

化学物質安全性評価における行政的意思決定支援に AOP が使用される例はほとんどないことから、先行研究で開発した発達毒性に関連するヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）結合阻害の AOP を用いて、いくつかの事例研究を実施し、生殖発生毒性（DART）エンドポイントに対する AOP が意思決定をどのように強化できるかを検証した。用いた事例は以下の通りである。

Case 1：特定の化合物の評価に妥当なデータのレビュー

Case 2：機序に関する仮説を裏付ける試験系の優先順位付け

Case 3：新規物質などを含む類似化合物のレビューデータの活用

これらの実証を可能にするために、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）経路に関連し得るアッセイを特定し、適切な KE に関連付けた。各アッセイについて、被験化合物の生物活性データを整理した。構造お

よび生物活性データは標準化を行った。

（倫理面への配慮）本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

データの整理

Derek Nexus および文献調査から得られた知識を用いて、AOP に関連する 6つのアッセイと 1つの Derek アラートが特定された。関連するアッセイ測定を通して、アッセイとキーイベント（KE）を関連付けた（図 1）。アッセイにより複数の KE が測定される可能性があるため、1つのアッセイから複数の KE のデータが得られる場合がある。得られた唯一の非有害データは、分子開始イベント（MIE）を測定するアッセイのものであった。中軸骨格異常の有害性発現を催奇形性、発生毒性および DART の親エンドポイントと関連づけることで、*in vivo* 胚・胎児発生（EFD：traditional embryofetal development studies）試験、*in vivo* スクリーニング試験（OECD TG421 および TG422）、および生物学的複雑性が異なる 4 種類の代替発生毒性試験（マイクロマス、全胚培養、胚性幹細胞およびゼブラフィッシュ）を含む追加アッセイを関連づけることが可能となった。さらに、*in silico* Derek Nexus アラート A060「短鎖カルボン酸または前駆体」は催奇形性の KE に関連付けた。

表 1 に、整理したデータセットの構成を示す。各データセットが関連付けられた KE、および各データセットに使用されている分類方法は以下のように行った。

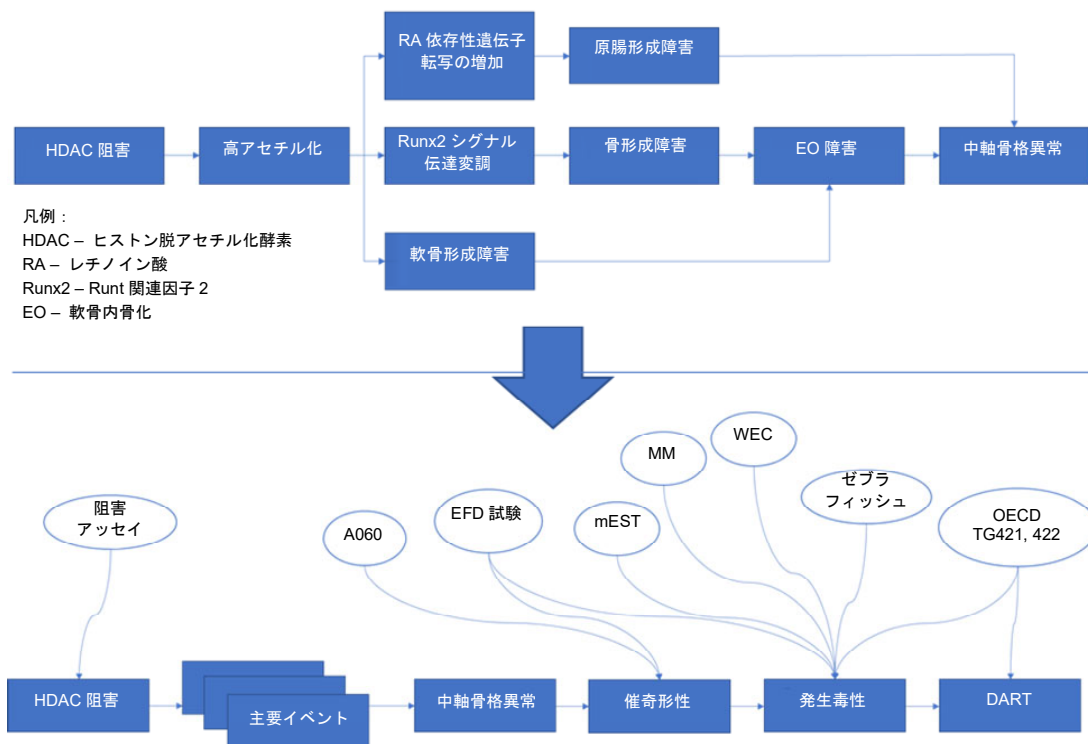


図 1：アッセイを HDAC 経路における関連 KE と関連付けるプロセス阻害アッセイ：

HDAC 阻害アッセイ、A060：Derek Nexus アラート「短鎖カルボン酸または前駆体」、EFD：従来の胚・胎児発生試験、mEST：マウス胚性幹細胞アッセイ、MM：マイクロマスアッセイ、WEC：全胚培養アッセイ、ゼブラフィッシュ：ゼブラフィッシュアッセイ、OECD TG421 および 422：OECD TG421 および 422 ガイドラインアッセイ。

表 1：AOP と関連付けられたアッセイデータセット

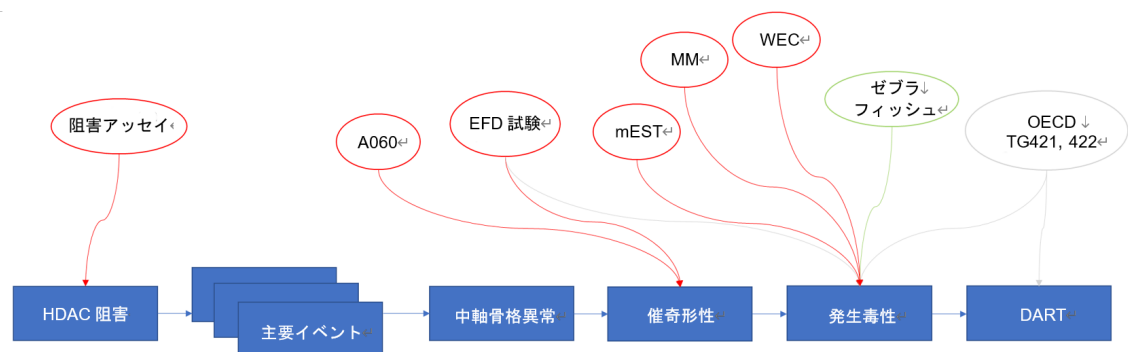
データセット	分類方法	測定した KE	試験数	活性あり	活性なし	不確定
HDAC 阻害*	Lhasa による導出	HDAC 阻害	16350	15030	1320	
Lhasa マスター-DART	Lhasa による導出	催奇形性	1307	820	416	71
Lhasa マスター-DART	Lhasa による導出	発生毒性	997	144	567	286
EST	著者による導出	発生毒性	44	27	17	
EST	Lhasa による導出	発生毒性	23	14	2	7
WEC	Lhasa による導出	発生毒性	21	11	3	7
MM	Lhasa による導出	発生毒性	23	13	7	3
ゼブラフィッシュ	EPA による導出	発生毒性	1038	199	839	
NIHS データセット TG421、422	Lhasa による導出	発生毒性	395	150	245	
NIHS データセット TG421、422	Lhasa による導出	生殖発生毒性	395	181	214	

*データを AOP に関連付けるために、多くの HDAC アイソフォームのデータをグループ化した。

- HDAC 阻害データセットは 16000 を超える試験を含む最大のデータセットであった。この経路について記述された MIE は HDAC アイソフォームに特異的ではないため、このデータセットには複数の HDAC アイソフォームのデータが含まれる。マウスのノックアウト試験ではアイソフォーム間の機能的冗長性が実証されており、HDAC 阻害剤が複数のアイソフォームを標的とする可能性があるため、AOP において特定のアイソフォームの経路を明らかにすることは困難であった [Ververis ら 2013, Haberland ら 2009]。
 - Lhasa の社内マスターデータセットに含まれる EFD 試験には、催奇形性および発生毒性の両方のエンドポイントに関するデータが含まれる。このデータセットにはげっ歯類および非げっ歯類の毒性試験が含まれており、各試験にはエキスパート・コールが割り当てられている。
 - EST、WEC および MM に関するデータは公表されたバリデーション試験から得られたものであり、EST の追加データは追加公表により提供された [Genschow ら 2002, Genschow ら 2004, Spielmann ら 2004, Piersma ら 2004, Paquette ら 2008]。これらの試験では、いくつかの化合物の胚毒性を測定し、(エンドポイントの広範な性質に起因して) 発生毒性と関連付けた。
 - 同様に、ゼブラフィッシュのデータセットには、胚毒性について EPA が割り当てた活性コールが含まれている。
 - NIHS TG421 および 422 のデータは、Lhasa Limited が行ったデータへのエンドポイントの割り当てに基づいて、発生毒性または DART の KE に割り当てた。
- AOP の主要イベントは測定可能な事象であるが、この事例では、この経路の多くの KE について頑健なアッセイやデータセットが特定されなかった。多くの KE に対するアッセイは、開発初期段階にあるかまだ検証されておらず、これから開発が始まる可能性があるに過ぎない。状況が進むにつれて、KE の測定データがより容易に利用できるようになる可能性がある。これには、遺伝子発現に関連する主要イベント (RA 依存性の遺伝子転写増加、Runx2 シグナル伝達変調 KE など) のオミクスデータ、並びに骨形成および軟骨形成障害 KE に関する組織分化試験が含まれる可能性がある。AOP により、新しく利用可能になるアッセイの解釈および試験戦略更新の支援のためのアプローチが提供されることから、この方法でデータを AOP に継続的にマッピングすることにより、2 つの利点が得られると考えられる。
- 異種データを 1 つのデータモデルに統合することができ、機序の観点からデータを探し出すことができる。
 - この方法は、主要データのギャップを明示するため、関連アッセイの開発または既存アッセイによる新規データの生成を通して、これらのギャップに将来対処することができる。
- **Case 1** : 特定の化合物に関連するデータのレビュー
- バルプロ酸はヒト催奇形性物質として知られており、広範に研究されているため、データが豊富な化合物であるといえる。このようなデータが豊富なケースでは、分析結果を AOP の周辺で構成することができ

るため、評価者は、KE に対する化合物の活性を検討し、続いて AOP 全体に対する活性を検討することができる。バルプロ酸のアッセイデータがどのように HDAC 経路に関連付けられるか、および KE の活性を分類し、AOP の全体的な予測を行うためにデータをどのように分解できるかを図 2

に示す。この事例では、KE ごとに活性コールドを割り当てる保守的な方法が採用された。したがって、KE と関連付けられたアッセイのいずれかのアッセイ結果が陽性であった場合、KE を引き起こす化合物の活性を「陽性」と定義した。



1) 評価					2) KEに関するエビデンスを確立		3) 経路に関するエビデンスを確立
懸念化合物	評価したAOP	主要イベント (KE)	エビデンス	結果	系の複雑性	KEの結果	経路の結果
バルプロ酸	発生毒性を引き起こすHDAC阻害	HDAC阻害	阻害アッセイ (HDAC1および2)	陽性	In vitro	陽性	陽性
			阻害アッセイ (HDAC4~7および9)	陰性	In vitro		
			Derek Nexus アラート 60	陽性	In silico		
		催奇形性	EFD試験*	陽性	In vivo	陽性	
			mEST	陽性	In vitro		
			WEC	陽性	In vitro		
			MMアッセイ	陽性	In vitro		
		発生毒性	ゼブラフィッシュ	陰性	In vivo	陽性	
			OECD TG421	データなし	In vivo		
			OECD TG422	データなし	In vivo		

図 2 : KE および AOP レベルでのバルプロ酸に関するデータの分析 :

*バルプロ酸に関連する EFD 試験データは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルにおけるバルプロ酸の催奇形性を特定する様々な試験の要約から構成される

全体として、データが利用可能な各 KE について、本 AOP 全体に渡るバルプロ酸の一貫した活性を示す十分なデータがあった。

利用可能なデータにより、バルプロ酸が HDAC1 および HDAC2 の両方を阻害することが示されている。HDAC AOP は、多

くの HDAC アイソフォーム (HDAC1 および 2 を含む) の摂動によって催奇形性が生じる可能性があり、そのため HDAC 阻害がバルプロ酸の発生毒性の原因となることを示している。

関連する 2 つのエビデンスにより、バルプロ酸が催奇形性を引き起こす可能性が

あることが示されている。第一に、*in vivo* 胚・胎児毒性試験のデータは、バルプロ酸がヒト催奇形性物質であり、バルプロ酸に関連する一般的な奇形には神経管欠損、四肢欠損、骨格異常、心臓奇形、二分脊椎、および頭蓋顔面欠損が含まれることを示している。次に、催奇形性のエンドポイントを予測する Derek Nexus アラート (A060 : 短鎖カルボン酸または前駆体) がバルプロ酸に対して出されている。しかし、このアラートは上記の *in vivo* 毒性データについて訓練されているため、情報はこの毒性データと無関係ではない。注射付けされた構造アラートは、データが豊富な化合物をレビューする際に、評価者にさらなる信頼をもたらす可能性がある。この AOP に対する *in silico* アラートの関連性は、どのように異種データや代替データを AOP の枠組みに統合できるかを強調している。

また、催奇形性を含む、より広範なエンドポイントである、発生毒性の KE に関連するバルプロ酸のデータが存在する。このデータは、マイクロマスアッセイ、全胚培養アッセイ、胚性幹細胞試験、ゼブラフィッシュアッセイといった複数の代替モデルから得られたものである。5 つのモデルのうち 4 つから得られたデータは、バルプロ酸が潜在的な発生毒性物質であることを示している。したがって、KE の総合的なコールを陽性として間違いない。ゼブラフィッシュの陰性結果は、このモデルがバルプロ酸の発生毒性評価に適していないこと、あるいは生データの解釈を見直す必要があることを示唆している可能性がある。バルプロ酸が催奇形性物質であることを実証した別のゼブラフィッシュの研究が文献中に

存在する [Lee ら 2013]。これは、試験デザインまたは結果の解釈が関連要因であり、AOP モデルへの試験データの更なる統合が有益であることを示している。これらのことから、バルプロ酸は HDAC 阻害を通じて発生毒性を引き起こす可能性があると予測することができる。この主張は、胚・胎児毒性データが AOP の結果 (骨格異常など) と一致していることから裏付けられる。しかし、この場合 AOP はバルプロ酸を用いた試験のデータについて訓練されているため、一致は (したがって結論も) 驚くに値しない。しかし、この例は、活性に対して AOP を用いて論理的で透明性の高い機序に関する仮説と予測を与えるために、複数の情報源からデータをまとめる際に、このアプローチが有用であることを示している。この Case では、解釈を支援するために図 2 のデータの一部をグループ化した。HDAC 阻害アッセイはその活性によりグループ分けされている。EFD 試験では複数の動物種 (ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサル) からの総合的な結果が得られており、これらの結果から、バルプロ酸が催奇形性を有することが示されている。様々な種の EFD 試験の結果が一致しない場合は、より詳細な情報が必要となることがある。

➤ **Case 2 :** 機序に関する仮説 1 に基づくアッセイ選択の優先順位付け

毒性データと機序に関するデータの両方を AOP と関連付けることは、毒性を引き起こす化合物について懸念される機序を示すのに役立つ。この潜在的な使用事例を示すために、提供された TG422 および 421

のデータセットの化合物について HDAC 阻害データを検索した。2-エチル酪酸が、NIHS 提供データセットと HDAC 阻害データセットの両方に存在することが判明した (図 3)。TG422 の試験では 250 mg/kg/日 で投与した場合に生児出生が減少し、「50 mg/kg/日 で分娩時の状態が不良 (母体毒性の徴候の可能性あり)」となり、2-エチル

酪酸が潜在的な発生毒性物質として同定された。TG422 試験におけるこうした陽性の所見は、本化合物が DART を引き起こす可能性があることを示している。HDAC 阻害についての利用可能なデータは、2-エチル酪酸が HDAC 阻害剤ではないことを示した、詳細不明のアイソフォームを用いた 1 件の試験に限られている。



図 3 : HDAC 阻害 AOP に関連付けられた 2-エチル酪酸のデータ

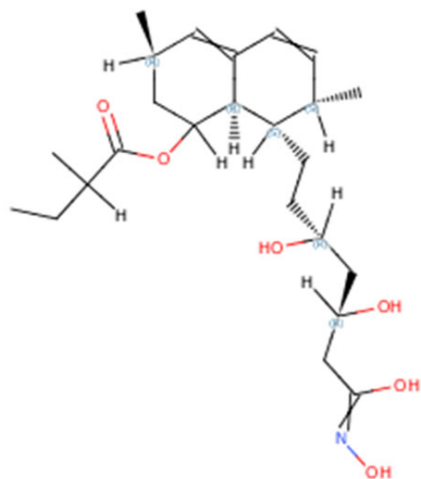
このデータによれば HDAC 結合を介して起こる可能性は低いものの、この場合、評価者は 2-エチル酪酸が DART を引き起こす可能性がある」と述べる事ができる。したがって、観察された毒性は、別の標的を介した別の機序または HDAC 阻害剤への化合物の代謝によって発生している可能性がある。しかしその代わりに、評価者は 2-エチル酪酸が HDAC 阻害を引き起こす可能性について最終的な評価に至っていないと判断することもできる。したがって、この機序に関する仮説を最終的に棄却するためには、さらなる HDAC 阻害試験が必要であり、それは QSAR 試験の形態をとると考えられる。AOP を参照することで、複数

の HDAC アイソフォームを評価する必要性が示されるとともに、リスク評価者を当該経路に関連する他の分析法 (マイクロマアッセイや EFD 試験など) へ誘導することができる。

➤ **Case 3 : 新規物質における類似化合物のレビューデータ**

この Case では、リードアクロスを用いて意思決定を支援するために、類似化合物のデータをどのように利用できるかを示している。利用可能なデータを調査した結果、いくつかのスタチンが HDAC 阻害能を有することが確認された。このうちの 1 つの化合物 (A) は HDAC を阻害することが示

されているが、発生毒性を示すデータはない (図 4)。



(A)

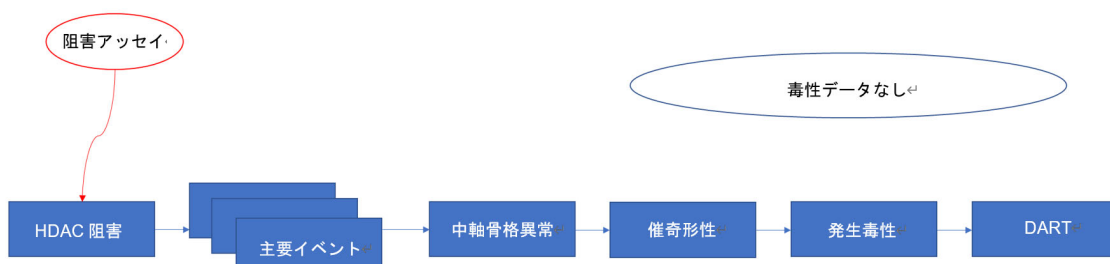


図 4 : スタチンに関する HDAC AOP 関連データ

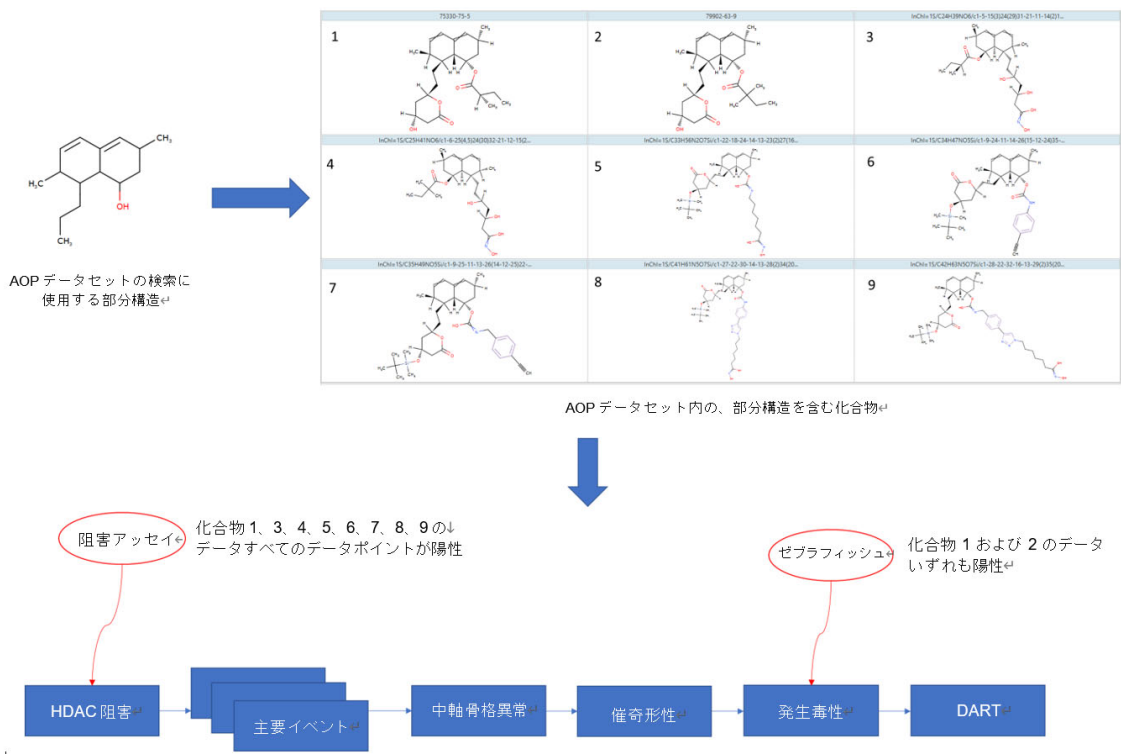


図 5 : AOP データセット内で特定された関連部分構造を含む化合物

(上記の化合物(A)を除く) これらの化合物のデータは、HDAC AOP 上に示されている。

このような状況では、毒性データが存在する類似体を用いたリードアクロスにより、化合物の潜在的な毒性を評価することができる。スタチンに共通の部分構造を用いた、HDAC AOP アッセイデータベースの部分構造検索により、9 つの関連化合物が同定された (図 5)。

図 5 のスタチンのうち 1 つを除くすべてについて HDAC 阻害データが得られており、これらの化合物が様々な HDAC を阻害できることが示された。2 つの化合物についてゼブラフィッシュアッセイのデータが得られており、いずれも発生毒性を引き起こすことが示された。この代替アッセイデータは、これらの化合物が既知の MIE を介した有害性発現を引き起こす潜在的リスクを有することを示している。したがっ

て、類似化合物のデータに基づき、図 5 に示す化合物を HDAC 阻害剤および潜在的な発生毒性物質とみなすことができる。これらの詳細は、この化合物の催奇形性や作用機序を確定するものではないが、この結果はこの化合物に関連したリスクの可能性を示しており、これは追加試験により確定または否定することが可能である。スタチンは、コレステロールの生合成に関与する酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害するように設計されている [Sirtori 2014]。したがって、ゼブラフィッシュモデルで観察された発生毒性の原因が HMG-CoA 還元酵素の阻害である可能性があり、推定 AOP としてこれを調査する必要がある。

D. 考察

AOPは随時更新される生きた文書であり、新たなエビデンスが得られる度に修正することができる。アッセイ結果を経路に関連付けることができるデータモデルでAOPの枠組みを拡張することにより、更なる情報の集中化がもたらされた。これは関連情報を求めるリスク評価者にとって有用である可能性がある。今回収集されたデータおよび知識をレビューすることにより、AOPを安全性評価の改善に使用できる3つのシナリオを特定することができた。

Case 1では、催奇形物質として知られているバルプロ酸を例として取り上げ、HDAC阻害に始まる各KEに関連する試験法でも陽性結果を得ることができ、結果として当該AOPを経由した発生毒性を示すことを確認できた。Case 2では、TG422試験が陽性であり且つ、HDAC阻害DBに含まれる2-エチル酪酸を例として検証が行われたが、HDAC阻害活性のデータが限定的であり、仮説の裏付けに必要な試験経験を選別することが可能となった。Case 3では、いくつかの類似構造にHDAC阻害活性があるが発生毒性データの無いスタチン類似構造化合物についての検討が行われ、そのうちの2つの化合物におけるゼブラフィッシュ陽性結果からHDAC阻害による潜在的な発生毒性物質群の推定が可能となった。

今回、検証した事例研究では、単一のHDAC阻害AOPを用いて各種試験法のデータを評価することに焦点を当てた。AOPネットワークにおける各試験法の結果を利用することで、評価者が更なる仮説を立て、追加の試験戦略実施できるようになることや、更なる試験法の結果と解釈を関連付けることにより、複数の試験法からなら総合的な試験戦略の開発に役立つことも明らか

となった。

E. 結論

これまでの研究では、反復投与毒性、生殖発生毒性への*in silico*手法の適用に関して、機序に基づくリードアクロスの適用を目指して、データベースの構築、カテゴリーの構築、有害性発現経路(AOP)の開発を行ってきたが、令和4年5月20日3年度は機序に基づくリードアクロスの信頼性の向上へ向けて、AOPキーイベント等のデータを評価目的に適合するよう選択し、リスク評価に適用する場合のケーススタディを実施することにより、AOPアプローチの優位性を検証することを目的とした。AOPに基づく生殖発生毒性の予測系構築に関して、今年度は、既存化学物質点検結果あるいは文献情報等による生殖発生毒性エンドポイントを基にしたヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)結合阻害のAOPを用いてケーススタディを行い、具体例を基にリスク予測におけるAOPに基づくアプローチの有用性と課題を検証した。その結果、アッセイ結果を経路に関連付けることができるデータモデルでAOPの枠組みを拡張し、さらなるデータおよび知識をレビューすることにより、AOPを安全性評価の改善に使用できる3つのシナリオを検証した。

(参考文献)

1. Ververis K., Hiong A., Karagiannis T.C., Licciardi P. V, Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents., *Biologics*. 7 (2013) 47–60. doi:10.2147/BTT.S29965.
2. Haberland M., Montgomery R.L., Olson E.N., The many roles of histone

- deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy., *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 32–42. doi:10.1038/nrg2485.
3. Genschow E., Spielmann H., Scholz G., Seiler A., Brown N., Piersma A., Brady M., Clemann N., Huuskonen H., Paillard F., Bremer S., Becker K., The ECVAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *European Centre for the Validation of Alternative Methods.*, *Altern. Lab. Anim.* 30 (2002) 151–76. doi:10.1177/026119290203000204.
 4. Genschow E., Spielmann H., Scholz G., Pohl I., Seiler A., Clemann N., Bremer S., Becker K., Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests., *Altern. Lab. Anim.* 32 (2004) 209–44. doi:10.1177/026119290403200305.
 5. Spielmann H., Genschow E., Brown N.A., Piersma A.H., Verhoef A., Spanjersberg M.Q.I., Huuskonen H., Paillard F., Seiler A., Validation of the rat limb bud micromass test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests., *Altern. Lab. Anim.* 32 (2004) 245–74. doi:10.1177/026119290403200306.
 6. Piersma A.H., Genschow E., Verhoef A., Spanjersberg M.Q.I., Brown N.A., Brady M., Burns A., Clemann N., Seiler A., Spielmann H., Validation of the postimplantation rat whole-embryo culture test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests., *Altern. Lab. Anim.* 32 (2004) 275–307. doi:10.1177/026119290403200307.
 7. Paquette J.A., Kumpf S.W., Streck R.D., Thomson J.J., Chapin R.E., Stedman D.B., Assessment of the Embryonic Stem Cell Test and application and use in the pharmaceutical industry., *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 83 (2008) 104–11. doi:10.1002/bdrb.20148.
 8. Lee S.H., Kang J.W., Lin T., Lee J.E., Jin D. II, Teratogenic Potential of Antiepileptic Drugs in the Zebrafish Model, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 1–6. doi:10.1155/2013/726478.
 9. Sirtori C.R., The pharmacology of statins., *Pharmacol. Res.* 88 (2014) 3–11. doi:10.1016/j.phrs.2014.03.002.
- F. 研究発表**
1. 論文発表
 1. Yamazoe Y, Yamada T, Hirose A, Murayama N. Deciphering Key Interactions of Ligands with CYP3A4-Template* system. *Food Safety (Tokyo)* 9(1), 10-21, 2021.
 2. Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, Hirose A, Yamada T. A physiologically based kinetic modeling of ethyl tert-butyl ether in humans—An illustrative application of quantitative structure-property relationship and Monte Carlo simulation. *J. Toxicol. Sci.* 47, 77-87, 2022.
 3. Yamada T, Kawamura T, Maruyama T, Kurimoto M, Yamamoto H, Katsutani N,

- Hirose A. Quantitative structure-activity relationship and a category approach to support algal toxicity assessment of human pharmaceuticals. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**, 195-204, 2021.
4. Yamada T, Miura M, Kawamura T, Ushida K, Inoue K, Kuwagata M, Katsutani N, Hirose A. Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J. Toxicol. Sci.* **46**, 531-538, 2021.
 5. Tanabe S, Hirose A., Yamada T. Adverse Outcome Pathway on histone deacetylase inhibition leading to testicular atrophy. *OECD Series on Adverse Outcome Pathways No. 17*.
 6. Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Girard P, Halamoda-Kenzaoui B, Hinton D, Hirose A., Hoeverler A, Honma M, Hugas M, Ishida S, Kass GE, Kojima H, Krefting I, Liachenko S, Liu Y, Masters S, Marx U, McCarthy T, Mercer T, Patri A, Pelaez C, Pirmohamed M, Platz S, Ribeiro AJ, Rodricks JV, Rusyn I, Salek RM, Schoonjans R, Silva P, Svendsen CN, Sumner S, Sung K, Tagle D, Tong L, Tong W, Eijnden-van-Raaij JVD, Vary N, Wang T, Waterton J, Wang M, Wen H, Wishart D, Yuan Y, Slikker W Jr. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **247**(1), 1-75, 2022.
 7. Matsumoto M, Takano M, Takabe M, Yamaguchi N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Hirose A. Initial hazard assessment of ethyl(dimethyl)(tetradecyl)ammonium ethyl sulfate: Genotoxicity tests and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **122**, 104914, 2021.
 8. Matsumoto M, Fujii S, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Inoue K, Hirose A. Repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening of polyoxymethylene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**(4), 103-116, 2021.
 9. Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Hirose A., Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VII). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* **139**, 71-78, 2021.
 10. Iso T, Natsume M, Murata Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of MutaTM Mouse. *Fundam. Toxicol. Sci.* **9**(2), 31-36, 2022.
2. 学会発表
 1. 広瀬明彦：行政利用を目的とした定量的有害性評価手法の開発、第 48 回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 2. 田邊 思帆里、Sabina QUADER、小野 竜一、Horacio CABRAL、青柳 一彦、広瀬明彦、Ed PERKINS、横崎 宏、

- 佐々木 博己：慢性的活性酸素種からヒト治療耐性胃がんへ至る有害性発現経路の開発及び分子ネットワーク解析、第 48 回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
3. 井上 薫, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 川島 明, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦：リスク評価の優先順位付けのための発がん性定量評価における各種毒性指標の適用について、第 48 回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 4. 川村 智子, 山田 隆志, 辻井 伸治, 大畑 秀雄, 勝谷 成男, 広瀬 明彦：リードアクロス評価のためのメカニズムに基づく血液毒性カテゴリーの開発と精緻化ー統合毒性データベースを利用した事例ー、第 48 回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 5. 山田 隆志, 栗本 雅之, 広瀬 明彦, Chihae YANG, James F RATHMAN：化学物質の非発がんエンドポイントの TTC アプローチのための新しいデータベースの開発、第 48 回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 6. 川島 明, 井上 薫, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦：ラットを用いた 3-メチルペンタン、イソオクタン、イソノナンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験、第 48 回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 7. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara：Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催), Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)
 8. 広瀬明彦：ニトロソアミン曝露許容値設定の考え方、ICH M7/QSAR ワークショップ（日本環境変異原ゲノム学会 第 50 回記念大会）2021.10.29、Web 開催）
- G. 知的所有権の出願・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

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

*In silico*予測手法の高度化とNew Approach Methodologyの活用に基づく化学物質の
統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

令和3年度 分担研究報告書

In vitro–*in vivo*外挿（IVIVE）用の生理学的動力学（PBK）モデル構築のための
基盤整備に関する研究

研究分担者	松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	主任研究官
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	協力研究員
研究協力者	馬野 高昭	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	磯 貴子	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	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
研究協力者	広瀬 望	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

欧米で活発に検討されている *in vitro*–*in vivo* 外挿（IVIVE）の実用性の評価について検討した。この評価には多岐に亘る検討が必要なため、本年度は、1) IVIVE に使用される PBK モデルの解析とモデルを用いた IVIVE のトレース、2) IVIVE に使用される PBK モデルのモデルパラメータに関するデータベースや推定ツールの調査、3) 予備的な IVIVE の試行について検討した。調査論文の内容を基に R 言語で構築した各 PBK モデルは、論文のパラメータ値を用いた場合、血中濃度を適切に推定できることを確認した。確認した PBK モデルを用い、論文記載の数値で投与量と血中濃度の関係を計算し、IVIVE を行った結果、*in vitro* アッセイからの予測無毒性量は *in vivo* の発生毒性試験の NOAEL とほぼ同じことを確認した。次に、PBK モデルに必須のパラメータと IVIVE に必要なパラメータ (f_{up} 、 R_{app} 、 CL_{int} 等) について、フリーでアクセス可能なオンラインデータベースと推定ツールについて、既報文献値と比較した結果、 f_{up} と CL_{int} の値はかなりバラつく一方、 R_{app} 値にはあまりバラツキがなかった。さらに、R 言語で構築した PBK モデルと、調査したオンラインデータベースおよび推定ツールから得たパラメータ値を用いて、8 物質の 15 *in vitro* アッセイの結果を IVIVE に供した。その結果 8 物質中の 4 物質の *in vitro* アッセイからの予測影響量の中央値は、*in vivo* 試験の LEL の中央値の 1/10~10 倍の範囲内に入った。また、予測影響量は、 f_{up} と $f_{up, in vitro}$ に大きな感度を有した。これらの結果から、現状で IVIVE の試行を行うことは可能と判断した。

A. 研究目的

現在、数多くの化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、それら物質のリスク管理は世界的な課題となっている。化学物質の規制に関わる国際機関や諸外国の規制当局は、リスク評価の迅速化・効率化のために、*in silico* 予測手法等の利用促進を図っているが、ヒト健康リスク評価における利用は限定的である。定量的構造活性相関 (QSAR) は、ICH M7 ガイドラインに基づいた医薬品不純物の遺伝毒性評価において利用されるようになったが、化学物質規制での使用の拡大ためには、高品質のデータセットの使用、モデルの予測精度の更なる向上、予測結果の信頼性評価法等、手法の高度化が求められている。

また、動物福祉は国際的に大きな流れとなっており、段階的な動物試験の削減は不可避の情勢となっている。New Approach Methodology (NAM) は、有害性評価の文脈において、*toxicokinetics* や *toxicodynamics* を包含する動物を用いない *in silico*、*in vitro* 等のアプローチで、それらを統合して利用することにより、ヒト健康リスク評価の信頼性を向上させると期待されている。諸外国の規制当局は、新しい動物試験要求を最小限に抑え、NAM の活用を促進するビジョンやロードマップを近年相次いで公表している。一方で、NAM データを活用した有害性評価の行政的受け入れは未だ限られており、ケーススタディによって、その信頼性や規制上のニーズを満たすことに貢献できるかを概念実証することが求められる。さらに、その受け入れを促進するために、NAM の知識をリスク評価の関係者が共有することが必要である。

本研究では、化学物質の体内動態推定に使用される生理学的動力学 (PBK) モデルを用いた *in vitro*–*in vivo* 外挿 (IVIVE) の検討が欧米において活発であることを考慮し、この手法の実用性の評価について検討する。この IVIVE 法には、*in vitro* アッセイ試験液中のフリー体濃度と等価な血中濃度の推定、PBK モデルによる血中濃度と投与量の関係の推定、さらに予測影響量の推定が含まれ、実用性の評価については多岐にわたる検討が必要である。

本年度は、以下の項目について検討した。

- IVIVE で使用される PBK モデルの解析とモデルを用いた IVIVE のトレース
- IVIVE で使用される PBK モデルに必要なモデルパラメータ値のオンラインのデータベースや推定ツール等の調査
- IVIVE の予備的な試行

B. 研究方法

B.1. IVIVE で使用される PBK モデルの解析とモデルを用いた IVIVE のトレース

発生毒性や内分泌かく乱影響を対象として、IVIVE を検討している既存研究を調査し、使用された PBK モデルが詳細に記載され、IVIVE の過程がトレース可能と判断される研究論文を選択し、使用された PBK モデルとそれらのモデルパラメータ (組織/血液分配係数、血漿蛋白非結合率 (f_{up})、Caco-2 細胞膜透過速度 (R_{app}) および代謝クリアランス (V_{max} と K_m あるいは CL_{int}) および *in vitro* アッセイ液中での蛋白非結合率 ($f_{up, in vitro}$)) について解析し、R 言語でモデルを構築し、計算を行い、論文に記載された情報と比較することでモデルの予測再現性を確認し

た。確認された PBK モデルを用いて経口投与量と血中濃度の関係を計算等することにより、調査した研究論文で実施された IVIVE 過程のトレースを行った。

B.2. PBKモデルパラメータ値のデータベースおよび推定ツールの調査

PBK モデル計算に必須のモデルパラメータおよび IVIVE のキーである投与量-血中濃度関係の確立に必要なパラメータ (f_{up} 、 R_{app} 、 CL_{int} および $f_{up, in vitro}$) について、フリーでアクセス可能なオンラインデータベースおよび推定ツールを含め、推定手法について既報論文を調査し、各予測手法を解析し、得られる値を論文既報値等と比較することにより、それらの有用性の確認を行った。

B.3. IVIVEの予備的試行

調査した既報研究を参考に内分泌かく乱作用に関する IVIVE を予備的に試行した。試行対象物質には Casey et al. (2018) において *in vivo* のラット子宮肥大試験の影響量 (LEL) がまとめられている 8 物質 (Bisphenol A、17 α -Ethinylestradiol、Genistein、4-Nonyl-phenol、Tamoxifen、17 β -Estradiol、Methoxychlor および *o,p'*-DDT) を選択した。

IVIVE を行う *in vitro* アッセイも Casey et al. (2018) を参考に、15 アッセイを選択し、AC₅₀ 値を CompTox Chemicals Dashboard から入手した；NVS_NR_bER、NVS_NR_hER、NVS_NR_mERa、OT_ER_ERaERa_0480、OT_ER_ERaERa_1440、OT_ER_ERaERb_0480、OT_ER_ERaERb_1440、OT_ER_ERbERb_0480、OT_ER_ERbERb_1440、OT_ERa_ERa_EREGFP_0120、

OT_ERa_EREGFP_0480、ATG_ERa_TRANS_up、ATG_ERE_CIS_up、Tox21_ERa_BLA_Agonist_ratio、Tox21_ERa_BLA_Antagonist_ratio。各アッセイにおける $f_{up, in vitro}$ は、Armitage et al. (2014) の EQC モデルで、 $\log K_{ow}$ 、 $\log K_{aw}$ 、ウシ胎児血清 (FBS) 含有率等から推定し、等価血中濃度計算に用いた。

Fabian et al. (2019) のラット PBK モデルに腎クリアランスを追加したモデルを R 言語で作成し、経口投与量と血中最高濃度 (C_{max}) の関係を計算するのに使用した。組織/血液分配係数は DeJongh et al. (1997) の定量的構造物性相関 (QPPR) 法で $\log K_{ow}$ 推定し、 f_{up} 、 R_{app} および CL_{int} は上記の調査で利用可能と判断されたデータベースおよびツールから入手した。*In vitro* アッセイで決定された AC₅₀ 値に、経口投与量と血中最高濃度 (C_{max}) の関係を適用して等価な用量を計算し、これらの量を予測影響量とした。

(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. IVIVEに使用されるPBKモデルの解析とモデルを用いたIVIVEのトレース

関連論文も含め 18 報の論文をオンラインで入手し、6 論文が解析に有用と判断し、調査した。表 1 に示すように、これらの 6 論文では、phenol 類、Tebuconazole (抗菌剤)、17 β -Estradiol や Bisphenol A 等のエストロゲン受容体 (ER) アゴニスト、Acetaminophen 等の医薬品を対象に、胚性幹細胞分化、ヒト乳がん培養細胞増殖、ヒト骨肉腫細胞 CALUX、酵母エストロゲンスクリーニング、酵母アンドロゲンス

クリーニング、米国 high-throughput screening programs での 16 の *in vitro* アッセイ (Tox21_ERa_BLA_Agonist_ratio、Tox21_ERa_LUC_BG1_Agonist 等) の結果が IVIVE の対象であった。これらのアッセイから、図 1 に従って外挿された予測影響量 (BMDL_x、LOEL 等) は、ラットでの *in vivo* の発生毒性試験や内分泌かく乱作用に関する試験の NOAEL や BMDL_x と比較され、外挿法が評価され、いずれの研究においても IVIVE による予測影響量は *in vivo* での影響量と概ね同じオーダーであることを示したと報告されている。

各 IVIVE で使用された PBK モデルの対象臓器コンパートメントは様々であった。QSPR 等の *in silico* のモデルパラメータ推定法は、主に組織/血液間の分配係数にのみ適用され、 f_{up} 、 R_{app} 、 CL_{int} は主に *in vitro* 法で決定されていた。論文記載内容に基づいて R 言語で構築した各 PBK モデルは、論文中のパラメータ値を用いた場合、血中濃度を適切に推定することを確認した。例えば、Li et al. (2017) では、PBK モデルのパラメータである f_{ub} 、小腸からの吸収速度定数および肝臓での代謝の V_{max} と K_m について各々 *in vitro* 試験を実施して値を得るとともに、さらに、組織/血液分配係数を f_{ub} 、 pK_a および $\log K_{ow}$ から推定している。R 言語で作成した 6 コンパートメントで構成される PBK モデルでこれらの値を用いて計算した経口投与後 1~5 時間の血中濃度は、1.0~4.3 μM (12.5 mg/kg 投与) および 2.5~11 μM (25 mg/kg 投与) となり、Li et al. (2017) が報告した 1.0~4.4 μM (12.5 mg/kg 投与) および 2.5~10 μM (25 mg/kg 投与) と一致することを確認した。

一致が確認された PBK モデルを用いて、

図 2 に示す IVIVE のフローに従って、Li et al. (2017) で実施された Tebuconazole の IVIVE をトレースした。論文に記載された $f_{up, in vitro}$ 値を用いて等価な Tebuconazole フリー体の血中濃度を計算し、別途 PBK モデルで計算した投与量と血中濃度 (最大濃度 C_{max} を採用) の関係から血中濃度に等価な用量を逆推定した。次に、*in vitro* アッセイで測定された細胞の未分化率と逆推定された用量から RIVM の PROAST を使用して、無毒性量 (BMDL₁₀) を導出した結果、4 種の BMD モデルにより計算された BMDL₁₀ 値は、19.7~23.7 mg/kg/d で、対数尤度と AIC にも大きな差異はなかった。これらの *in vitro* アッセイ結果から導出した BMDL₁₀ 値は、報告されている *in vivo* の発生毒性試験での NOAEL とほぼ同じであり、IVIVE のトレースが適切に行えたことを示した。

C.2. PBKモデルパラメータ値のデータベースおよび推定ツールの調査

Madden et al. (2019) の総説を参考に、アクセス性を考慮して、表 2 のフリーのオンラインデータベースおよびツールについて調査した。

ADMETlab ver.2 は中国の中南大学が公開しているオンラインツールで、 f_{up} 、 R_{app} 等の推定が SMILES の入力により可能である。

CompTox Chemicals Dashboard は米国 EPA が開発、公開している測定値と推定値に関するオンラインデータベースで、基礎物性値 (K_{ow} 、 K_{aw}) に加えて、 f_{up} 、 CL_{int} 等の情報が CAS RN の入力により入手可能である。

DruMAP ver.1.4 は (国研) 医薬基盤研

研究所が開発、公開しているオンラインツールで、 f_{up} 、 CL_{int} 等の推定が SDF ファイルの読み込みにより可能である。

EPI Suite 4.1.1 は米国 EPA が開発、公開している基礎物性値推定用のツールで、PC にインストールして使用する。推定には CAS RN または SMILES の入力が必要である。

pKCSM は Melbourne 大学と Cambridge 大学が共同で開発、公開しているオンラインツールで、 f_{up} 、 R_{app} 等の推定が SMILES の入力により可能である。

IVIVE の予備的な試行を行う 8 物質の f_{up} を、ADMETlab、CompTox Chemicals Dashboard、DruMAP および pKCSM から得て、Zhang et al. (2018) および Casey et al. (2018) の測定値と比較したところ、各 f_{up} 値にはかなりのバラツキがあり、例えば、 17α -Ethinylestradiol では値は 0.01~0.47、Genistein では 0.02~0.30 の範囲であった。

同様に、 R_{app} の対数値 ($\log R_{app}$) を、admetSAR (中国、華東理工大学で開発された ADME 関連パラメータのオンライン推計ツール)、ADMETlab および pKCSM から得て、Zhang et al. (2018) の測定値および Hou et al. (2004) の方法での推定値と比較したところ、結果、各 $\log R_{app}$ 値には、あまりバラツキがなく、極性表面積 (PSA) から簡単に推定が可能な Hou et al. (2004) の方法で十分と思われた。

CL_{int} については、CompTox Chemicals Dashboard および DruMAP から値を得て、Zhang et al. (2018)、Casey et al. (2018) および Fabian et al. (2019) の測定値と比較したところ、各値にバラツキがあり、例えば、Bisphenol A では値は 0.16~13.4 L/h、Genistein では 0.15~9.95 L/h の範囲であっ

た。

C.3. IVIVEの予備的試行

試行の結果、図 2 に示すように、8 物質中の 4 物質 (Genistein、4-Nonylphenol、 17β -Estradiol、Methoxychlor) では、15 の *in vitro* アッセイから予測された影響量の中央値は、*in vivo* 試験の LEL の中央値の 1/10~10 倍の範囲内の値であった。

残りの 4 物質では、 17α -Ethinylestradiol で 2 桁以上の差異が、Bisphenol A、Tamoxifen および *o,p'*-DDT で 1 桁以上の差異が予測影響量の中央値と *in vivo* 試験の LEL の中央値の間に見られた。

予測影響量に影響及ぼす f_{up} 、 R_{app} 、 CL_{int} および $f_{up,in vitro}$ について感度解析を行った結果、 f_{up} および $f_{up,in vitro}$ に大きな感度を示し、 f_{up} の増加に伴い予測影響量は低下し、逆に $f_{up,in vitro}$ の増加に伴い予測影響量は高くなった。

D. 考察

米国の Wetmore et al. (2013)、Pearce et al. (2017)、Wambaugh et al. (2018)、Casey et al. (2018) 等の IVIVE 研究では、high-throughput screening programs データの活用を前提としたシンプルなモデルによる迅速な評価が基本であるのに対して、欧州の Strikwold et al. (2013、2017)、Li et al. (2017)、Zhang et al. (2018) 等の研究ではベンチマーク用量モデルによる濃度 (量) - 反応評価を含む丁寧な検討が行われており、IVIVE の評価が定まっていない現時点では、欧州の研究者が行ったような解析がより参考になると思われる。

In vitro アッセイの濃度と等価な血中濃度を計算するには、 $f_{up,in vitro}$ 値が必要であるが、適切な推定法がない。Armitage et al.

(2014) の EQC モデルは、Level I の分配平衡モデルであり、 $f_{up, in vitro}$ 推定の信頼性は高くないと思われる。培地に FBS を含まない酵母エストロゲンスクリーニング (YES)、酵母アンドロゲンスクリーニング (YAS)、NVS_NR_bER、NVS_NR_hER、NVS_NR_mERa、ATG_ERa_TRANS_up、ATG_ERE_CIS_up といったアッセイの結果を用いるのも不確実低減の上で有効かもしれない。

IVIVE の予備的な試行時の感度解析の結果、血中の f_{up} も予測影響量に大きな感度を及ぼすことを示したが、 f_{ub} も推定ツール間で推定値に大きなバラツキが見られた。

これらのことから、IVIVE 適用の可能性を研究する初期段階の検討に際しては、*in vitro* 系で測定したより信頼できるパラメータ値を使用することも重要と思われる。

R 言語を用いて PBK モデルは柔軟に構築できるが、モデル推定の誤差を少なくするために、コンパートメントは、肝臓、腎臓、脂肪、高血流量組織、低血流量組織および血液と最小限にし、経口からの摂取に加えて、肝臓での代謝クリアランスと腎クリアランスを考慮する比較的シンプルなモデルの構築が良いと思われる。

E. 結論

本年度の検討の結果、IVIVE に使用する PBK モデルの構築およびそれらのモデルパラメータ値の整備は可能であり、IVIVE を試行することも可能と判断できた。次年度は、*in vivo* 試験として子宮肥大試験を、*in vitro* アッセイとしてはこれに関連する ER 系のアッセイのデータを選択し、さらに解析に供する物質として、既報文献で陽性と

されている 4- α -Cumylphenol や Dicumyl peroxide 等の物質を選択し IVIVE を試行し、内分泌かく乱作用への影響評価への適用の可能性をさらに検討する。

F. 参考文献

1. Armitage, J.M. et al., (2014) Application of mass balance models and the chemical activity concept to facilitate the use of *in vitro* toxicity data for risk assessment. Environ Sci Technol. 48, 9770–9779.
2. Casey et al. (2018) Evaluation and optimization of pharmacokinetic models for *in vitro* to *in vivo* extrapolation of estrogenic activity for environmental chemicals. Environmental Health Perspectives 126, 097001 -1-14.
3. DeJongh et al., (1997) A quantitative property–property relationship (QPPR) approach to estimate *in vitro* tissue–blood partition coefficients of organic chemicals in rats and humans. Arch. Toxicol. 72, 17–25.
4. Fabian, E. et al., (2019) *In vitro*-to-*in vivo* extrapolation (IVIVE) by PBTK modeling for animal free risk assessment approaches of potential endocrine-disrupting compounds. Arch. Toxicol. 93, 401–416.
5. Hou et al., (2004) ADME evaluation in drug discovery. 5. Correlation of caco-2 permeation with simple molecular properties. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 44, 1585-1600.
6. Li, H. et al., (2017) Use of physiologically based kinetic modeling-facilitated reverse dosimetry of *in vitro* toxicity data for prediction of *in vivo* developmental

- toxicity of tebuconazole in rats. *Toxicology Letters* 266, 85–93.
7. Madden et al., (2019) *In silico* resources to assist in the development and evaluation of physiologically-based kinetic models. *Computational Toxicology* 11: 33-49.
 8. Pearce et al., (2017) htk: R package for high-throughput toxicokinetics. *J Stat Softw.* 79, 1–26.
 9. Strikwold, M. et al., (2013) Combining *in vitro* embryotoxicity data with physiologically based kinetic (PBK) modelling to define *in vivo* dose–response curves for developmental toxicity of phenol in rat and human. *Arch. Toxicol.* 87, 1709–1723.
 10. Strikwold, M. et al., (2017) Integrating *in vitro* data and physiologically based kinetic (PBK) modelling to assess the *in vivo* potential developmental toxicity of a series of phenols. *Arch. Toxicol.* 91, 2119–2133.
 11. Wambaugh et al., (2018) Evaluating *in vitro-in vivo* extrapolation of toxicokinetics. *Toxicological Sciences* 163, 152–169.
 12. Wetmore et al., (2013) Relative impact of incorporating pharmacokinetics on predicting *in vivo* hazard and mode of action from high-throughput *in vitro* toxicity assays. *Toxicological Sciences* 132, 327–346.
 13. Zhang, M. et al., (2018) Towards a generic physiologically based kinetic model to predict *in vivo* uterotrophic responses in rats by reverse dosimetry of *in vitro* estrogenicity data. *Arch. Toxicol.* 92, 1075–1088.
- G. 研究発表
- G.1. 論文発表
1. Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, Hirose A, Yamada T. A physiologically based kinetic modeling of ethyl tert-butyl ether in humans—An illustrative application of quantitative structure-property relationship and Monte Carlo simulation. *J. Toxicol. Sci.* **47**, 77-87, 2022.
 2. Matsumoto M, Fujii S, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Inoue K, Hirose A. Repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening of polyoxymethylene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**(4), 103-116, 2021.
 3. Matsumoto M, Takano M, Takabe M, Yamaguchi N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Hirose A. Initial hazard assessment of ethyl(dimethyl)(tetradecyl)ammonium ethyl sulfate: Genotoxicity tests and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **122**, 104914, 2021.
 4. Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VII). *Bull. Natl Inst. Haelth Sci.* **139**, 71-78, 2021.
 5. Iso T, Natsume M, Murata Y, Hirose N,

Umamo T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse. *Fundam. Toxicol. Sci.* **9**(2), 31-36, 2022.

G.2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 既報研究におけるIVIVEの概要

Strikwold et al. (2013)	Strikwold et al. (2017)	Li et al. (2017)	Zhang et al. (2018)	Fabian et al. (2019)	Casey et al. (2018)
フェノール	フェノール, 2種の <i>p</i> -置換フェノール	Tebuconazole (抗菌剤)	17β-エストラジオール, ビスフェノールA	アセトアミノフェン, ビスフェノールA 等 10物質	29種のエストロゲン受容体アゴニスト
BMDL ₀₅ (IVIVE値) ・マウス胚性幹細胞の分化アッセイ (ES-D3細胞)	BMDL ₀₅ (IVIVE値) ・マウス胚性幹細胞の分化アッセイ (ES-D3細胞)	BMDL ₁₀ (IVIVE値) ・マウス胚性幹細胞の分化アッセイ (ES-D3細胞)	BMDL ₁₀ (IVIVE値) ・ヒト乳がん培養細胞増殖アッセイ ・ヒト骨肉腫細胞 ER-CALUXアッセイ ・酵母エストロゲンスクリーニング (YES) アッセイ	LOEL (IVIVE値) ・酵母エストロゲンスクリーニング (YES) アッセイ ・酵母アンドロゲンスクリーニング (YAS) アッセイ ・H295Rアッセイ	EAD (IVIVE値) ・米国EPA ToxCastおよびNIH NCATSのhigh-throughput screening programsで実施の16アッセイ
NOAEL ・ラット発生毒性試験	BMDL ₀₅ ・ラット発生毒性試験	NOAEL ・ラット発生毒性試験	BMDL ₁₀ ・ラット子宮肥大試験	LOEL ・ラットでの子宮肥大試験やハッシュバーガー試験等	LEL ・ラット子宮肥大試験
BMDL ₀₅ とNOAELには0.3~2.3倍の差	両 BMDL ₀₅ には0.24~0.74倍の差	BMDL ₁₀ とNOAELには3.1倍の差	両 BMDL ₁₀ には3.9倍 (E2)と4.7~13.4倍 (BPA)の差	6物質で1/10~10倍以内の差。残り4物質で10倍以上の差	27物質のEAD:LELの最小値の1/10~最大値の10倍の範囲内

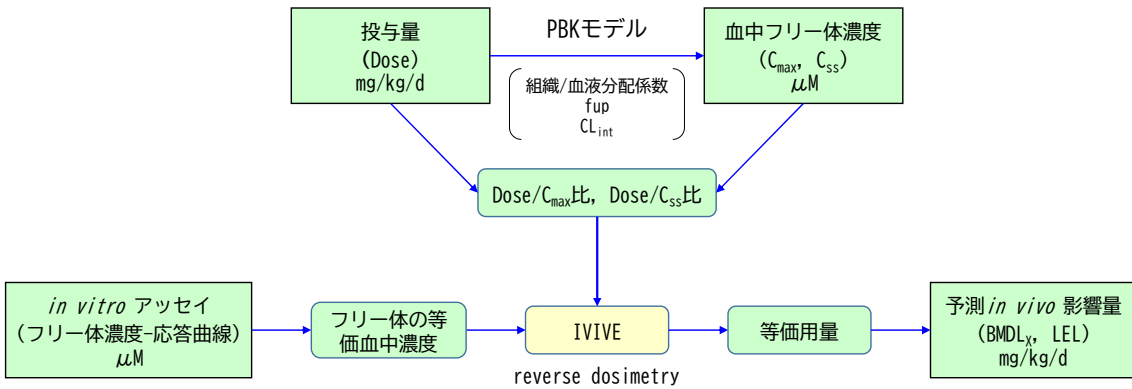


図1 IVIVEのフロー

表2 調査したモデルパラメータ値に関するツールとデータベースの概要

ツール名	構造入力方式	予測されるPBKモデルパラメータ			
		K _{ow} /K _{aw}	f _{up}	R _{app}	CL _{int}
ADMETlab (中国)	SMILES入力		●	●	
CompTox Chemicals Dashboard (米国)	CAS RN入力	●	●		●
DruMAP (日本)	SDFファイル読込		●		●
EPI Suite (米国)	CAS RN/SMILES入力	●			
pkCSM (豪/英)	SMILES入力		●	●	

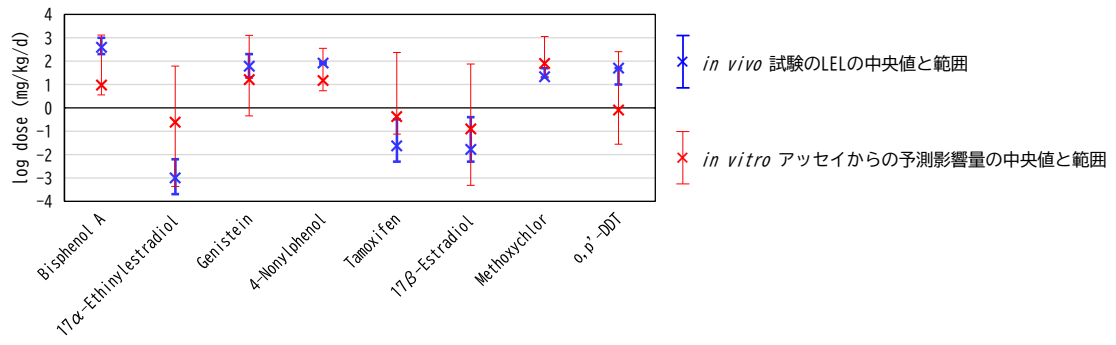


図2 8物質へのIVIVEの試行結果

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

*In silico*予測手法の高度化とNew Approach Methodologyの活用に基づく化学物質の
統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

令和3年度 分担研究報告書

機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と
化学物質のリスク評価への活用に関する研究

研究分担者 安部 賀央里

名古屋市立大学大学院薬学研究科 レギュラトリーサイエンス分野 講師

研究協力者 足利 太可雄

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 頭金 正博

名古屋市立大学大学院薬学研究科 レギュラトリーサイエンス分野 教授

研究協力者 鈴木 政晴, 伊藤 潤, 木下 啓, 村崎 亘, 片山 早紀, 中森 瑞季, 家田 維哉,
島田 侑裕, 土井 更良

名古屋市立大学大学院薬学研究科 レギュラトリーサイエンス分野

研究要旨

動物実験の規制に伴い、皮膚感作性評価における動物実験代替法の開発が急務となっている。2021年には皮膚感作性を評価する際のDefined ApproachesがOECDのガイドラインNo.497に公表され、有害性評価や感作性強度評価において*in chemico*、*in vitro*、*in silico*を組み合わせた考え方が示されている。人工知能技術の一つである機械学習による皮膚感作性の予測モデル構築については、既存の文献情報からマウスの局所リンパ節試験における実験結果（皮膚感作性の強度指標）を予測する高性能な*in silico*モデルを開発した。開発した予測モデルを基に、予測性能の向上、適用範囲の拡大を目指して皮膚感作性に関するデータの追加による検討を行い、規制安全性評価への受け入れを目指した予測モデル開発を進めている。また、既にOECDのテストガイドラインに収載されている*in vitro*試験法について、化学構造情報等から実験結果を予測する*in silico*モデルの開発を行った。*In silico*化を進めることで、*in vitro*実験の効率化や欠損値対応にも貢献できる。さらに、化学物質の構造情報からヒトでの皮膚感作性の有無を判別する高性能な予測モデルの構築にも取り組んだ。

A. 研究目的

皮膚感作性物質は、繰り返しの暴露によって皮膚に局所的な炎症（かぶれ）が生じ

るアレルギー性接触皮膚炎（ACD）を引き起こす化学物質であり、T細胞を介したIV型過敏性免疫反応を誘発すると考えられて

いる。ACD は罹患者の多い疾患であり、生活の質に大きな影響を与えるため、皮膚感作性を引き起こす可能性のある化学物質を適切に評価し、規制することは極めて重要である。これまで、化学物質の皮膚感作性の評価のためのヒトおよび動物を使用する試験法が数多く開発されてきた。特に、マウス局所リンパ節アッセイ (LLNA) は、動物への苦痛が少なく、定量的な評価が可能なことから国際的に推奨されている。しかし、欧州で 2013 年以降、動物実験が実施された成分を含む化粧品の販売が禁止されたため、皮膚感作評価における動物実験代替法の開発が早急に求められている。また、動物実験にかかる費用、時間、動物愛護の観点から、化粧品業界のみならず、世界中の様々な業界において動物を用いない動物実験代替法の開発が加速している。

これまでに、皮膚感作の有害性発現経路 (AOP) の解明が進んでおり、2012 年に OECD ガイダンス文書として公表されている。皮膚感作性の動物実験代替法として、AOP における、各 Key Event に対応した *in chemico* や *in vitro* 手法が開発され、OECD のテストガイドラインに収載されている。一方で、皮膚感作性は免疫反応が関与する複雑なメカニズムであるため、複数の試験法を組み合わせる総合的に評価する Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) が提唱されており、複数の *in vitro* 試験結果や *in silico* の結果を組み合わせる統合的アプローチが検討されている。2021 年 6 月には皮膚感作性を評価する際の Defined Approaches が OECD のガイドライン No.497 に公表され、有害性評価や感作性強度評価において *in chemico*、*in vitro*、*in silico* を組み合わせた考え方が

示されている。

人工知能技術の一つである機械学習は、化学物質の毒性評価における *in silico* 手法の開発において重要な役割を示し、多種多様な毒性関連データを有効活用する手段として大きな期待が集まっている。我々は、機械学習を用いて、皮膚感作性の強度指標である LLNA の Estimated Concentration needed to produce a stimulation index of 3 (EC3) 値を予測する回帰モデルの構築に取り組んできた (Ambe *et al.*, 2021)。

本課題では、皮膚感作性に関する信頼性の高い *in vivo* や *in vitro* の実験結果を収集し、AOP の主要キーイベントを評価する *in vitro* の実験結果や物性値等の化学物質情報から *in vivo* での皮膚感作性を予測する機械学習モデルを構築する。既存の *in silico* モデルとの比較検討を行い、モデルの性能や適用範囲について評価する。また、開発した予測モデルの適用範囲の明確化や拡大に向けて、キーイベントを評価する *in vitro* 実験結果の *in silico* モデル化や、三次元の画像情報等を使用した予測モデルの開発にも取り組む。

さらに、他の毒性エンドポイントへの適用を視野に入れ、開発した予測モデルを化学物質のリスク評価に活用するにあたり、具体的な導入場面を想定したケーススタディを行い、予測結果に求められる信頼性や予測性能を検討し、安全性評価規制への受け入れへ向けた具体的な課題を整理する。

B. 研究方法

B.1 皮膚感作性の強度指標予測モデルの改良

これまでに我々が開発した皮膚感作性の強度指標 (LLNA EC3 値) の予測モデルでは、Hoffmann らの文献の the Cosmetics

Europe database (*Crit Rev Toxicol.* 2018; 48(5): 344-358) を学習データとして使用していた (Ambe *et al.*, 2021)。そこで、本課題では OECD の皮膚感作性に関する Defined Approach のガイドライン (No.497) において検討された化学物質の試験情報を使用してモデルの改良を行った。皮膚感作性の強度指標に使用されている LLNA の EC3 値を目的変数とし、皮膚感作性の AOP に関する *in vitro* 試験結果 (DPRA、KeratinoSens™、h-CLAT)、物性値、OECD QSAR ToolBox から得られる化学情報を説明変数とした。学習データは訓練データと検証データに分割し、勾配ブースティング決定木による回帰モデルを作成した。予測モデルの性能評価は検証データを用いて、決定係数 R^2 値により行った。

B.2 *In vitro* 実験の予測モデル構築

皮膚感作性評価において、複数の *in vitro* 実験結果を使用することは実験にかかる時間やコストの観点から効率的ではない。また、複数の *in vitro* 試験結果や *in silico* の結果を組み合わせ評価を行う統合的アプローチにおいても、*in vitro* 実験値を化学構造情報のみから予測することが可能になれば、欠損値の補完にも使用できるため有益なアプローチとなる。本課題では、皮膚感作性の AOP において MIE (タンパク質との共有結合) を評価する DPRA (OECD TG442C) と Key Event 2 (角化細胞における炎症性応答) を評価する KeratinoSens™ (OECD TG442D) に着目し、DPRA の実験結果から KeratinoSens™ の実験結果を予測する *in silico* モデルの構築を試みた。既存の文献情報から KeratinoSens™ の陽性物質、陰性物質を抽出し、説明変数を DPRA の実験値と

化学物質の構造情報である分子記述子とした。勾配ブースティング決定木系のアルゴリズムを使用して機械学習による判別モデルを構築した。

Hoffmann らの文献の the Cosmetics Europe database (*Crit Rev Toxicol.* 2018; 48(5): 344-358) に含まれる物質をモデル構築用の学習データとした。学習データは陽性物質と陰性物質の割合を保持したまま層化分割し、訓練データと検証データとした。訓練データを用いてパラメータ調整を行い、検証データの結果から最適なモデルを構築した。また、モデル作成に用いたデータソースとは異なる Urbisch のデータセット (*Regul Toxicol Pharmacol.* 2015; 71(2): 337-351) から外部検証データを作成し、構築した予測モデルの汎用性を確認した。説明変数として DPRA の実験値、MOE で計算した分子記述子を使用した。

B.3 ヒトの皮膚感作性評価の予測モデル構築

ヒトの皮膚感作性評価を *in silico* で予測する機械学習モデルの構築を目的とした。Golden らの文献 (*ALTEX.* 2021; 38(1): 33-48) に記載されているヒトでの皮膚感作性に関する情報を学習データとして利用した。目的変数をヒトの皮膚感作性の有無、説明変数を化学構造情報である分子記述子とし、機械学習アルゴリズムとして勾配ブースティング決定木である Catboost を用いて判別モデルを構築した。分子記述子は MOE により計算した。学習データは陽性物質と陰性物質の割合を保持したままの層化分割し、訓練データと検証データとした。訓練データを用いてパラメータ調整を行い、検証データの結果から最適なモデルを構築した。また、

モデル作成に用いたデータソースとは異なる Hoffmann らの文献の the Cosmetics Europe database (*Crit Rev Toxicol.* 2018; 48(5): 344-358) を用いて外部検証データを作成し、構築した予測モデルの汎用性を確認した。また、予測モデルに使用した分子記述子について、変数重要度を算出しモデルに寄与した情報について検討した。

(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. 研究結果

C.1 皮膚感作性の強度指標予測モデルの改良

試験情報等が得られた 171 物質を訓練データと検証データに分割し、構築した回帰モデルにおいて、検証データ 30 物質を用いて評価したところ、決定係数 R^2 値が 0.8 程度となり高性能なモデルが得られた。回帰モデルは Python の XGBoost と CatBoost を使用した。また、本モデルでは、説明変数として OECD QSAR ToolBox のタンパク質結合アラート情報や *in vitro* 試験結果、物性値を用いており、モデルの変数重要度からもこれらの情報が EC3 値の予測に重要であることが分かった。本モデルは OECD のガイドラインにて使用された信頼性の高いデータを用いたことや、テストガイドラインに掲載された *in vitro* 試験法の結果を用いており、予測性能と解釈性を有した実用的な評価手法となり得ることが期待される。

C.2 *In vitro* 実験の予測モデル構築

In vitro 実験値の予測モデル化において Hoffmann(2018)らの文献に含まれ、かつ

SMILESが存在する122物質を学習データセットとした。訓練データと検証データに4:1の割合で分割し、XGBoostを用いて KeratinoSens™の陽性物質と陰性物質を判定するモデルを作成した。また、外部検証データとして Urbisch(2015)らの文献から、学習データである the Cosmetics Europe databaseとの重複物質削除を行った後の103物質を用いて、構築したモデルの汎化性能を確認した。MOEを用いて算出した分子記述子440種と、分子量、LogP、DPRAの実験値2種（システインペプチド減少率とリジンペプチド減少率）の計444種を説明変数とした。さらに変数重要度を算出し、重要度の高い説明変数32種を用いたところ、検証データセットのROC-AUCが0.892、感度0.871、特異度0.788であった。また、外部検証用データでは、ROC-AUCが0.820、感度が0.881、特異度が0.629であり、高い予測性能と汎化性能を示した。判別モデルはPythonのXGBoostClassifierを使用した。

学習データを用いて構築した判別モデルの変数重要度を確認したところ、最も重要な変数はDPRAの実験値であるシステインペプチド減少率であった。

C.3 ヒトの皮膚感作性評価の予測モデル構築

ヒトの皮膚感作性予測モデルにおいて、Golden(2021)らの文献に記載されている465物質から、SMILESを取得できなかった22物質と計算ソフトでSMILESを読み込めなかった6物質を除外し、437物質（陽性298物質、陰性139物質）をモデル構築のための学習用データセットとした。陽性物質と陰性物質の比を保持したまま3:1に層化分割したところ、訓練データが327物質、検

証データが110物質となった。一方で、Hoffmann(2018)らの the Cosmetics Europe databaseに記載されている128物質から、Golden(2021)らの文献に掲載されている物質との重複を除いた29物質を外部検証用データセットとした。外部検証用データセットは、陽性26物質、陰性3物質であった。MOEを用いて算出した435種の分子記述子のうち、変数重要度の高い上位53種を説明変数とし、ヒトの感作性の有無を目的変数とした。PythonのCatBoostClassifierを用いて皮膚感作性の有無を判別するモデルを構築した。また、k近傍法(k=3)による適用範囲を設定し、モデルの性能評価は適用範囲内の物質を用いて行った(図1)。判別モデルの性能評価として、検証用データセットのROC-AUCが0.81、Balanced Accuracyが0.71、感度0.91、特異度0.50であった。外部検証では、ROC-AUCが0.91、Balanced Accuracyが0.76、感度0.84、特異度0.67であり、高い汎化性能も確認できた。

学習データにより構築した判別モデルについて変数重要度を確認したところ、上位10個の中にLUMOに関する変数が含まれていた(表1)。

D. 考察

皮膚感作性の強度指標であるLLNAのEC3値を予測する回帰モデルの改良については、新たなデータとしてOECDの皮膚感作性に関するDefined Approachのガイドライン(No.497)において公開された化学物質の試験情報を使用した。本モデルの変数重要度からタンパク質結合アラート情報や*in vitro*試験結果が重要であることが分かった。本モデルはOECDが公開した信頼性の高いデータを用いたことや、ガイドライン

に掲載された*in vitro*試験法の結果を用いており、性能と解釈性を有した実用的な評価手法となり得ることが期待される。今後は、回帰モデルを使用したケーススタディを行い、モデルの適用範囲についても検討する必要がある。

*In vitro*実験値の予測モデル化において、KeratinoSens™の結果を予測する*in silico*モデルは既存の文献情報を有効活用し、高い予測性能を示した。*In vitro*実験は動物を使用しない代替法として有用だが、化学物質の入手や、*in vitro*実験において問題となる溶解性などの観点から、コストや時間がかかる。*In silico*での高性能な*in vitro*実験値予測モデルの開発は、皮膚感作性の評価において実験値が無い場合の穴埋めや、*in vitro*実験が必要かどうかのスクリーニングにも使用できる。また、予測モデルの変数重要度の結果から、KeratinoSens™の予測にはDPRAのシステインペプチド減少率が大きく関連していることが確認された。これらの情報はAOPの検証やさらなるメカニズムの理解にも有益だと考えられる。

ヒトの皮膚感作性予測モデルにおいて、化学物質の構造情報のみから、感作性の有無を精度良く判別する機械学習モデルが構築できた。動物実験代替法において、最終的な目標であるヒトでの有害事象の予測は重要なアプローチとなる。今後、変数重要度の検討や*in vitro*実験値を加えたモデルの構築が必要だと考えている。

E. 結論

機械学習を用いた*in silico*での皮膚感作性評価について、信頼性の高い学習データを用いた高性能な予測モデルの構築ができた。さらに、適用範囲の拡大やモデルの透明性、結果の説明性についても検討した。今後は

ケーススタディを行うことで、規制安全性評価への受け入れに向けた具体的な課題の整理が可能となる。また、*in vitro*実験についても*in silico*モデルを構築し、効率化に加えて実験値の欠損等の問題点にも取り組んでいる。ヒトでの皮膚感作性の有無を判別するモデル構築も開始し、皮膚感作性評価への統合的なアプローチが期待できる。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a threshold of toxicological concern concept for skin sensitization by *in vitro/in silico* approaches. *Journal of Japanese Cosmetic Science Society*. **45**(4), 331-335, 2021.
2. Ambe K, Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M. Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **125**, 105019, 2021.
3. Ambe K, Ohya K, Takada W, Suzuki M, Tohkin M. *In Silico* Approach to Predict Severe Cutaneous Adverse Reactions Using the Japanese Adverse Drug Event Report Database. *Clin. Transl. Sci.* **4**(2), 756-763, 2021.

F.2. 学会発表

1. 佐々木裕、三輪誠、安部賀央里、頭金正博：組み込み・除外判定を機械読解により実現した系統的レビュー。第 248 回自然言語処理研究会・第 226 回コンピュータビジョンとイメージメデ

ィア合同研究発表会 (2021 年 5 月 Web 開催)

2. 片山早紀、土井更良、立木孝幸、安部賀央里、頭金正博：*In vitro* 試験情報を利用した薬物性肝障害の *in silico* 予測手法の開発。第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021 年 7 月神戸・Web 開催)
3. 中森瑞季、東野竜空、安部賀央里、頭金正博、佐々木崇光、吉成浩一：機械学習を用いた薬物代謝酵素阻害活性の *in silico* 予測手法の開発。第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021 年 7 月神戸・Web 開催)
4. 吉井優花、秋田彩佑、安部賀央里、頭金正博：臨床試験データを用いた疾患修飾性抗リウマチ薬とメトトレキサート併用時の有効性と安全性に関する研究。医療薬学フォーラム 2021 (2021 年 7 月 Web 開催)
5. 家田維哉、安部賀央里、頭金正博：医薬品副作用自発報告データベースを用いた機械学習による薬剤性急性腎障害の予測手法の開発。医療薬学フォーラム 2021 (2021 年 7 月 Web 開催)
6. Takao Ashikaga, Kaori Ambe, Masaharu Suzuki, Masayuki Kurimoto, Takashi Yamada, Masahiro Tohkin: Establishment of a risk assessment method and threshold of toxicological concern (TTC) concept for skin sensitization by non-animal approaches. 11th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences 2020 (2021 年 8 月オンライン 1 年延期開催)
7. 安部賀央里：毒性データベースを用いた化学物質のインシリコ毒性予測。シンポジウム S5：計算機科学が拓く薬

- 学の未来、第 65 回日本薬学会関東支部大会 (2021 年 9 月オンライン)
8. Saki Katayama, Sarara Doi, Takayuki Tachiki, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin, Toshimasa Jindo : Development of *in silico* prediction method for idiosyncratic drug-induced liver injury. CBI 学会 2021 年大会 (2021 年 10 月オンライン)
 9. 安部賀央里 : 化学物質の安全性評価における *in silico* 予測モデル. フォーカストセッション FS-07 創薬における WET 研究者と計算毒性学とのコラボレーション、および最新の安全性評価研究と Ames/QSAR 国際チャレンジプログラム、CBI 学会 2021 年大会 (2021 年 10 月オンライン)
 10. 秋田彩佑、魏捷、安部賀央里、頭金正博既存の臨床試験データを用いた直接経口抗凝固薬の有効性と安全性に関する民族差の検討. Young Investigator Award 第 31 回日本医療薬学会年会 (2021 年 11 月オンライン)
 11. 東野竜空、中森瑞季、安部賀央里、頭金正博、佐々木崇光、吉成 浩一 : 機械学習によるラット薬物代謝酵素および胆汁酸トランスポーターの阻害活性予測モデルの開発. 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021 年 11 月オンライン)
 12. 家田維哉、安部賀央里、頭金正博 : 医薬品副作用自発報告データベースを用いたアンサンブル機械学習モデルによる薬剤性急性腎障害の予測. 第 42 回日本臨床薬理学会学術総会 (2021 年 12 月仙台・ハイブリッド)
 13. 土井更良、安部賀央里、頭金正博 : 機械学習による薬物性肝障害の予測～大規模副作用報告データベースの活用～. 第 42 回日本臨床薬理学会学術総会 (2021 年 12 月仙台・ハイブリッド)
 14. 安部賀央里 : 機械学習法による特異体質性副作用の予測. シンポジウム 臨床薬理学と人工知能、第 42 回日本臨床薬理学会学術総会 (2021 年 12 月仙台・ハイブリッド)
 15. 中森瑞季、東野竜空、安部賀央里、頭金正博、佐々木崇光、吉成浩一 : 機械学習による薬物代謝酵素の阻害活性予測モデルの開発. 大学院生・学部生シンポジウム GS01 データ駆動型アプローチによる医薬品の毒性予測 日本薬学会第 142 年会 (2022 年 3 月オンライン)
 16. 伊藤潤、安部賀央里、足利太可雄、頭金正博 : ヒト皮膚感作性データを用いた機械学習による *in silico* 予測モデルの開発. 日本薬学会第 142 年会 (2022 年 3 月オンライン)
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

K近傍法:

近傍k個のデータを用いてデータ密度を推定する方法

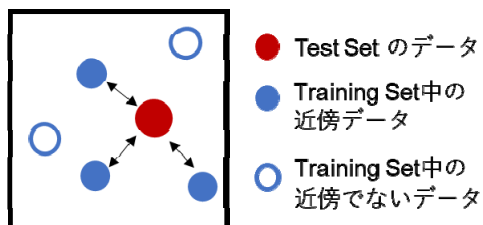


図1 適用範囲の設定方法 (k 近傍法)

表1 ヒトの皮膚感作性評価の予測モデルにおける上位10位の分子記述子

1	a_nN
2	AM1_IP
3	reactive
4	density
5	mutagenic
6	Q_VSA_FPPOS
7	a_ICM
8	dipoleY
9	AM1_LUMO
10	Q_VSA_PPOS

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 該当なし

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

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
Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, <u>Sugiyama K</u> , Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, <u>Honma M.</u>	Development of a new quantitative structure- activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto- Modeller™	Genes and Environ.	43	16	2021
P.I. Petkov, H. Ivanova, <u>M. Honma</u> , T. Yamada, T. Morita, <u>A. Furuham</u> a, S. Kotov, E. Kaloyanova, G. Dimitrova, O. Mekenyan	Differences between in vitro and in vivo genotoxicity due to metabolism: The role of kinetics	Computational Toxicology	22	100222	2022
Yamazoe Y, <u>Yamada T</u> , <u>Hirose A</u> , Murayama N.	Deciphering Key Interactions of Ligands with CYP3A4- Template* system.	Food Safety (Tokyo).	9(1)	10-21	2021

<u>山田 隆志</u>	Cefic LRI/ILSI Europe Joint Workshop での Carcinogen Dose Response Database for Threshold of Toxicological Concern (TTC) の概要ならびに TTC に関する近年の国際動向	イルシー	in press		2022
Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, <u>Hirose A</u> , <u>Yamada T</u> .	A physiologically based kinetic modeling of ethyl tert-butyl ether in humans—An illustrative application of quantitative structure-property relationship and Monte Carlo simulation.	J. Toxicol. Sci.	47(2)	77-87	2022
Lee BM, Lee SH, <u>Yamada T</u> , Park S, Wang Y, Kim KB, Kwon S.	Read-across approaches: Current applications and regulatory acceptance in Korea, Japan, and China.	J. Toxicol. Environ. Health. A.	85(5)	184-197	2022
<u>Yamada T</u> , Kawamura T, Maruyama T, Kurimoto M, Yamamoto H, Katsutani N, <u>Hirose A</u> .	Quantitative structure-activity relationship and a category approach to support algal toxicity assessment of human pharmaceuticals.	Fundam. Toxicol. Sci.	8	195-204	2021

<u>Yamada T</u> , Miura M, Kawamura T, Ushida K, Inoue K, Kuwagata M, Katsutani N, <u>Hirose A</u> .	Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment.	J. Toxicol. Sci.	46	531-538	2021
Tanabe S, <u>Hirose A</u> , <u>Yamada T</u> .	Adverse Outcome Pathway on histone deacetylase inhibition leading to testicular atrophy.	OECD Series on Adverse Outcome Pathways	No. 17.	1-65	2021
Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Girard P, Halamoda-Kenzaoui B, Hinton D, <u>Hirose A</u> , Hoeveler A, <u>Honma M</u> , Hugas M, Ishida S, Kass GE, Kojima H, Krefting I, Liachenko S, Liu Y, Masters S, Marx U, McCarthy T, Mercer T, Patri A, Pelaez C, Pirmohamed M, Platz S, Ribeiro AJ, Rodricks JV, Rusyn I, Salek RM, Schoonjans R, Silva P, Svendsen CN, Sumner S, Sung K, Tagle D, Tong L,	Emerging technologies and their impact on regulatory science.	Exp. Biol. Med. (Maywood).	247(1)	1-75	2022

Tong W, Eijnden-van-Raaij JVD, Vary N, Wang T, Waterton J, Wang M, Wen H, Wishart D, Yuan Y, Slikker W Jr.					
<u>Matsumoto M</u> , Takano M, Takabe M, Yamaguchi N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, <u>Hirose A</u> .	Initial hazard assessment of ethyl(dimethyl) (tetradecyl)ammonium ethyl sulfate: Genotoxicity tests and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening in rats.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	122	104914	2021
<u>Matsumoto M</u> , Fujii S, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Inoue K, <u>Hirose A</u> .	Repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening of polyoxymethylene in rats.	Fundam. Toxicol. Sci.	8	103-116	2021
Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, <u>Yamada T</u> , <u>Hirose A</u> , <u>Matsumoto M</u> .	Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VII).	Bull. Natl Inst. Health Sci.	139	71-78	2021

Iso T, Natsume M, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Masumura K, <u>Sugiyama K</u> , <u>Matsumoto M</u> , <u>Hirose A</u> .	Absence of in vivo mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfono hydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse. Fundam. Toxicol. Sci. 9(2), 31-36, 2022.	Fundam. Toxicol. Sci.	9(2)	31-36	2022
Ashikaga T, <u>Ambe K</u> , Suzuki M, Kurimoto M, <u>Yamada T</u> , Tohkin M.	Establishment of a threshold of toxicological concern concept for skin sensitization by in vitro/in silico approaches.	Journal of Japanese Cosmetic Science Society.	45(4)	331-335	2021
<u>Ambe K</u> , Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M.	Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	125	105019	2021
<u>Ambe K</u> , Ohya K, Takada W, Suzuki M, Tohkin M.	In Silico Approach to Predict Severe Cutaneous Adverse Reactions Using the Japanese Adverse Drug Event Report Database.	Clin. Transl. Sci.	4(2)	756-763	2021

該当なし

外国旅費記録書
(実績報告書添付用)

研究者名：〇〇 〇〇

研究課題名：OECDプロジェクトでの成果物を厚生労働行政に反映させるための研究

日程	旅行者名等		訪問機関名	目的及び成果
	氏名	所属機関名		
(元号)〇年〇月 〇日 ～ (元号)〇年〇月 〇日 (〇日間)	〇〇 〇 〇〇 〇 〇〇 〇 〇〇 〇 〇	A大学(千代田区) B大学(港区) C研究所(大阪市)	E研究所(ニューヨーク) F研究所(サンフランシスコ)	〇〇に関して、〇〇などの情報交換を行うことにより、〇〇を得た。
(元号)〇年〇月 〇日 ～ (元号)〇年〇月 〇日 (〇日間)	〇〇 〇 〇	D研究所(パリ)	G大学(名古屋市)	〇〇に関して、当該分野の第一人者である〇〇教授を招聘し、〇〇を行うことにより、〇〇を得た。

※1行程ごとに記載すること。

※1行程につき、複数の者が旅行した場合は、「旅行者名等」に旅行した者全てを記載し、複数の機関を訪問した場合は、「訪問機関名」に訪問した機関全てを記載すること。

※「所属機関名」及び「訪問機関名」には、機関名の横にカッコ書きで機関の所在地(都市名等)を記載すること。

※天災その他事故によりやむを得ず1行程が2週間の期間を超えた場合には、厚生労働大臣等が認めた最小行程を補助対象とする場合がある。

※必要に応じて、適宜、行を追加すること。

※「訪問機関名」が外国語の場合、機関名の下にカッコ書きで和名及び機関の概要を記載すること。

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

次の職員の令和3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 *In silico* 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣殿

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

次の職員の令和3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 *In silico* 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究3. 研究者名 (所属部署・職名) 変異遺伝部 部長
(氏名・フリガナ) 杉山 圭一 スギヤマ ケイイチ

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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

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

次の職員の令和3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 *In silico* 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣殿

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

次の職員の令和3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 *In silico* 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣殿

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

次の職員の令和3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 In silico 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性予測評価部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 松本 真理子・マツモト マリコ

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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

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

次の職員の令和3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 In silico 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 公立大学法人 名古屋市立大学

所属研究機関長 職 名 理事長

氏 名 郡 健二郎

次の職員の令和3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 In silico 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 薬学研究科 講師
(氏名・フリガナ) 安部賀央里 アンベカオリ

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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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。