

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 4 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 隆志

令和 5 年 (2023 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、本間 正充.....	22
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.....	33
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.....	44
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.....	54
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.....	62
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	70

令和4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 変異原性を対象とした QSAR の高度化では、Ames データベースの精緻化の成果である、安衛法試験結果の Ames データベースを文書にまとめると同時に、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-ニトロソ化合物の実試験を進め、結果の整理および考察を行った。

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、既存の代謝予測モデルの調査に基づいて3つのモデルを選択し、二つのケミカルグループを対象に、評価対象物質の類似物質の既存の代謝データを活用して代謝予測の信頼性を評価し、代謝の類似性に基づくカテゴリー化によって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から催奇形性へ至る AOP を用いたリスク評価への適用事例において、AOP 中の各キーイベントに関連する試験法の結果による AOP の堅牢性の検証、追加の試験、類似化合物の機序予測など総合的な試験評価戦略の開発に役立つことが明らかとなった。あらたに ECHA REACH のデータセットを整備して解析した結果、既存 AOP ネットワークの改良が可能であることが示された。

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、既存研究を調査し PBK モデルを解析すると共に、パラメータに関する推定ツールやデータベースを調査した。8物質の IVIVE を試行した結果、4物質で IVIVE の試行は可能と判断できた。R 言語で構築したマウス PBK モデルを、*in vitro* 測定および *in silico* 推定パラメータを用いて、血中濃度の時間変化を推計し、既報の測定値と比べることで検証した。また、吸収と消失に関わるパラメータ値を得るため *in vitro* 試験を実施した。

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、感作性強度を予測する回帰モデルを構築した。また、皮膚感作性のキーイベントである *in vitro* 実験結果を *in silico* で予測する高性能なモデルを構築し、Defined Approach への適用を検証した。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、適用領域を検討している。

上記5つの分担研究は、着実に結果を積み重ねて、いずれも当初の計画を達成できる見込みであり、本研究事業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 客員研究員

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しその考察を進めると共に、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3, 4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（令和5年度）。

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、代謝の類似性に基づくカテゴリーの精緻化とリードアクロス予測の信頼性向上を図る（令和3, 4年度）。継続してその適用範囲拡大を図るとともに、実験動物で観察された主要な毒性のヒトへの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）。さらに、*in vitro*お

よび*in silico*手法により決定した推定パラメータを用い、IVIVEに適用可能なPBKモデルを構築し、内分泌かく乱影響評価への適用性を検討する。また、PBKモデル構築に必要となる吸収と消失に関わるパラメータ値を得るため*in vitro*試験を実施する（令和4年度）。適用可能性の検討結果に基づき、ヒト健康リスク評価等への適用についてさらに検討する（令和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, 4年度）。さらに、将来の他の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（古濱・杉山・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。iii)更に、実施中の第二回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトについては、参加21チームの結果の取りまとめを行った。

i) 再評価対象は12,140物質の安衛法試験結果である。A判定（Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg以上の強い陽性と判定される物質）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）、C判定（Ames試験における陰性判定物質）評価の精査結果から、Ames試験結果の陽性条件の菌株・代謝活性化条件を整理した。精査は複数名の遺伝毒性専門家により実施された。ii) 芳香族N-ニトロソ化合物に注目し、令和3年度の6物質に加え令和4年度は9物質のAmes試験を実施した。iii) 第二回ブ

プロジェクト参加各チームは複数のモデルによる予測結果を提出可としたうえで、結果を知る前に各チーム内でのBest modelを1つ選択するように依頼していた。参加チームのそれぞれBest modelと全ての約50モデルの2パターンで統計量の評価を実施した。

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）

本研究で使用する代謝予測モデルを選定するため、既存のモデルについて、名称、製作者、出力結果、アルゴリズム、対象とする生物種や酵素（分子種）、データセットの公開/非公開、有償/無償、モデルの使用実績および更新の有無などの情報を整理した。

代謝の類似性に基づくカテゴリー化とリードアクロスの信頼性向上を図ることを目的として、クロロニトロベンゼン類（令和3年度）と塩化エタン類（令和4年度）を対象に、既存の代謝情報や選定した3つの代謝予測モデルによる出力結果など、複数の情報を統合して、毒性発現につながる代謝物の予測の信頼性を評価した。評価対象物質に対する類似物質の化学構造と毒性情報を、NIHS反復投与毒性統合DB（国衛研、食品安全委員会、ToxRef、RepDoseの反復投与毒性試験データを一元化したデータベース）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し、標的臓器とNOAELをリードアクロスにより予測した。

動物試験結果のヒトへの外挿性向上に資するNAMデータの利用を、代謝の観点から検討するため、ヒトCYP、特に薬物代謝の主要な分子種であるCYP3A4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）

令和3年度は、先行的に開発したAOPである発達毒性に関連するヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害を例として、リスク評価の3つの

場面に適用するための事例研究（Case 1：特定の化合物の評価に妥当性レビュー、Case 2：機序仮説を裏付ける試験系の優先順位付け、Case 3：新規物質などの類似化合物のレビューデータの活用）を実施した。

令和4年度は、ECHAのREACHに登録されているデータセットを用いて、DARTリスクとDARTの原因となる潜在的メカニズムの探索を行った。ECHA REACHに提出されたDART関連のOECDガイドラインに従って実施された試験（2278件）の研究結果から、既存のAOPに対するデータギャップ検証のため、DART AOPネットワークに対して類似検索方法を行うとともにDerek Nexusの性能も検証した。さらに、*in silico*モデルがAOP確立に向けてうまく機能しない毒性メカニズム領域を特定するために、DARTと関連するDerekアラートの探索を行った。

B.4. IVIVE用のPBKモデル構築のための基盤整備（松本）

令和3年度は、発生毒性や内分泌かく乱影響に関するIVIVEの既存研究を調査し、使用されたPBKモデルを解析してモデルを再現し、それらの予測再現性を確認するとともに、IVIVEおよびPBKモデルに必要なパラメータ推定ツールや検索ツールの有用性を確認した。さらに、オンラインデータベースや推定ツールのパラメータ値を用いて、8物質のIVIVEを試行した。

令和4年度は、令和3年度に実施した既存モデルの調査・検討の結果と、令和4年度に新たに得られた文献情報を基に、IVIVEのケーススタディに適用するためのマウスPBKモデルを構築して、R言語でコード化した。構築したPBKモデルを用いてマウス血中濃度の時間変化を計算し、既報の濃度変化と比較することにより、モデルの検証を行うとともに、推定最大血中濃度に及ぼす物質に固有のモデルパラメータ値の感度についても解析した。また、PBKモデル構築に必要な吸収と消失に関わるパラメータ値を得るためヒト結腸癌由来細胞（Caco-2細胞）を用いた細

胞膜透過性試験と肝臓S9画分を用いた*in vitro*代謝安定性試験を実施した。

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、強感作性物質の予測を重視した回帰モデルを構築した。Defined ApproachのOECD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た。皮膚感作性の強度指標である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、KeratinoSensTM、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、勾配ブースティング決定木系アルゴリズムを用いた回帰モデルを構築した。

皮膚感作性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) を評価する比較的簡便な*in chemico*試験であるDPRA (OECD TG442C) と化学構造情報のみから、Key Event2 (角化細胞における炎症性応答) を評価するKeratinoSensTM (OECD TG442D) の実験結果を予測する*in silico*モデルを令和3年度に構築した。本モデルは、既存の文献情報を学習データとし、勾配ブースティング決定木系のXGBoostを使用してKeratinoSensTMの陽性、陰性を判定する分類モデルであり、外部検証においても正確度0.80と高性能であった。そこで、令和4年度はDefined Approachの2 out of 3 DA (No.497)において、KeratinoSensTMの予測値を使用した場合の組み合わせ評価を実施した。

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。今年度は性能向上を目的とし、令和3年度に使用した学習データに他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追加した。*In silico*モデルにおいて重要なデータ分割、性能評価、変数重要度、適用領域について検討した。

C. 研究結果

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

i) 10,673物質 (A判定605、B判定986、C判定：9,082) について報告書に戻って結果の確認が可能であった。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12140と比較するとA判定26物質、B判定18物質、C判定66物質に対して評価の変更が行われた。

なお、10,673物質について安衛試験報告書に基づく精査が可能であり、全ての報告書でサルモネラ菌TA100、TA98、TA1535株でのそれぞれ代謝活性化・非活性化条件での試験結果の確認が可能であった。TA100株で68%、TA100とTA98株の両方・いずれで82%、TA100、TA98、TA1535株の組合せで91%の陽性の網羅が可能であった。また、61%の陽性結果では代謝活性化並びに非活性化条件の両方で陽性であり、27%、12%がそれぞれ代謝活性化条件のみ・代謝非活性化条件下のみで陽性の結果であった。なお、代謝非活性化条件では、TA100株だけで48%、TA100とTA98株の両方もしくはいずれで57%の陽性が網羅された。換言すると非活性化条件のTA100株の試験を実施することだけで陽性の半数弱を網羅することが可能な結果が導かれた。

ii) 令和3年度に実施したAmes試験(物質：I 3-nitrosomethylaminopyridine; II 4-nitrosomethylaminopyridine; III *n*-nitroso-*n*-ethylaniline; IV benzenamine, *n*-nitroso-*n*-phenyl-; V *n*-nitrosodibenzylamine; VI *N*-methyl-*N*-phenylnitrous amide) は、IVを除きすべて陽性の結果が得られた。I、II、III、Vはハンセンデータベースの結果と不一致であった。統計ベースQSARであるCASE UltraのGT1_BMUTモデル(最新版1.9.0.2の場合)では、I、II、IIIは既知の陰性、IV、V、VIは既知の陽性の予測結果となった。I、II、III、IVのQSARツール予測結果は実試験と不一致となった。知識ベースQSARであるDerek Nexus (最新版2.5.1)では全て陽性(PLAUSIBLE)の予測であった。一方で

OASIS TIMES Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03モデルでは、6物質の予測結果がAmes試験結果と合致した。

令和4年度は、① N-Nitrosoanabasine; ② Mononitrosocaffeidine; ③ 2-Nitrosomethylaminopyridine; ④ N-Nitrosopipicolinic acid; ⑤ 1-Nitroso-L-proline; ⑥ 1,2,6-Trimethyl-4-nitrosopiperazine; ⑦ N-Methyl-p-nitro-N-nitrosoaniline; ⑧ N,4-Dinitroso-N-methylaniline; ⑨ N-benzyl-N-phenylnitrous amideの9物質の芳香族N-ニトロソ化合物に対しAmes試験を実施した。②、⑤、⑨は陰性であり、他は陽性の結果が得られた。これら9物質のうち、ハンセンデータベースでは、1物質(②)が陰性、1物質(③)が陽性の報告であり、実試験結果と一致した。一方で、統計ベースQSARであるCASE UltraのGT1_BMUTモデル(最新版1.9.0.2)では③、④、⑦、⑧、⑨は既知の陽性、①、⑤、⑥は陽性、②は既知の陰性の予測結果となった。⑤と⑨の予測結果は実試験と不一致であった。知識ベースQSARであるDerek Nexus (最新版2.5.1)では全て陽性(PLAUSIBLE)の予測であった。一方でOASIS TIMES Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03モデルでは、⑨以外は陽性の結果で、②、⑤で実試験結果と矛盾した。

iii) 第二回プロジェクト参加21チームのうち1チームはBest modelの結果を2つ提出した。そのため、合計22モデルのBest modelの統計指標と、21チームが提出した約50モデル全結果の統計値を整理した。結果は、(a)全般的に、第二回プロジェクトの結果は特異度(陰性物質を陰性と判定できる能力)が高いが、感度(陽性物質を陽性と判定できる能力)が低い傾向があった。(b)第二回プロジェクトは前回第一回プロジェクトよりも参加チーム間でのモデルの感度、MCC(総合的な指標)、F1 Score(真陰性を考慮に入れない精度)の差が顕著であった。(c)Best model全体のMCC、F1 Score平均した値は第一回プロジェクトPhase IIIでの結果と同程度であった。

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)

既存の代謝予測モデルの出力は、反応部位予測と代謝物予測に大別できた。生物種はヒトまたは齧歯類あるいは両方を対象としているが、明示されていないものもあった。学習データセットは、モデルの適用範囲の確認に有用であるが、商用モデルでは公開されていることは稀で、研究機関が開発した無償モデルでも、データセットは非公開のものが多かった。開発後のメンテナンスやアップデート、公開が継続されていないモデルも多く、研究開発で得られた成果の継承、発展が難しいことが懸念された。本研究では、化学物質審査や安全性評価研究で国際的に使用の実績があり、モデルの継続的な更新が期待される知識ベース型のMeteor Nexus (Meteor)、機械学習による統計ベース型のGLORYx、ヒューリスティック型のTIMESを選定し、解析に用いることとした。

続いて、代謝予測に基づく反復投与毒性予測の事例を検討した。クロロニトロベンゼン類を対象に、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って反復投与毒性の主要な標的と毒性レベルを予測した。

既存情報の収集と解析により、ニトロ基のアミノ基への還元のプロセスで生成される反応性が高いN-水酸化体またはニトロソ体による生体高分子との付加体形成およびグルタチオン(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する類似性の仮説が設定された。そこで、評価対象物質に対する類似物質の実測代謝物(クロロアニリンおよびGSH抱合体)を3つの代謝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することを確認した。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、類似物質の既存の毒性データの信頼性と、毒性を過小に予測しないことなどに留意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NOAEL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。

炭素数2かつハロゲン数2~6のハロアルカン類は、ラットに対して肝毒性を引き起こすが、構造と毒性の強さとの関係は複雑である。既存の毒性機序に関連する情報を統合すると、主に肝のCYP2E1等により還元的脱ハロゲン化を受けて生成する反応性が高いハロゲン化エチルラジカルが、強い肝毒性に関連している可能性が示唆された。一方、分子内にメチル基をもつハロアルカンは、気体への溶解度が高く、肺から速やかに排出されることにより、肝を含めて全身の毒性が低減することが示唆された。

強い肝毒性が観察され、実測の代謝データがあるハロアルカン類の肝臓における還元的脱ハロゲン化の予測は、Meteorが優れていることが示された。肝毒性既知で代謝データがない物質を、リードアクロスで予測できることを事前に確認した後、毒性と代謝データがない評価対象物質を、代謝予測結果に基づき既存の類似物質とグループ化し、リードアクロスを行うことにより、肝毒性とそのNOAEL値を安全サイドに立って予測した。

実験動物で観察された主要な毒性のヒトへの外挿に対して、その信頼性を向上させる観点から、ヒトCYP代謝予測モデルの化学物質に対する性能を評価した。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）を選択した。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良好な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、反応部位の予測性は高くなかった。反応部位の予測精度が極めて高い（ $\geq 99\%$ ）とされるYamazoeの基質テンプレートシステムに基づくモデルの利用には、立体有機化学の専門的知識と、Chem3D上の手動

の操作が必要である。ハードウェアおよびソフトウェアの動作環境の整備とワークフローの理解・習熟に取り組み、基質テンプレートへの当てはめが比較的容易な低分子について、代謝部位予測の再現性を確認した。

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の事例検証を行うために、HDAC阻害から催奇形性発現に至るAOPを対象に、Derek Nexusおよび文献情報を用いて、6つの試験法と1つの構造アラートを特定し、適切なキーイベント（KE）に関連付けた。Case 1では、催奇形性物質として知られているバルプロ酸を例として、AOP中の各KEに関連する試験法でも陽性結果を示すことから、本AOPの堅牢性を確認できた。Case 2では、2-エチル酪酸を例として、限定的なHDAC阻害活性のデータに対し、催奇形性を仮説検証するために必要な試験系の選別ができた。Case 3では、スタチン類似構造化合物群の限定的なHDAC阻害活性に対して、ゼブラフィッシュ陽性結果を加えることでHDAC阻害による潜在的な発生毒性物質群であることを推定できた。

生殖発生毒性AOPの開発に向けて、ECHA REACHに提出されたOECDガイドラインに準拠した生殖発生毒性試験2278件の試験データをキュレーションし、1590化合物（陽性558物質、陰性1032物質）を解析用のデータセットとした。これを、Lhasaが所有する生殖発生毒性AOPネットワークに照らし合わせると、約半数の化合物について、何らかのネットワーク関連情報を含むことが確認できた。このAOPネットワークの知識を用いて、データギャップの特定を試みた。まず、ネットワークに含まれる化合物と完全に一致した構造による照合を行うと、100物質については、陽性物質あるいはそれに関連するネットワークで陽性と判断できることとなり、検出感度は約20%であった。次に、フィンガープリント法による類似構造についてAOPネットワークとの関連性を照合すると、Tanimoto類

似閾値 80%の場合には、感度は 45%まで上昇した。さらに、Derek Nexus と比較した場合、陽性化合物の予測率を改善できる可能性があり、現在の AOP ネットワーク内でカバーしていないと思われる主要な偽陽性に関して調査を行ったところ、ミトコンドリア毒性に関するアラート、トポイソメラーゼ II 結合に関するアラートなどが含まれていた。

C.4. IVIVE用のPBKモデル構築のための基盤整備 (松本)

令和3年度は、エストロゲン受容体アゴニストや医薬品を対象にした16の*in vitro*アッセイ等のIVIVEを調査し、様々な臓器コンパートメントで構成されたPBKモデルをR言語で構築し、血中濃度を適切に再現できることを確認するとともに、*in silico*推定法は、主に組織/血液間の分配係数に適用され、その他のパラメータは、主に*in vitro*法で推定されていることを確認した。既存研究の手法やオンラインの推定ツールおよび検索ツールによる推定値を、既報文献値と比較した結果、血漿蛋白質非結合割合と肝クリアランスの値にかなりバラツキがあることが明らかになった。さらに、構築したPBKモデルと、オンラインデータベースや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に供した結果、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*試験の子宮肥大試験の影響量の中央値の1/10~10倍の範囲内に入り、現状でIVIVEの試行的に行うことは可能と判断した。

令和4年度は、内分泌かく乱影響に関するIVIVEのケーススタディに適用するために、血液、脂肪、高血流組織、低血流組織、腎臓および肝臓の6コンパートメントで構成され、消化管から吸収された化学物質は肝臓を経由して、血流により各組織に分配されるとともに、肝臓で代謝され、腎臓から排泄される過程を記述するマウスPBKモデルを構築した。マウスの生理学的パラメータは、令和3年度の調査で得られた値を採

用した。体内動態推定に必要な組織/血液分配係数は、log Kowからモデル内で推定し、肝クリアランスと消化管からの吸収速度定数は、令和4年度に実施したS9蛋白質とCaco2細胞を用いる*in vitro*試験で得られた値をモデル内で*in vivo*での値に変換し、使用した。さらに、DruMAP（国立医薬基盤・健康・栄養研究所）およびCompTox Chemicals Dashboard（U.S. EPA）から得られた血漿蛋白質非結合割合等から、モデル内で腎クリアランスも推定した。構築したマウスPBKモデルで、ビスフェノールAを対象に、2レベルで単回投与した場合のマウス血中濃度の時間変化を計算し、既報の測定濃度と比較した結果、良い一致が見られ、モデルによる体内動態の推定は妥当であると判断された。さらに、物質に固有の入力パラメータ（分配係数、*in vitro*測定固有クリアランス、Caco-2透過速度等）が血中最大濃度に及ぼす感度を解析した結果、*in vitro*測定固有クリアランスとCaco-2透過速度に感度が高く、これらのパラメータを測定することが重要であることが示された。また、代謝安定性試験で得られた4- α -cumylphenolの肝クリアランスについてのパラメータを用い、エストロゲン受容体(ER)アゴニスト活性に関する*in vitro*アッセイのAC50値やACC値から外挿した等価*in vivo*影響用量は、マウスの子宮肥大試験のNOELやLOELの値と大きな相違はなく*in vitro*アッセイデータのIVIVEは有用と思われた。

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。LLNA EC3値情報が得られた128物質を用いて、CatBoost 1.0.3 (python 3.9.7)による回帰モデルを構築し、一つ抜き交差検証を実施したところ、決定係数R²値が0.7とな

り高性能なモデルが得られた。また、ECETOCによる4段階の感作性強度カテゴリーに予測EC3値を分類したところ、**extreme**に属する強感作性物質8物質のうち4物質を正しく予測することができた。特に、感作性の強い代表的な酸化染料であるパラフェニレンジアミン(pPD)とその3量体であるバンドルスキーベース(BB)の予測結果を確認したところ、pPDの本モデルでの予測値は0.26 (実験値0.11, **strong**)、BBの予測値0.06 (実験値0.03, **extreme**) であり、モデルの改良により強感作性物質の予測も可能となった。

令和3年度に構築したKeratinoSens™の予測モデル化では、Hoffmann (2018)らの文献から122物質を訓練用データセット、Urbisch (2015)らの文献から102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と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種から選択された7種の記述子を説明変数とした。XGBoost 1.4.2 (python 3.8.12)による分類モデル (KeratinoSens™の陽性、陰性を判別) は、検証用データセットにおいて、正確度0.80、ROC-AUC 0.84の高い予測性能を示した。そこで、令和4年度は、Defined Approachである2 out of 3 DA (OECD TG No.497)の組み合わせ評価において、使用するKeratinoSens™の結果を実験値の場合と、我々のモデルによる予測値の場合で比較した。検証用データセットに用いたUrbisch (2015)らの文献から48物質を用いた。2 out of 3 DAによる感作性判定結果と、LLNAにおける感作性の有無の一致率を確認した。KeratinoSens™の実験値を使用した2 out of 3 DAでは、LLNAの結果との一致率0.73、感度0.85、特異度0.47だった。一方で、KeratinoSens™の*in silico*予測値を使用した場合は、一致率0.77、感度0.82、特異度0.67だった。以上の結果から、KeratinoSens™の予測モデルは組み合わせ評価において有用である可能性が示唆された。

ヒトの皮膚感作性予測モデルにおいて、令和3年度に学習データとして使用したGolden (2020)らの文献に加えて、Hoffmann (2022)、Basketter

(2014)、Api (2017)らの文献情報を追加し、陽性293物質、陰性182物質を学習用データセットとした。また、これまでの検証用データセットは陽性物質と陰性物質の不均衡が大きかったため、Hoffmann (2022)、Basketter (2014)、Api (2017)の3つの信頼性が高い文献情報から40物質 (陽性20物質、陰性20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から変数重要度の高い143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0.90、特異度0.65、ROC-AUC 0.88であり、高い予測性能を示した。モデルはPython3.8.5のCatBoost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 (古濱・杉山・本間)

i) 第一回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。精査で得られた情報から、TA100、TA98、TA1535株で91%の陽性を網羅できるが、完全に網羅するにはOECD TG 471準拠の残り二菌株の情報も重要となる。同様に代謝活性化条件を考慮しないと27%の陽性の網羅が不可能である。これらは新規化学物質の陽性の特徴を示す情報になる。今後は化学物質の部分構造・アラート構造毎に菌株依存性や代謝活性化依存性について調査・考察することが、Ames/QSAR深化に不可欠な変異原性メカニズム理解の上で必要となる。なお、以上の知見については、文書にまとめた。

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予測が難しいアラート構造が挙げられる。これらの物質に対し、Ames試験を行い、情報を更新することはAmes/QSARの改善に直接寄与する。前者の典型である芳香族N-ニトロソ化合物に注目して、令和3, 4年度で合計15試験を実施した。Ames試験陰性の物質には立体的にかさ高い芳香環とニトロソアミンが結合

している特徴も見受けられた。既存の市販QSARツールの予測結果やデータベースの結果との不一致も明らかになった一方で、OASIS TIMES Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03モデルでは15物質中13物質の予測とAmes試験結果が一致する結果が得られた。今後はQSARの構築に必要なアラート構造の提案と予測の基盤になる変異原性メカニズムの解明を目指す。同時に、発がん性や他の遺伝毒性エンドポイントとの関連性に関する考察を深め毒性予測の深化につなげる必要もある。

iii) 第二回プロジェクトのBest modelで感度が60%以上の4モデルの共通点は、第一回プロジェクトに参加したチームであった。過去のチャレンジでの経験が精度向上に資する要因のひとつだと考えられる。この成果は原著論文文化に向けて取りまとめ中である。

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

反復投与毒性の発現につながる代謝予測の信頼性を評価し、向上させる方法を検討した。多くの代謝予測モデルは、推定代謝物構造を数多く提示し、その取舍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し、透明性と一貫性のある予測を実現するためには、評価対象物質の類似物質の実測代謝を正しく予測できるか、すなわちそれぞれのモデルの局所的な予測精度を評価し、予測性が高いモデルの結果を適用することが、有効であると示唆された。

このアプローチは、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信頼性評価の考え方の一部と調和させている。他の物質群への展開を図って試行事例を積み重ねることにより、代謝の類似性に基づく反復投与毒性予測が可能とな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。令和4年度は、点在する既報の代謝物構造情報の収集と一元化を進めた。

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、想定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の代謝予測の結果は、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。予測精度の評価とワークフローの詳細化を継続し、複数のモデルを組み合わせて試用するなどにより、代謝予測の不確実性を低減させ、信頼性を向上させる方法を確立する必要がある。

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)

令和3年度の事例研究による検証では、HDAC阻害から催奇形性に至るAOPを用いて、リスク評価における適用ケースに焦点を当てた。その結果、AOPネットワークの各KEに関連する試験法の結果を利用することによって、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、複数の試験法を組み合わせた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。令和4年度に実施した既存AOPネットワークを用いたECHA REACHの生殖発生毒性試験データセットに対する陽性予測の検証では、20%程度の検出感度しかなく、さらなるAOPの開発が必要であることも示された。しかし、AOPネットワークとの関連性の構造検索において、類似構造検索も活用すると、感度は45%まで増加することが示された。偽陽性を示した物質を検証することで、現状のAOPネットワークを改良することが可能であることも示された。

D.4. IVIVE用のPBKモデル構築のための基盤整備 (松本)

内分泌かく乱影響のIVIVEケーススタディに適用可能な汎用マウスPBKモデルを構築し、bisphenol Aの実験データで検証を行った結果、構

築したマウスモデルは利用可能と判断することができた。血中最大濃度に及ぼす感度を解析した結果、*in vitro*測定固有クリアランスとCaco-2透過速度に感度が高く、これらのパラメータを測定することが重要であることが示された。Caco-2細胞を用いた細胞膜透過性試験及びマウス肝臓S9画分を用いた*in vitro*代謝安定性試験を実施したが、難溶性物質が多く特に胞膜透過性試験に困難を要した。最終年度は、*in vitro*測定によりパラメータの整理を進め、*in silico*推定も活用しつつIVIVEの実用性を検討する必要があると考えられる。

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）

OECDのDefined Approachのガイドライン（No.497）データを学習データとし、ガイドライン化されている*in vitro*試験結果とQSAR QSAR ToolBoxから得られる信頼性の高い情報のみを使用したLLNA EC3予測モデルは、NAMを活用した化学物質の皮膚感作性評価におけるDefined Approachとして有用な機械学習モデルとなる可能性が高い。また、KeratinoSens™を対象とした*in vitro*実験値の予測モデル化では、2 out of 3 DAの組み合わせ評価においても、実験値と同等またはそれ以上の性能が示され、*in vitro*試験の効率化も期待できる。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、感作性の有無を判別する機械学習モデルを構築し、適切な検証用データにおいて性能の高さが確認できた。令和5年度は、*in silico*モデルの透明性、解釈性を重視し、ケーススタディを通して適用領域や変数重要度、予測結果の信頼度を精査することで、予測結果の信頼性評価への課題を整理する。本モデルに対して、OECDが取りまとめているQSARモデルの予測結果の信頼性を評価する方法の原則に従って、規制評価に必要な情報の明確化を検討する。

E. その他 -OECDにおける国際調和活動への貢献と最新動向の本研究事業へのフィードバック-

本研究班は、OECDと連携して新規評価手法の開発と国際調和の活動に貢献しつつ、最新の国際動向を収集して本研究へフィードバックさせることを目指している。

2019年のOECD QSAR Toolbox Management Group会議では、化審法既存点検事業の四半世紀に及ぶ試験報告書を用いて本分担研究で作成した生殖発生毒性のデータベースを、QSAR Toolboxと共有することを表明し、信頼性と透明性が高いデータ提供を歓迎された。同データベースは完成し、データキュレーションとデータベースの構築方法、ケミカルスペースの分析結果などを取りまとめて2021年に論文発表した後、ヒト毒性エンドポイント予測に関する機能の大きな改良が行われたQSAR Toolbox ver.4.5（2022年公開）に実装された。QSAR Toolboxに格納されているECHA REACHなどの既存の生殖発生毒性データとは物質の重なりが極めて少なく、ケミカルスペースを拡張できたことから、AOPの開発やカテゴリーアプローチによるリードアクロス予測の適用範囲の拡大が期待される。2021年より開始されたOECD QSAR Assessment Frameworkプロジェクトは、化学物質の規制安全性評価のエンドポイントについて、そのQSARモデルの予測結果の信頼性を評価する方法の原則を、ガイダンスとして取りまとめることを目標としている。本研究班の専門家（古濱、山田）は、QSARモデルのデータセット構築、予測精度の評価、予測結果に基づく安全性評価のケーススタディの作成などの経験を活かして、本ガイダンスの、“第1章：QSARモデルの規制評価”における“試験データの透明性と品質”、“第2章：QSAR結果の規制当局による評価”における“予測の信頼性”、“第4章：複数の予測から得られた結果の評価”、具体的手順と実践的アドバイスを整理した“QSARモデルと予測結果の評価のためのチェックリスト”の開発に大きく貢献した。さらに、ガイダンス案に基づくQSAR予測結果の

信頼性評価のケーススタディを提供し、関連情報としてOECDのHPに掲載されることとなった。

本OECDガイダンスは、2023年前半に完成予定であることから、その最新動向を本研究事業の成果へ取り込むことを目指す。“分担研究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”で開発する新しい予測モデルには、本OECDガイダンスに基づき、予測モデルと予測結果の規制評価に必要な情報の開示を検討する。また、OECD QSAR Assessment Frameworkの考え方は、全身毒性に関連する*in silico* NAMの予測モデルの評価や、その出力結果の信頼性評価にも適用を検討すべきであると考えられ始めており、“分担研究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”の成果の取りまとめに反映させる予定である。

F. 結論

精緻化した安衛法Ames試験結果のデータベースで得られた菌株や代謝活性化情報と陽性の関係について解析を進めた。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*N*-ニトロソ15化合物のAmes試験実施し、試験結果の考察を進めた。第二回国際プロジェクトは総括の段階である。

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、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、予測の信頼性を評価して不確実性を低減させ、代謝の類似性に基づいて毒性発現を予測する方法の妥当性を検証した。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。

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を用いたリスク評価への適用事例において、AOPネットワーク内の各試験法の結果によるAOPの堅牢性の検証、追加の試験戦略、類似化合物のMOA予測など総合的な試験評価戦略の開発に役立つことが明らかとなっ

た。一方、既存のAOPネットワークを用いたECHA REACHの生殖発生毒性試験データに対する予測感度は20%程度しかなく、さらなるAOP開発の必要性も明らかとなったが、類似構造検索を活用することにより感度は上昇し、偽陽性を示した物質を中心的に検証することによってAOPネットワークを改良可能であることも示された。

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言語によって予測モデルを再現できた。内分泌かく乱影響に関するIVIVEのケーススタディに適用可能なマウスPBKモデルを構築し、既報のマウス血中濃度で検証し、モデルは適切に化学物質の体内動態を再現することを確認した。

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、感作性強度を予測する回帰モデルを構築した。また、皮膚感作性のキーイベントである*in vitro*実験結果を*in silico*で予測する高性能なモデルを構築し、Defined Approachへの適用を検証した。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、適用領域も設定した。

以上、本研究では、規制安全性評価に対応するエンドポイントを対象に、*in silico*予測モデルの開発・改良のための高信頼性データセットの作成、代謝とAOPに基づく予測モデルの開発と不確実性を考慮した適切な活用方法の検討に取り組んでおり、順調に推移している。これらの成果は、国際動向を踏まえた化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤となるものである。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Thakkar S, Slikker W, Yiannas F, Silva P, Blais B, Chng KR, Liu Z, Adholeya A, Pappalardo F, Soares MdLC, Beeler P, Whelan M, Roberts R, Borlak J, Hugas M, Torrecilla-Salinas C, Girard P,

- Diamond MC, Verloo D, Panda B, Rose MC, Jornet JB, [Furuhama A](#), Fang H, Kwegyir-Afful E, Heintz K, Arvidson K, Burgos JG, Horst A, Tong W: Artificial intelligence and real-world data for drug and food safety – A regulatory science perspective, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2023, 140, 105388.
2. Petkov PI, Ivanova H, [Honma M](#), [Yamada T](#), Morita T, [Furuhama A](#), Kotov S, Kaloyanova E, Dimitrova G, Mekenyan O. Differences between *in vitro* and *in vivo* genotoxicity due to metabolism: The role of kinetics. *Comp. Toxicol.* 2022, 22: 100222.
 3. 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.* 2021, **43**, 16.
 4. Murayama N, [Yamada T](#), Yamazoe Y. Application of CYP1A2-Template system to understand metabolic processes in the safety assessment. *Food Safety*, 2022, 10, 129-139.
 5. [Yamada T](#), Kawamura T, Tsujii S, Miura M, Ohata H, Katsutani K, [Matsumoto M](#), [Hirose A](#). Formation and evaluation of mechanism-based chemical categories for regulatory read-across assessment of repeated-dose toxicity: a case of hemolytic anemia. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2022, 136, 105275.
 6. [Yamada T](#), Katsutani K, Maruyama T, Kawamura T, Yamazaki H, Murayama N, Tong W, Yamazoe Y, [Hirose A](#), Combined risk assessment of food-derived coumarin with *in silico* approaches. *Food Safety*. 2022, 10, 73-82.
 7. Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, [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.* 2022, 47, 77-87.
 8. 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.* 2022, 85, 184-197.
 9. [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.* 2021, 8, 195-204.
 10. [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.* 2021, 46, 531-538.
 11. 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.
 12. [Yamada T](#), Kurimoto M, [Hirose A](#), Yang C, Rathman J: Development of a new threshold of toxicological concern database of non-cancer toxicity endpoints for industrial chemicals. *Front. Toxicol.* 2021, 3: 1-9.
 13. Yamazoe Y, [Yamada T](#), [Hirose A](#), Murayama N: Deciphering key interactions of ligands with CYP3A4 -Template system. *Food Safety*. 2021, 9(1), 10-21.
 14. 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, 150, 4-12
 15. Rovida C, Escher SE, Herzler M, Hougaard Bennekou S, Kamp H, Kroese, DE,

- Maslankiewicz L, Moné MJ, Patlewicz G, Sipes, N, van Aerts L, White A, Yamada T, van de Water B: NAM-supported read-across: From case studies to regulatory guidance in safety assessment. *ALTEX*. 2021, 38(1), 140-150.
16. Ohno A, Okiyama Y, Hirose A, Fukuhara K., The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 441, 115974, 2022.
 17. 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) 2022, **247**(1), 1-75.
 18. Kawashima A, Inoue K, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Matsumoto M, Masumura K, Hirose A. Derivation of human health hazard assessment values for toluene under the Japanese Chemical Substances Control Law. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2022, 9(4), 123-133.
 19. Tanabe S, Quader S, Ono R, Cabral H, Aoyagi K, Hirose A, Yokozaki H, Sasaki H., Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021, 13(22), 5786.
 20. Inoue, K, Shigeta, Y, Umemura, T, Nishiura, H, Hirose, A. Application of the Benchmark Dose Method to the Incidence Data for Various Pathological Findings and Its Validation Analysis, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 2021, 62(2), 56-64.
 21. Murata Y, Umano T, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Masumura K, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VIII). *Bull. Natl Inst. Haelth Sci*. 2022, 140, 54-60.
 22. Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta 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 mice. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2022, 9(2), 31-36.
 23. 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*. 2021, **122**, 104914.
 24. 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*. 2021, **8**, 103-116.
 25. 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*. 2021, **139**, 71-78.
 26. Ambe K., Akita A., Wei J., Yoshii Y., Onishi M., Tohkin M. Comparison of Efficacy and Safety of Direct Oral Anticoagulants and Warfarin between Patients in Asian and Non-Asian Regions: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *Clin Pharmacol Ther*. Mar 2. doi: 10.1002/cpt.2881. 2023, Epub ahead of print.
 27. Ashikaga T, Narita K, Kobayashi M, Tachibana

- S, Murasaki W, Suzuki M, Ambe K, Tohkin M. Skin sensitization potency prediction of ingredients in hair colorants using *in silico* models of machine learning. *Journal of Japanese Cosmetic Science Society*. 2023, 47(1), 1-5.
28. 安部賀央里 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発 コスメティックステージ 2023, 2月号 60-65.
29. 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*. 2021, 45(4), 331-335.
30. 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.* 2021, 125, 105019.
31. 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.* 2021, 4(2), 756-763.
4. Furuhama A, Sugiyama K, Honma M: Overview of Outcomes of 2nd Ames/QSAR Project. International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) 2022 (2022.8.27, Ottawa)
5. 井上 薫、鈴木 洋、橋本 清弘、三島 雅之、古濱 彩子、杉山 圭一、広瀬 明彦：量変異原性不純物として検出されたニトロソアミン類の変異原性及び発がん性ポテンシャルに応じた管理のための条件の検索. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022/7/2, 北海道)
6. 古濱 彩子、杉山 圭一、本間 正充：大規模変異原性データを用いた第二回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト. 構造活性相関フォーラム 2022 (2022.6.3, Online)
7. 古濱 彩子：遺伝毒性評価における *in silico* 解析について. 第 19 回食品安全フォーラム (2021.12.10, 東京)
8. 杉山 圭一：食品用器具・容器包装のポジティブリスト制度における遺伝毒性評価の概要. 第 19 回食品安全フォーラム (2021.12.10, 東京)
9. 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)
10. 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)
11. 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)
12. Yamada T, Meiseki Y, Watanabe-Matsumoto S, Yamamoto S, Katsutani N, Yoshida K, Constructing a database of parameters for physiologically based kinetic modeling to predict toxicokinetics of inhalation exposure to industrial

2. 学会発表

1. Honma M: International QSAR Challenge for Mutagenicity. Prediction of Mutagenicity by in silico Tools. 62nd SOT Annual Meeting (2023.3.23, Nashville, USA)
2. 古濱 彩子、杉山 圭一、本間 正充：物質の芳香族並びに環状 N-ニトロソ化合物の Ames 変異原性の探求. 日本環境変異原ゲノム学会 第 51 回大会 (2022.11.15, 広島)
3. Morita T, Furuhama A, Sugiyama K: Contraception of Genotoxic Pharmaceuticals in Japanese Market. ICEM 2022 (2022.8.29, Ottawa)

- chemicals, Society of Toxicology 62nd Annual Meeting (2023.3.21, Nashville)
13. 山田 隆志 : 次世代リスクアセスメント (NGRA) のケーススタディの開発と行政受入へ向けた考慮事項, 日本動物実験代替法学会第 35 回大会 (2022.11.20, 静岡)
 14. 山田 隆志, 辻井 伸治, 三浦 稔, 齊藤 亮子, 川村 智子, 丸山 多恵子, 勝谷 成男, 広瀬 明彦 : IATA による化学物質の神経毒性評価を補完する *in silico* アプローチ: 神経毒性に関連する部分構造と物理化学的および生化学的パラメータを用いたカテゴリーの精緻化, 日本動物実験代替法学会第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
 15. Yamada T, Tsujii S, Miura M, Saito A, Kawamura T, Maruyama T, Katsutani N, Hirose A, *In silico* approach that supports neurotoxicity assessment of chemical substances by IATA: Refining categories by using substructures and physicochemical and biochemical parameters related to neurotoxicity, 11th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (2022.10.20, Chapel Hill)
 16. 山田 隆志 : ヒト用医薬品の環境リスク評価を支援する生態毒性データベースと予測の不確実性を考慮した *in silico* アプローチの開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
 17. 山田 隆志, 勝谷 成男, 丸山 多恵子, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦 : ピロリジジンアルカロイドの肝毒性評価への New Approach Method (NAM) の適用, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
 18. 勝谷 成男, 山田 隆志, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦 : 食品中に含まれるクマリンの肝毒性リスク評価についての *in silico* アプローチ, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
 19. 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)
 20. 山田隆志 : 化学物質リスク評価に資する *in silico* アプローチの改良と国内における行政的受け入れ拡大への取り組み. 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (2021.11.11, 沖縄)
 21. Yamada T, Development and Improvement of *in silico* approaches for accelerating regulatory chemical risk assessment, The 9th congress of AsiaToxIV (2021.10.21, Hangzhou-Online Hybrid)
 22. 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)
 23. 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, 神戸-Online Hybrid)
 24. 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, 神戸-Online Hybrid)
 25. 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)

26. 広瀬明彦：ニトロソアミン不純物の発がんリスク、ICH M7/QSAR ワークショップ（日本環境変異原ゲノム学会 第 51 回大会のサテライトミーティング）（2022.10.21, 東京 Online Hybrid）
27. 田邊 思帆里, カデール サビーナ, 小野 竜一, カブラル オラシオ, 青柳 一彦, 広瀬 明彦, Edward J PERKINS, 横崎 宏, 佐々木 博己：治療抵抗性胃がんに関する Adverse Outcome Pathway (AOP；有害性発現経路) の開発、第 49 回日本毒性学会学術年会（2022.6.30-7.2, 札幌）
28. 小野 竜一, 山本 雄介, 成瀬 美衣, 田邊 思帆里, 吉岡 祐亮, 相崎 健一, 広瀬 明彦, 落谷 孝広, 平林 容子, 北嶋 聡：cfDNA による毒性評価、第 49 回日本毒性学会学術年会（2022.6.30-7.2, 札幌）
29. 大野 彰子, 沖山 佳生, 広瀬 明彦, 福原 潔：3 ニトロ多環芳香族炭化水素の変異原性：ニトロ基の付加位置に関する *in silico* 解析、第 49 回日本毒性学会学術年会（2022.6.30-7.2, 札幌）
30. 牛田 和夫, 井上 薫, 甲斐 薫, 山下 ルシア幸子, 鈴木 洋, 広瀬 明彦：化審法のリスク評価（一次）評価 I での発がん性定量的評価のために求められる変異原性評価のあり方：閾値の有無に関する再検討、第 49 回日本毒性学会学術年会（2022.6.30-7.2, 札幌）
31. 井上 薫, 鈴木 洋, 橋本 清弘, 三島 雅之, 古濱 彩子, 杉山 圭一, 広瀬 明彦：微量変異原性不純物として検出されたニトロソアミン類の変異原性及び発がん性ポテンシャルに応じた管理のための条件の検索、第 49 回日本毒性学会学術年会（2022.6.30-7.2, 札幌）
32. 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)
33. 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）
34. 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）
35. 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)
36. 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）
37. 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）
38. 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）
39. 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）

40. 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)
41. 松本 真理子, 広瀬 望, 磯 貴子, 村田 康允, 重田 善之, 馬野 高昭, 広瀬 明彦: Derivation of a target value of perfluorooctanoic acid in drinking water. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2)
42. 磯 貴子, 村田 康允, 重田 善之, 広瀬 望, 馬野 高昭, 堀端 克良, 増村 健一, 杉山 圭一, 松本 真理子, 広瀬 明彦: Evaluation of the *in vivo* mutagenicity of Carbendazim. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2)
43. 村田 康允, 磯 貴子, 重田 善之, 広瀬 望, 馬野 高昭, 堀端 克良, 増村 健一, 杉山 圭一, 松本 真理子, 広瀬 明彦: The gene mutation test of styrene using the transgenic mouse. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2)
44. 重田 善之, 広瀬 望, 磯 貴子, 村田 康允, 馬野 高昭, 松本 真理子, 広瀬 明彦: GHS classification study of substances that caused occupational accident. 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2)
45. 松本 真理子, 環境化学物質系 3 学会合同大会「新興化学物質の人健康影響に関する講演」(招待講演) (2022. 6. 15)
46. Matsumoto M, Murata Y. Hirose N, Iso T, Shigeta Y. Umano T, Hirose A : Derivation of a target value of 1,3-butadiene, a possible contaminant, in drinking water (ICT/EUROTOX2022) (2022.9.18-21)
47. 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)
48. 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)
49. 濱上 敦史, 土井 更良, 安部 賀央里, 頭金 正博: JAPIC AERS と機械学習を活用した胆汁うっ滞型薬物性肝障害の予測モデルの開発. 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.25 - 3.28, 札幌)
50. Kaori Ambe: Development of *in silico* model for skin sensitization evaluation using machine learning. ACAAE2022 the 3rd Asian Congress for Alternatives to Animal Experiments (2022.12.14-12.16, 韓国 済州島- Online Hybrid)
51. 片山 早紀, 安部 賀央里, 頭金 正博: 化学構造情報と *in vitro* 情報を使用した特異体質性薬物性肝障害の予測手法の開発. 第 5 回医薬品毒性機序研究会 (2022.12.8-12.9, 東京)
52. 渡邊 崇, 安部 賀央里, 頭金 正博: 機械学習を用いた添付文書への重大な副作用の追記予測. 第 43 回日本臨床薬理学会学術総会 (2022. 11.30-12.3, 横浜)
53. 大西 真由, 吉井 優花, 劉 臨風, 安部 賀央里, 頭金 正博: 臨床試験データを用いた生物学的製剤および JAK 阻害薬のメトトレキサート併用療法における有効性と安全性に関する研究. 第 43 回日本臨床薬理学会学術総会 (2022.11.30-12.3, 横浜)
54. 木下 啓, 安部 賀央里, 足利 太可雄, 頭金 正博: 皮膚感作性評価における *in vitro* 試験法の効率化を目指した機械学習モデルの開発. 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.18-11.20, 静岡)
55. 伊藤 潤, 安部 賀央里, 足利 太可雄, 頭金 正博

- 博：化学構造情報からヒトの皮膚感作性を予測する機械学習モデルの開発。日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.18-11.20, 静岡)
56. 榎波 多真奈, 安部 賀央里, 頭金 正博：化学構造の画像認識技術を用いた機械学習による CYP3A4 阻害活性の予測モデルの開発。日本薬物動態学会第 37 回年会 (2022.11.8-11.10, 横浜)
57. 土井 更良, 安部 賀央里, 頭金 正博：Prediction of drug-induced liver injury *in silico* using large-scale adverse event database. CBI 学会 2022 年大会 (2022.10.25-10.27, 東京)
58. 吉井 優花, 大西 真由, 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の解析。第 32 回日本医療薬学会年会 (2022.9.23-9.25, 群馬・ハイブリッド)
59. 青木 優佳, 安部 賀央里, 村島 美穂, 濱野 高行, 頭金 正博：低 Na 血症の発症を予測する機械学習モデルの構築。第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26, 東京)
60. 木下 啓, 安部 賀央里, 足利 太可雄, 頭金 正博：皮膚感作性の *in vitro* 試験法である KeratinoSensTM の結果を予測する機械学習モデルの構築。第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26, 東京)
61. 吉井 優花, 大西 真由, 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 (DMARDs) の安全性の研究。第 6 回日本臨床薬理学会東海北陸地方会 (2022.7.30, オンライン)
62. 村崎 亘, 安部 賀央里, 頭金 正博、山田 隆志、足利 太可雄：機械学習アプローチによる皮膚感作性強度を予測する回帰モデルの開発。第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
63. 安部 賀央里：ヒトの副作用予測に向けた機械学習アプローチ シンポジウム 13 「計算機科学を活用したヒトの有害事象研究の現状と展望」。第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
64. 土井 更良, 安部 賀央里, 頭金 正博：FAERS を用いた機械学習による薬物性肝障害の予測モデルの開発。第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
65. 安部 賀央里, 成田 和人, 小林 睦, 立花 滋博, 村崎 亘, 鈴木 政晴, 頭金 正博, 足利 太可雄：機械学習アプローチを用いた *in silico* モデルによるヘアカラー原料の皮膚感作性強度予測。第 47 回日本化粧品学会 (2022.6.10-6.11, 東京-Online Hybrid)
66. 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)
67. 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)
68. 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)
69. 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)
70. 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)
71. 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)
72. 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)
73. 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)
74. 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)
75. 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)
76. 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)
77. 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)
78. 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)
79. 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)
3. シンポジウム/講習会/Work Groupでの発表
1. 山田 隆志: ヒト健康影響に係る化学物質安全性データベースの開発および情報科学技術の導入によるリスク評価の迅速化へ向けた課題. 化学物質の安全管理に関するシンポジウム—Society 5.0 実現に向けた化学物質管理に係るデータ利活用の推進—, 化学物質の安全管理に関するシンポジウム実行委員会主催, 内閣府等共催 (2022.12.21, Online)
2. Yamada T, Maruyama-Komoda T, Furuhama A. QSAR evaluation trial based on the checklist - Case study on prediction of Ames mutagenicity using two QSAR models-, OECD Meeting of the QSAR Assessment Framework Working Group (2022.11.15, Paris)
3. 山田 隆志: ヒト健康影響に関連した QSAR とリードアクロス. 令和 4 年度 QSAR/リードアクロス講習会, 独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター主催, 環境省 大臣官房環境保健部後援 (2022.10.17, Online)
4. Yamada T, Read-across case studies for repeated-dose toxicity of chemicals: Lessons learned from the OECD IATA case studies project. The 9th European Food Safety Authority (EFSA) Read-across Work Group Meeting. (2022.9.28, Parma-Online Hybrid)
- H. 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4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 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 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 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 副所長

研究要旨

*In silico*による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）は行政での活用が進んでいる。Ames/QSAR の活用拡大を目指し、QSAR の高度化に資する Ames 試験データの精緻化を進めると同時に、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21チームから得られた結果の総括を行った。

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り、これまで報告書に基づく専門家判断を含めた精査・詳細データの解析を実施してきた。令和4年度はサルモネラ菌 TA100、TA98、TA1535 株でのそれぞれ代謝活性化・非活性化条件での試験結果に注目して解析を実施した。TA100、TA98 株の組合せで81%、TA100、TA98、TA1535 株の組合せで91%の Ames 試験陽性の網羅が可能であった。

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 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 *N*-ニトロソ 15 化合物の Ames 試験実施し、試験結果の考察を進めた。

A. 研究目的

現在、化学物質の人健康影響評価には Ames 変異原性試験の結果が用いられている。Ames 変異原性を定量的構造活性相関（QSAR）によって予測・評価する流れは、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進められている。化学物質の規制上での Ames 変異原性予測（Ames/QSAR）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、本アプローチの深化が求められている。

令和4年度は国際共同研究によるモデルの向上の取り組みに加え、Ames 試験データの解析を行い Ames/QSAR の高度化に資する情報を収集することを目的とする。

B. 研究方法

B1. Ames 試験結果の再評価と考察

再評価対象は第1回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの評価対象物質であり、第2回物質の学習データに相当する12,140物質の安衛法試験結果とした。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）、C判定（Ames試験における陰性判定物質）評価の精査結果から、Ames試験結果の陽性条件の菌株・代謝活性化条件を整理した。Ames試験の標準的5菌株の試験のうち、すべての入手可能な報告書で結果が記載されていたサルモネラ菌 TA100、TA98、TA1535株でのそれぞれ陽性・陰性の分類と解析も同時に実施した。

実際に報告書の入手が可能な報告書は限られており、詳細な評価対象に該当したのは10,673物質（表1：A判定605、B判定986、C判定：9,082）となった。データの精査の詳細については、令和3年度「*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」の分担報告書等に記載されている。

B2. Ames 変異原性試験の実施

芳香族 N-ニトロソ化合物に注目し、令和3年度（FY2021）の6物質に加え令和4年度（FY2022）は9物質の Ames 試験を実施した。被験物質の名称・CAS 番号純度・用いた溶媒ならびは表2、構造は図1の通りである。本研究では、代表的な商業 QSAR モデル、知識ベースの Lhasa Limited 社 (UK) の DEREK Nexus (ver. 6.2.1, Nexus 2.5.2)、及び統計ベースの MultiCASE 社 (USA) の CASE Ultra (GT1_BMUT モジュール、ver. 1.9.0.2 および GT1_BMUT 1.8.0.1) を用い

た QSAR 評価をおこなった。このほかにブルガス大学 数理化学研究所（ブルガリア）の OASIS TIMES 2.31.2 における Ames mutagenicity v.18.18 モデルと Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03 モデルの Ames 予測結果との比較も行った。後者の S9 activated kinetic は速度論的 *in vitro* Ames 変異原性モデルを指し、令和2年度「インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの評価戦略の開発」分担課題「代謝予測モデルの改良による MoA に基づいた *in vivo* 遺伝毒性予測性の向上に関する研究」に速度論的モデルの詳細が記載されている。

B3. 第二回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの総括

第二回プロジェクト参加各チームは複数のモデルによる予測結果を提出可としたうえで、結果を知る前に各チーム内での Best model を1つ選択するように依頼していた。参加チームのそれぞれ Best model と全ての約50モデルの2パターンで統計量の評価を実施した。

（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. Ames 試験結果の再評価と考察

評価対象とした10,673物質について、図2に代謝非活性化ならびに活性化条件と Ames 試験陽性の関係のベン図で示した。陽性を示す1,591物質のうち約6割に相当する947物質が代謝非活性化・活性化条件両方で陽性を示した。残りの約4割に相当する624物質は代謝非活性化または活性化条件でのみ陽性を示す。別の表現をすると、

本研究から活性化条件での Ames 試験を実施することで約 3 割の 431 物質の陽性の検知が可能となったことが明らかとなった。

同様に、10,673 物質の陽性の菌株依存性のベン図と概念図を図 3 ならび図 4 に示す。TA100 株の結果で 7 割弱の陽性を網羅し、TA100 と TA98 株の両方・いずれで約 8 割 (81%)、A100、TA98、TA1535 株での陽性の結果で約 9 割 (91%) の陽性が網羅可能となった。なお、代謝非活性化条件では、TA100 株だけで 48%、TA100 と TA98 株の両方・いずれで 57% の陽性が網羅された。換言すると非活性化条件の TA100 株の試験を実施することだけで陽性の半数弱を網羅することが可能な結果が導かれた。

C2. Ames 変異原性試験の実施

Ames 試験結果と QSAR 予測結果を表 3 にまとめた。

令和 3 年度に実施した Ames 試験対象物質は以下の通りである。

FY2021-1: 3-nitrosomethylaminopyridine

FY2021-2: 4-nitrosomethylaminopyridine

FY2021-3: n-nitroso-n-ethylaniline

FY2021-4: benzenamine, n-nitroso-n-phenyl-

FY2021-5: n-nitrosodibenzylamine

FY2021-6: N-methyl-N-phenylnitrous amide

これら 6 物質では、FY2021-4 を除きすべて陽性の結果が得られた。FY2021-1、FY2021-2、FY2021-3、FY2021-5 はハンセンデータの結果と不一致であった。

CASE Ultra の GT1_BMUT モデル (最新版 1.9.0.2 の場合) では、FY2021-1、FY2021-2、FY2021-3 は既知の陰性、FY2021-4、FY2021-5、FY2021-6 は既知の陽性の予測結果となった。FY2021-1、FY2021-2、FY2021-3、FY2021-4 の最新版 1.9.0.2 の予測結果は実試験と不一致となった。なお、FY2021-1、

FY2021-2、FY2021-4 の結果は、最新版 1.9.0.2 と旧版 1.8.0.1 とで相違がみられた。Derek Nexus (最新版 2.5.1) では全て陽性 (PLAUSIBLE) の予測であった。OASIS TIMES Ames mutagenicity v.18.18 モデルでは、FY2021-1、FY2021-5 が陽性、他の 4 物質は陰性の予測結果であり、試験が陽性であった 3 物質で陰性予測となった。一方で OASIS TIMES Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03 モデルでは、6 物質の予測結果が Ames 試験結果と合致した。

令和 4 年度は、9 物質の芳香族 N-ニトロソ化合物に対し Ames 試験を実施した。試験対象物質名は以下の通りである。

FY2022-1: N-Nitrosoanabasine

FY2022-2: Mononitrosocaffeidine

FY2022-3: 2-Nitrosomethylaminopyridine

FY2022-4: N-Nitrosopipicolinic acid

FY2022-5: 1-Nitroso-L-proline

FY2022-6: 1,2,6-Trimethyl-4-nitrosopiperazine

FY2022-7: N-Methyl-p-nitro-N-nitrosoaniline

FY2022-8: N,4-Dinitroso-N-methylaniline

FY2022-9: N-benzyl-N-phenylnitrous amide

FY2022-2、FY2022-5、FY2022-9 は陰性であり、他は陽性の試験結果が得られた。これら 9 物質のうち、ハンセンデータでは、1 物質 (FY2022-2) が陰性、1 物質 (FY2022-3) が陽性の報告であり、今回の Ames 試験結果と一致した。

GT1_BMUT モデル (最新版 1.9.0.2) では FY2022-3、FY2022-4、FY2022-7、FY2022-8、FY2022-9 は既知の陽性、FY2022-1、FY2022-5、FY2022-6 は陽性、FY2022-2 は既知の陰性の予測結果となった。FY2022-5 と FY2022-9 の予測結果は実試験と不一致であった。なお、最新版 1.9.0.2 と旧版 1.8.0.1 とで陽性・陰性の相違は見られなかった。Derek Nexus (最新版 2.5.1) では全て陽性

(PLAUSIBLE) の予測であった。OASIS TIMES Ames mutagenicity v.18.18 モデルでは、FY2022-2、FY2022-3、FY2022-9 が陰性、他の 6 物質は陽性の予測結果であり、FY2022-3、FY2022-5 で実試験結果と矛盾した。一方で OASIS TIMES Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03 モデルでは、FY2022-9 以外は陽性の結果で、FY2022-2、FY2022-5 で実試験結果と矛盾した。

C3. 第二回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの総括

第二回プロジェクト参加 21 チームのうち 1 チームは Best model の結果を 2 つ提出した。そのため、合計 22 モデルの Best model の統計指標と、21 チームが提出した約 50 モデル全結果の統計値を整理した。結果は、(a) 全般的に、第二回プロジェクトの結果は特異度（陰性物質を陰性と判定できる能力）が高いが、感度（陽性物質を陽性と判定できる能力）が低い傾向があった。(b) 第二回プロジェクトは前回第一回プロジェクトよりも参加チーム間でのモデルの感度、MCC（総合的な指標）、F1 Score（真陰性を考慮に入れていない精度）の差が顕著であった。(c) Best model 全体の MCC、F1 Score 平均した値は第一回プロジェクト Phase III での結果と同程度であった。

D. 考察

D1. Ames 試験結果の再評価と考察

第一回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトで評価対象とした 12,140 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。精査で得られた情報から、TA100、TA98、TA1535 株で 91% の陽性を網羅できるが、完全に網羅するには OECD TG 471 準拠の残り二菌株の情報も重要となる。同様に代謝活性化条件を考慮

しないと 27% の陽性の網羅が不可能である。これらは新規化学物質の陽性の特徴を示す情報になる。今後は化学物質の部分構造・アラート構造毎に菌株依存性や代謝活性化依存性について調査・考察することが、Ames/QSAR の深化に不可欠な変異原性メカニズムを理解する上で必要となる。

D2. Ames 変異原性試験の実施

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 予測が難しいアラート構造が挙げられる。これらの物質に対し、Ames 試験を行い、情報を更新することは Ames/QSAR の改善に直接寄与する。前者の典型である芳香族 N-ニトロソ化合物 (N-ニトロソアミン) に注目して、令和 3 年度と令和 4 年度において 15 試験を実施した。図 5 に Ames 試験陰性の構造を図示した。立体的にかさ高い芳香環とニトロソアミンが結合している特徴があり、図 5 の 1 は 2 つのフェニル基 (-C₆H₅) との結合があり、図 5 の 2 はフェニル基ならびにベンジル基 (-CH₂-C₆H₅) との結合がある。また、図 5 の 3 及び 4 はニトロソアミンが 5 員環に結合しているか、5 員環を形成しているという特徴がある。更に図 5 の 3 はアミド基 (-CONH-) と 5 員環の結合があり、図 5 の 4 はカルボキシ基 (-COOH) と 5 員環の結合との結合がある。立体障害等が Ames 試験陰性に影響を及ぼす可能性が存在する。

また、Ames 試験結果と統計ベース・知識ベース QSAR ツールの予測結果やデータベースの結果との不一致も明らかになった一方で、OASIS TIMES Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03 モデルでは 15 物質中 13 物質の予測と Ames 試験結果が一致する結果が得られた。今後は QSAR の構

案に必要な精緻なアラート構造の提案と予測の基盤になる変異原性メカニズムの解明や発がん性や他の遺伝毒性エンドポイントとの関連性について考察を深め毒性予測の深化につなげる必要もある。

D3. 第二回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの総括

第二回プロジェクトの Best model で感度が 60%以上の 4 モデルの共通点は、第一回プロジェクトに参加したチームであった。過去のチャレンジでの経験が精度向上に資する要因のひとつだと考えられる。この成果は原著論文文化に向けて取りまとめ中である。

E. 結論

精緻化した安衛法 Ames 試験結果のデータベースで得られた菌株や代謝活性化情報と陽性の関係について解析を進めた。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 N-ニトロソ 15 化合物の Ames 試験実施し、試験結果と QSAR 予測結果の比較と考察を進めた。第二回国際 Ames/QSAR チャレンジプロジェクトは総括の段階にある。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Thakkar S, Slikker W, Yiannas F, Silva P, Blais B, Chng KR, Liu Z, Adholeya A, Pappalardo F, Soares MdLC, Beeler P, Whelan M, Roberts R, Borlak J, Hugas M, Torrecilla-Salinas C, Girard P, Diamond MC, Verloo D, Panda B, Rose MC, Jornet JB, Furuham A, Fang H, Kwegyir-Afful E, Heintz K, Arvidson K, Burgos JG, Horst A, Tong W: Artificial intelligence and real-world data for drug and food safety – A regulatory science perspective,

Regul. Toxicol. Pharmacol., 140 (2023) 105388.

F.2. 学会発表

1. 古濱 彩子、杉山 圭一、本間 正充：大規模変異原性データを用いた第二回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクト. 構造活性相関フォーラム2022 (2022.6.3, Online)
2. 井上 薫、鈴木 洋、橋本 清弘、三島 雅之、古濱 彩子、杉山 圭一、広瀬 明彦：量変異原性不純物として検出されたニトロソアミン類の変異原性及び発がん性ポテンシャルに応じた管理のための条件の検索. 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 北海道)
3. Furuham A, Sugiyama K, Honma M: Overview of Outcomes of 2nd Ames/QSAR Project. International Conference on Environmental Mutagens (ICEM) 2022 (2022.8.27, Ottawa)
4. Morita T, Furuham A, Sugiyama K: Contraception of Genotoxic Pharmaceuticals in Japanese Market. ICEM 2022 (2022.8.29, Ottawa)
5. 古濱 彩子、杉山 圭一、本間 正充：物質の芳香族並びに環状N-ニトロソ化合物の Ames 変異原性の探求. 日本環境変異原ゲノム学会第51回大会 (2022.11.15, 広島)
6. Honma M: International QSAR Challenge for Mutagenicity. Prediction of Mutagenicity by *in silico* Tools. 62nd SOT Annual Meeting (2023.3.23, Nashville, USA)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1 安衛法 Ames 試験データの再評価のまとめ*

	A判定	B判定	C判定	計	備考
総物質数：第1回プロジェクト直後 (A)	672	1,085	10,383	12,140	
試験報告書が存在せず (B)	44	164	1,253	1,461	所在確認とれず
試験報告書があり評価が可能 (C=A-B)	628	921	9,130	10,679	
専門家判断による評価結果訂正数 (D)	26	18	66		
専門家判断前後の評価Class増減 (E)	-23	65	-48	-6	評価不能 (6)
判定結果 (A+E)	605	986	9,082	10,673	最終

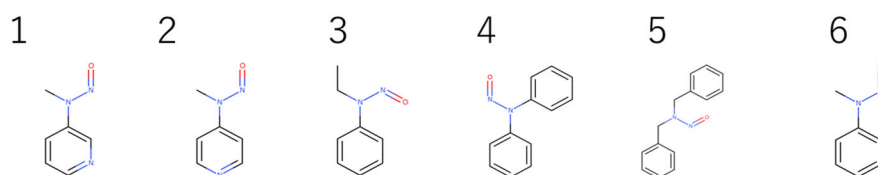
*数値は試験データに該当する化学物質の数を示す。

表2 令和3年度および令和4年度に実施したAmes試験被験物質と溶媒情報

2021ID	Year tested	Name	CAS RN	Purity (%)	Solvent	Hansen data
1	FY2021	3-nitrosomethylaminopyridine	69658-91-9	95.0	Water	Negative
2	FY2021	4-nitrosomethylaminopyridine	16219-99-1	95.0	DMSO	Negative
3	FY2021	n-nitroso-n-ethylaniline	612-64-6	95.0	DMSO	Negative
4	FY2021	benzenamine, n-nitroso-n-phenyl-	86-30-6	99.7	DMSO	Negative
5	FY2021	n-nitrosodibenzylamine	5336-53-8	95.0	DMSO	Negative
6	FY2021	N-methyl-N-phenylnitrous amide	614-00-6	99.0	DMSO	Positive
1	FY2022	N-Nitrosoanabasine	1133-64-8	95.0	DMSO	
2	FY2022	Mononitrosocaffeidine	145438-96-6	95.0	DMSO	Negative
3	FY2022	2-Nitrosomethylaminopyridine	16219-98-0	95.0	DMSO	Positive
4	FY2022	N-Nitrosopipicolinic acid	4515-18-8	95.0	Water	
5	FY2022	1-Nitroso-L-proline	7519-36-0	95.0	Water	
6	FY2022	1,2,6-Trimethyl-4-nitrosopiperazine	75881-18-4	95.0	Water	
7	FY2022	N-Methyl-p-nitro-N-nitrosoaniline	943-41-9	95.0	DMSO	
8	FY2022	N,4-Dinitroso-N-methylaniline	99-80-9	95.0	DMSO	
9	FY2022	N-benzyl-N-phenylnitrous amide	612-98-6	95.0	DMSO	

Hansen data: K. Hansen, et al, *J. Chem. Inf. Model.*, **49** 2077-2081, 2009に記載されているAmes試験の陽性 (Positive) ・陰性 (negative) 情報

FY2021：6物質（芳香族N-nitroso化合物）



FY2022：9物質（芳香族N-nitroso化合物・類似物質）

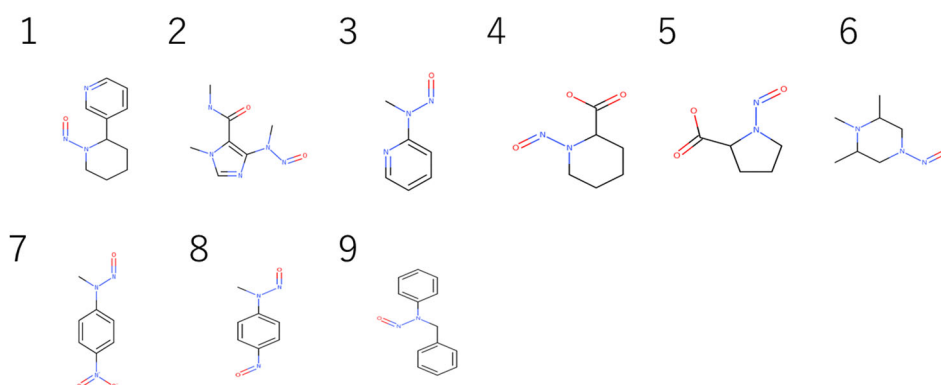


図1 Ames試験対象物質の構造

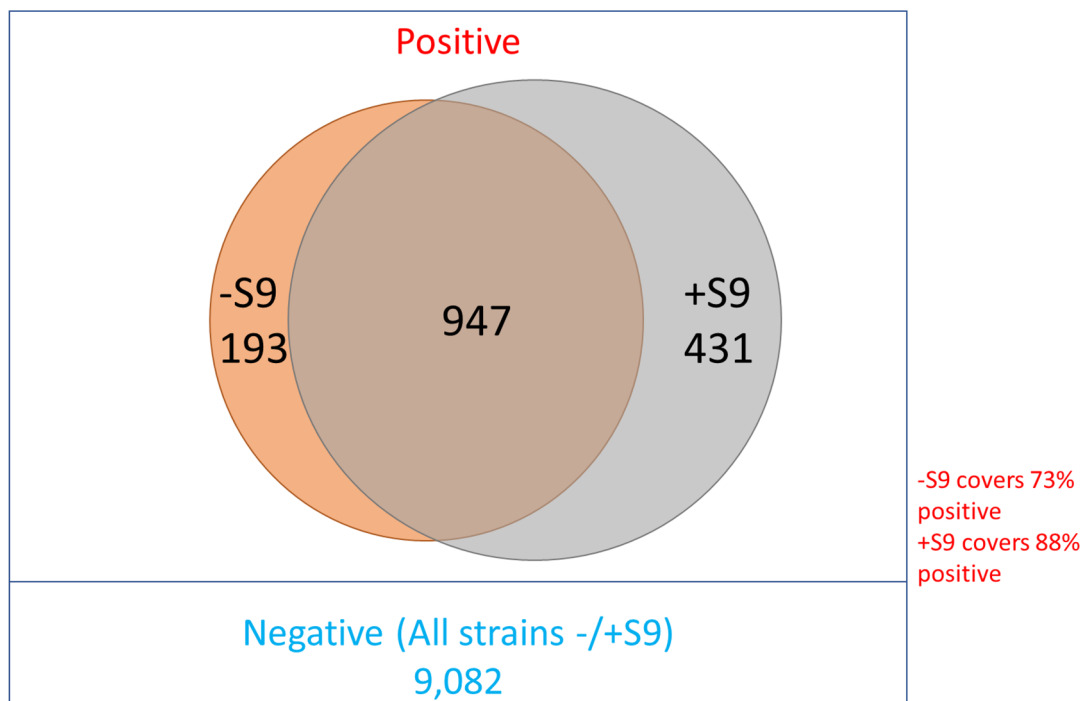


図2 Ames試験の代謝活性化 (+S9)、非活性化 (-S9) 条件と陽性 (Positive) の関係
数値はAmes試験データ (化学物質) の数を示す。

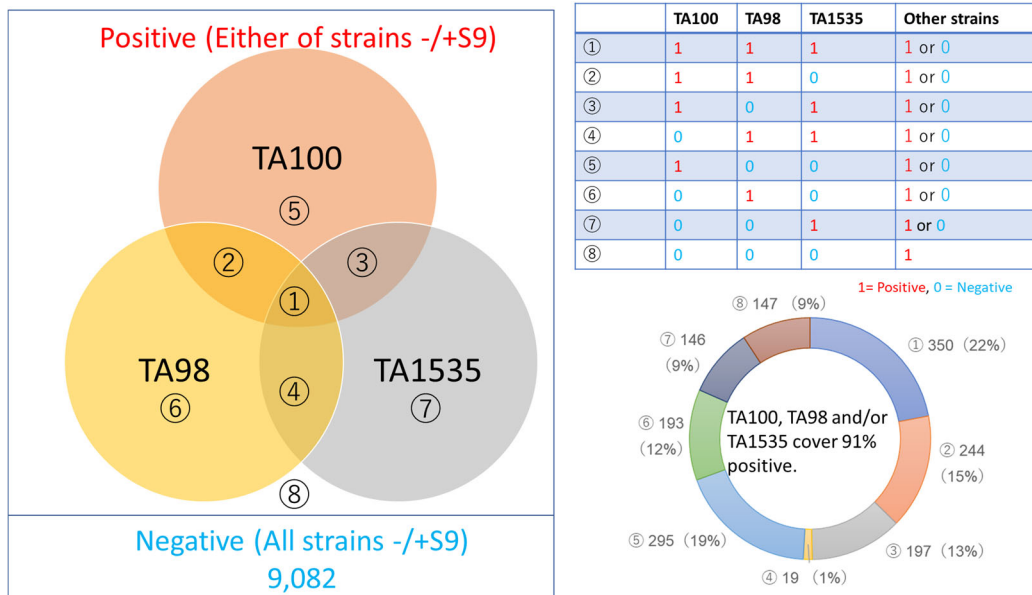


図3 サルモネラ菌TA100株・TA98株・TA1535でのAmes試験と陽性 (Positive) の関係
右下図の数値はAmesデータ数、カッコ内は割合

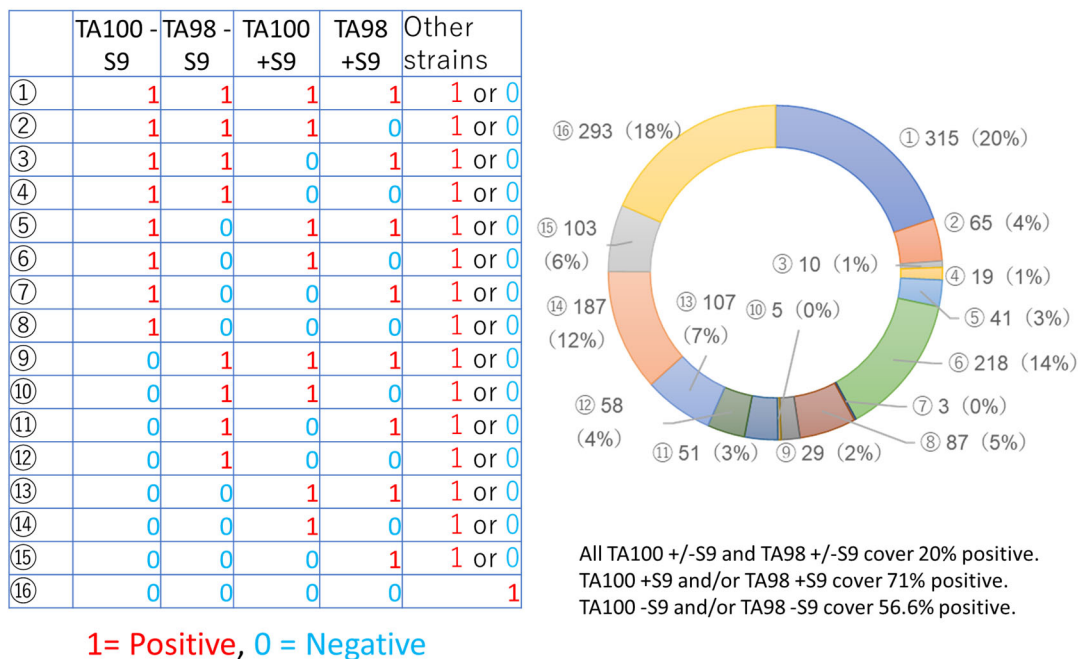


図4 サルモネラ菌TA100株・TA98株での代謝活性化非活性化を考慮したAmes試験と陽性 (Positive) の関係
右下図の数値はAmesデータ数、カッコ内は割合

表3 Ames試験結果およびOSAR予測結果*

ID	Structure	Test results	Strain/activation info	Case Ultra GT1_BMUT 1.8.0.1 (Probability %)	Case Ultra GT1_BMUT 1.9.0.2 (Probability %)	Derek Nexus: 6.2.0 (Nexus: 2.5.1) Results	Ames mutagenicity v.18.18 (OASIS TIMES 2.31.2) Summary Predicted Ames Mutagenicity	Non-kinetic Domain	Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03 (OASIS TIMES 2.31.2) Summary Predicted Ames Mutagenicity [2.0 h]	Kinetic Domain
FY20 21-1		Positive MSA:115 TA1535 +S9	TA1535 +S9	Known Positive 98.2	Known Negative 88.5	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 21-2		Positive MSA:27.4 TA100 +S9	TA100 +S9 TA98 ±S9	Known Positive 98.5	Known Negative 88.5	PLAUSIBLE	in vitro Ames negative	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 21-3		Positive MSA:83.6 TA100 +S9	TA98 TA100 WP2uvrA TA1537 ±S9 (TA1537+S9 Main test only)	Known Negative 98.3	Known Negative 96.6	PLAUSIBLE	in vitro Ames negative	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 21-4		Negative		Known Negative 98.0	Known Positive 98.6	PLAUSIBLE	in vitro Ames negative	In	in vitro Ames negative	In
FY20 21-5		Positive MSA:520 WP2uvrA +S9	TA1535 +S9 WP2uvrA +S9	Known Positive 99.1	Known Positive 99.2	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	In	in vitro Ames positive	In
FY20 21-6		Positive MSA:48.6 TA1537 +S9	TA1537 +S9	Known Positive 98.0	Known Positive 91.9	PLAUSIBLE	in vitro Ames negative	Out	in vitro Ames positive	Out

* MSA (maximum specific activity (rev./mg)) : 最大比活性値
赤字が陽性 (positive) 、青字が陰性 (negative) のAmes試験ならびにQSAR予測結果に該当

表3 つづき*

ID	Structure	Test results	Strain/activation info	Case Ultra GT1_BMUT 1.8.0.1 (Probability %)	Case Ultra GT1_BMUT 1.9.0.2 (Probability %)	Derek Nexus: 6.2.0 (Nexus: 2.5.1) Results	Ames mutagenicity v.18.18 (OASIS TIMES 2.31.2) Summary Predicted Ames Mutagenicity	Non-kinetic Domain	Ames Mutagenicity S9 activated kinetic v.03.03 (OASIS TIMES 2.31.2) Summary Predicted Ames Mutagenicity [2.0 h]	Kinetic Domain
FY20 22-1		Positive MSA:12.4 TA1535 +S9	TA1535 +S9	Positive 98.2	Positive 97.9	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	In	in vitro Ames positive	In
FY20 22-2		Negative	TA100 +S9: dose-dependency from 1.4 to 1.7 fold.	Known Negative 94.0	Known Negative 75.0	PLAUSIBLE	in vitro Ames negative	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 22-3		Strongly Positive MSA:2847 TA100 +S9	TA98 TA100 WP2uvrA TA1535 +S9	Known Positive 98.8	Known Positive 95.8	PLAUSIBLE	in vitro Ames negative	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 22-4		Positive MSA: 26 TA98 -S9 (dose finding test)	TA98, TA1537 -S9	Known Positive 98.3	Known Positive 97.3	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 22-5		Negative		Positive 99.2	Positive 97.3	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 22-6		Positive MSA: 105 TA1535 +S9	TA100, TA1535 +S9	Positive 97.9	Positive 97.9	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	In	in vitro Ames positive	Out
FY20 22-7		Strongly Positive MSA:79757 TA100 +S9 (dose finding test)	All (Dose finding test: except for TA1537 -S9)	Known Positive 100.0	Known Positive 99.9	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 22-8		Strongly Positive MSA:367000 TA100 -S9	All	Known Positive 99.7	Known Positive 99.0	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	Out	in vitro Ames positive	Out
FY20 22-9		Negative		Known Positive 98.0	Known Positive 99.6	PLAUSIBLE	in vitro Ames negative	Out	in vitro Ames negative	Out

* MSA (maximum specific activity (rev./mg)) : 最大比活性値
赤字が陽性 (positive) 、青字が陰性 (negative) のAmes試験ならびにQSAR予測結果に該当

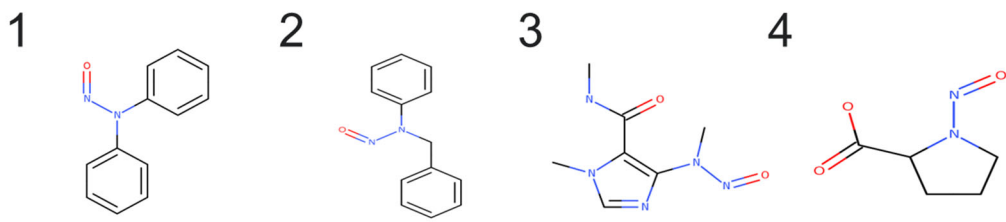


図5 Ames試験陰性の4物質の構造

- 1および2：立体的にかさ高い芳香環とニトロソアミンが結合
 3および4：ニトロソアミンが5員環に結合しているか、5員環を形成

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**

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	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	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	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	レギュトリーサイエンス分野	教授

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。本分担研究では、昨年度に引続き、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、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いたリードアクロスによる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、毒性データがない対象物質の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。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た。

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、反復投与毒性の信頼性が高い予測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てデータベース化し、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。

反復投与毒性のデータギャップ補完へのリードアクロスの適用には、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、鍵となる毒性メカニズムの情報は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、評価対象物質が代謝を受けて共通の構造あるいは構造が極めて類似する物質へ変換されるケースのように、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、その適用範囲の拡大が期待される。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 代謝に関わるシトクロム P450 (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. 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)、OECD QSAR Toolbox (QSAR Toolbox) (ver.4.5)、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 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。

今年度検討した物質は、塩素原子数の異なるクロロエタン類である。肝臓において脱ハロゲン化代謝の結果、ラジカルを生成して周囲の細胞に傷害を引き起こす、GSH 抱合を介して毒性を引き起こす機序等が想定され、正確な代謝予測が信頼性の高い毒性予測の鍵になる。また、一方で速やかな呼吸排出の結果、低毒性を示す物質があることも想定され、体内動態の観点からも類似性を評価することが求められる。

In silico 代謝予測は、Lhasa 社の NEXUS Meteor (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、ヒューリスティック型の TIMES (ver. 2.31.2) も用いた。

類似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、不確実係数で除して有害性評価値を導出し、CSCL Hazard Class を割り当てた。

B.2. 既存代謝情報の収集と一元化

HESS および QSAR Toolbox から代謝情報が記載されている物質とその実測代謝物の SMILES 情報を抽出した。さらに、PubChem Classification Browser の Metabolism/Metabolites から代謝情報の記載がある化学物質の情報をダウンロードした。各物質の PubChem CID と Canonical SMILES を収集し、QSAR Toolbox を用いて CAS 番号を取得した。これらの情報を、NIHS 統合 DB に記載されている化学物質と CAS 番号を元に紐付けを行った。

B.3. ヒト P450 基質テンプレートモデルによる代謝予測のプロトコールの詳細化

ヒト P450 基質テンプレートモデルの汎用化を目指して、CYP3A4 を対象に、その基質を Yamazoe らの下記 5 論文 (Yamazoe et al., Food Safety, 9, 10-21, 2021., Yamazoe et al., Food Safety, 8, 34-51, 2021., Yamazoe et al., Drug Metab Pharmacokinet., 35, 253 - 265,

2020., Yamazoe et al., Drug Metab Pharmacokinet., 34, 113-125, 2019., Goto et al., Drug Metab Pharmacokinet., 34, 351-364, 2019) から選択し、その化学構造を Mac 版 Chem3D で作成した。本モデルの開発者である Yamazoe から、テンプレート当てはめの方法や規則の説明を受けた後に、ChemDraw 上で基質テンプレートへの当てはめを実施した。各々の基質について、基質挿入部位の立体的制限および基質テンプレートとの相互作用等の観点から、基質になる配置と基質にならない配置を確認した。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 結果

C.1. 代謝物予測に基づく反復投与毒性予測

反復投与毒性予測の評価対象物質は、2つ以上の塩素原子を持つクロロエタン類のうち、NIHS 統合 DB および ECHA REACH のデータベース検索の結果、反復投与毒性試験の結果が見つけられなかった 1,1,1,2,2-pentachloroethane (CAS: 76-01-7: member 1)、1,1-dichloroethane (CAS: 75-34-3: member 2)、1,1,1,2-tetrachloroethane (CAS: 630-20-6: member 3) および 1,1,2-trichloroethane (CAS: 79-00-5: member 4) である。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 の分類を行う [ステップ 1: 課題設定]。

評価対象物質とその類似物質(2つ以上の塩素原子を持つクロロエタン類で毒性既知物質)について、その化学構造、物理化学性

状 (log P、ヘンリー定数、血液-空気分配係数)、代謝情報、想定機序情報を収集した[ステップ 2: データギャップ分析]。

2~6 個の塩素原子をもつエタン類を NIHS 統合 DB 中で検索した結果、4 物質 (member 5-8) が確認された (表 1) [ステップ 3: 類似物質の同定]。

Member 5, 6, 8 は肝毒性影響が、Member 7 は血液毒性影響が LOAEL の根拠となる leading effect であった。

クロロエタン類は P450 による還元的脱ハロゲン化によって炭素原子に置換した 1 個のハロゲン原子が失われ、反応性が高い炭素ラジカルが生成するか、酸化的脱ハロゲン化を介して求電子性の酸クロリドを形成することによって、肝細胞内のタンパク質等の生体高分子と付加体を形成し、肝障害が引き起こされることが提唱されている。また、GSH 抱合の進行に伴う GSH の枯渇による酸化ストレスの誘導と一部の GSH 抱合体が反応性の高い代謝物へ変換されることも毒性発現に至る可能性がある。一方、メチル水酸化は毒性を低減させる反応であると考えられる。

Member 5-8 について、既知の代謝物構造を Meteor および GLORYx により得られた予測代謝物構造と比較したところ、Meteor は精度よく代謝を予測した (表 1)。よって、このグループの物質の代謝予測には、Meteor の予測結果を活用することが妥当と考えられた。

評価対象物質 member 1 は、還元的脱ハロゲン化代謝が予測された。この反応の中間段階では反応性が高い炭素ラジカルが生成すると考えられ、したがって、強い肝毒性が懸念される。構造、物理化学的性状、本代謝

反応の類似性から、member 5 および member 6 が類似物質として同定された。[ステップ 4：類似物質の評価 (member 1)]

評価対象物質 member 2 は、酸化的脱ハロゲン化代謝が予測された。しかし、本物質と構造、物理化学的性状、想定される代謝が類似すると考えられた member 7 は代謝が排泄に果たす役割は小さく、大部分が代謝を受けずに呼気から排泄され、血中半減期は短いことが報告されている。この体内動態の特徴は、本物質が他の多くのクロロエタン類と比べてヘンリー定数が大きく、血液-空気分配係数が小さいことによって支持される。したがって、高曝露において血球への毒性影響が懸念される。構造、物理化学的性状の類似性が血液毒性に与える影響が大きいとの仮説に基づき、評価対象物質 member 2 の類似物質として member 7 を選択した。[ステップ 4：類似物質の評価 (member 2)]

評価対象物質 member 3 および member 4 は、物理化学的性質は member 5 および member 8 と類似しているが、代謝の点では還元的脱ハロゲン化反応と酸化的脱ハロゲン反応が起きると予測され、member 5 が類似していた。しかし、member 3 および member 4 が分子内にもつメチレン基は水酸化など別の代謝反応を受ける可能性がある。スクリーニングレベルでの評価であることを鑑み、安全サイドに立って代謝活性化が毒性発現に寄与するとの仮説に基づき、member 5 を類似物質として選択した。[ステップ 4：類似物質の評価 (member 3 および member 4)]

Member 1 の類似物質として同定された member 5 および member 6 の主要な毒性は双方とも肝臓への影響(肝重量増加、肝細胞

壊死)であった。スクリーニング評価であることを踏まえて、LOAEL 値の低い member 5 のエンドポイントデータを用いてリードアクロスし、分子量の違いを考慮して、13 週間反復投与毒性試験の主要な毒性は肝毒性であり、LOAEL 値は 23.4 mg/kg/d と推定された。有害性評価値は不確実性係数 2000 (LOAEL 使用、慢性曝露への外挿、ヒトへの外挿) で除して 0.0117 と算出され、CSCL Hazard Class は” class 3” 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 2 の類似物質として同定された member 7 は血球への影響(ヘマトクリットの減少)が主要な毒性影響であった。よって、13 週間反復投与毒性試験のその毒性影響と NOAEL 値をリードアクロスして member 2 の主要な毒性は血液毒性であり、NOAEL は 215 mg/kg/d と推定された。有害性評価値は不確実性係数 200(慢性曝露への外挿、ヒトへの外挿) で除して 1.45 と算出され、CSCL Hazard Class は” out of class” 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 3 および member 4 の類似物質として同定された member 5 の主要な毒性(肝重量増加、肝細胞壊死) および 13 週間反復投与毒性試験の LOAEL 値をリードアクロスして member 3 の LOAEL は 20 mg/kg/d と推定された。有害性評価値は不確実性係数 2000 (LOAEL 使用、慢性曝露への外挿、ヒトへの外挿) で除して 0.01 と算出され、CSCL Hazard Class は” class 3” が割り当てられた。また同様に、分子量の違いを考慮しつつリードアクロスして、member 4 の LOAEL 値は 15.9 mg/kg/d と推定された。有

害性評価値は 0.008 であり、CSCL Hazard Class は” class 3” が割り当てられた。[ステップ 5: データギャップ補完 (member 3 および member 4)]

Member 1 は member 5 と代謝プロファイルにおいて類似しているが、肝臓での反応性代謝物の生成速度や反応性レベルなどの定量的情報の不足に由来する不確実性が存在する。しかし、類似物質 member 5 は、有害性クラス 3、もうひとつの類似物質として同定された member 6 はクラス 4、さらに member 8 もクラス 3 であり、member 1 がこれらより毒性が強いエビデンスはないことから、毒性は過小評価されていないと考えられ、その不確実性は許容される。[ステップ 6: 不確実性評価 (member 1)]。

評価対象物質 member 2 は、分子内にメチル基を持ち、トポロジカルな点で member 5 と構造が類似している。さらに、血液空気分配係数の類似性から呼気への排出が優先的であると考えられるが、半減期などの体内動態に関して予測は実施されず、定量的情報の不足による不確実性があるが、PubChem 検索により得られたキネティクスの実測値より呼気排出の程度は同程度と推察されることから、その不確実性は許容される[ステップ 6: 不確実性評価 (member 2)]。

評価対象物質 member 3 は member 5 の構造異性体であるが、塩素原子の置換部位の違いが代謝活性化にどの程度影響を与えるか不確実性が残る。ただし、member 3 は片方の炭素原子に塩素が 1 つしかついていないため、この原子は比較的無害なメチル水酸化による代謝を受けやすいと考えられる。したがって、member 5 からのリードアクロス予測に基づく member 3 の有害性クラス

分類は過小評価していないと考えられる。しかし、毒性予測の不確実性の低減のためには member 3 と member 5 の肝代謝活性化に関連して、定量的に比較できる情報が求められる [ステップ 6: 不確実性評価 (member 3)]。

評価対象物質 member 4 は、member 5 と比較して塩素原子が 1 つ少ない構造をしており、塩素原子置換数の点から member 5 と member 8 の中間の構造を持つ。Member 8 は GSH 抱合する点で member 5 と代謝が大きく異なる。構造のわずかな違いが代謝プロファイルに大きな影響を与える可能性があり、member 4 の代謝予測は不確実性が評価対象物質の中で最も大きい。しかし、炭素原子に塩素が 1 つしかついていないため、原子は比較的無害なメチル水酸化による代謝を受ける可能性があると考えられる。Member 5 および member 8 はいずれも”Class 3”であり、いずれの物質の試験データからのリードアクロス予測であっても、member 4 の有害性クラス分類は過小評価していないと考えられる。しかし、肝代謝活性化に関連して、反応性代謝物のより精度の高い予測と、定量的に比較できる情報が求められる。[ステップ 6: 不確実性評価 (member 4)]。

C.2 既存代謝情報の収集

HESS からは、1,199 物質を親物質とする代謝マップ情報が得られた。PubChem からは、10,053 物質 (CID ベース) について、代謝または代謝産物の情報が得られた。この物質リストを化学物質の情報が収載されている QSAR Toolbox と照合することで、CAS ベースで 4,092 の化学物質のリストを得た。

次に、収集した代謝データを NIHS 統合

DB に登録されている反復投与毒性試験データと紐づけを行った。試験データの質にばらつきがある COSMOS の毒性データを除いて照合したところ、1,967 物質のうち、613 物質は HESS 由来の代謝マップを利用できた。また、906 物質は PubChem 由来の代謝情報が得られた。

C.3. ヒト P450 基質テンプレートモデルの汎用性向上

ヒトの CYP3A4 の基質の化学構造を Mac 版 Chem3D で作成した。テンプレートへの当てはめが比較的容易であると考えられた多環芳香族炭化水素やステロイド等の平面構造を取る物質を対象とした (Androstenedione, Benzopyrene, Chrysene, Finasteride, Nitropyrene, Phenanthrene, Progesterone, Pregnenolone, Pyrene, Reactive blue 19, Testosterone)。各々の基質について、基質挿入部位の立体的制限および基質テンプレートとの相互作用等の観点から、基質になる配置とならない配置を確認した。

その結果に基づき、基質テンプレートへの当てはめによる代謝部位予測のプロトコールの詳細化を図るため、化学物質の構造情報取得方法、Mac 版 Chem 3D の操作方法、化学物質の動かし方、テンプレートへの当てはめについて注意点を抽出し、とりまとめた。

基質テンプレートを用いた代謝部位予測の実施として、25 物質に対して CYP3A4 の基質テンプレートへの当てはめを行い、基質になると考えられる配置、または基質にならない配置を作成し、予測結果を ChemDraw ファイル、PNG ファイルとして保存した。

基質全体のサイズが小さい場合は、テンプレート内に 2 分子入ると考えられることから、1 分子基質のテンプレート当てはめのルールに適合しない場合が多く、基質となるか否かの判断が困難であった。詳細なルール構築が必要と考えられた。

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について、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。

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、本研究では代謝予測に対してその最新動向を反映させた。すなわち、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るかを確認することにより、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た。

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により、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寄与すると考えられる。

次年度は、本アプローチを他のカテゴリー物質、特に低毒性が予測される物質群へ拡大適用することを検討する。反復投与毒性は、構造アラートや AOP の整理は未だ十分でない。したがって、低毒性の予測には、速やかに代謝分解され排出されるなど、低毒性となる理由を正当化することが有効である。試行を重ねて、このアプローチの妥当性と留意点をまとめる。

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。本分担研究では、化学物質の代謝情報を公的データベースから網羅的に収集し、NIHS 統合 DB とリンクさせ、一元化を図っている。

さらに本分担研究では、昨年度に精度評価したヒト P450 代謝予測モデルのうち、もっとも予測精度が優れていた Yamazoe の P450 基質テンプレートモデルについて、プロトコルの詳細化を図った。今後は複数のユーザーが基質テンプレートへの当てはめを実施できるかを検証することが必要である。そして、基質の当てはめの結果について、テンプレート開発者への確認を実施し、フィードバックすることでプロトコルのさらなる改良を行う必要がある。

また、Yamazoe による P450 基質テンプレートモデルは、代謝部位および代謝物の予測性は優れるが、対象物質が基質とならないという結果を予測することは難しい。したがって、その使用場面として、他の P450 代謝予測モデル（基質が代謝されるか否か

を判別するモデル）と組み合わせることで、代謝される可能性が高い物質を選定し、続いて P450 基質テンプレートに当てはめ、どの部位が代謝されるかを予測する等、段階的な代謝予測フローの検討が必要であると考えられる。

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。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Murayama N, Yamada T, Yamazoe Y. Application of CYP1A2-Template system to understand metabolic processes in the safety assessment. *Food Safety*, 2022, 10, 129-139.
2. Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Miura M, Ohata H, Katsutani K, Matsumoto M, Hirose A. Formation and evaluation of mechanism-based chemical categories for regulatory read-across assessment of repeated-dose toxicity: a case of hemolytic anemia. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*; 2022, 136: 105275.

3. Yamada T, Katsutani K, Maruyama T, Kawamura T, Yamazaki H, Murayama N, Tong W, Yamazoe Y, Hirose A, Combined risk assessment of food-derived coumarin with *in silico* approaches. *Food Safety*. 2022, 10, 73-82.
 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; 150: 4-12.
 5. Murata Y, Umano T, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Masumura K, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VIII) *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 140, 54-60, 2022
- F.2 学会発表
1. Yamada T, Meiseki Y, Watanabe-Matsumoto S, Yamamoto S, Katsutani N, Yoshida K, Constructing a database of parameters for physiologically based kinetic modeling to predict toxicokinetics of inhalation exposure to industrial chemicals, Society of Toxicology 62nd Annual Meeting (2023.3.21, Nashville)
 2. 山田 隆志 : 次世代リスクアセスメント (NGRA) のケーススタディの開発と行政受入へ向けた考慮事項, 日本動物実験代替法学会第 35 回大会 (2022.11.20, 静岡)
 3. 山田 隆志, 辻井 伸治, 三浦 稔, 齊藤亮子, 川村 智子, 丸山 多恵子, 勝谷成男, 広瀬 明彦 : IATA による化学物質の神経毒性評価を補完する *in silico* アプローチ : 神経毒性に関連する部分構造と物理化学的および生化学的パラメータを用いたカテゴリーの精緻化, 日本動物実験代替法学会第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
 4. Yamada T, Tsujii S, Miura M, Saito A, Kawamura T, Maruyama T, Katsutani N, Hirose A, *In silico* approach that supports neurotoxicity assessment of chemical substances by IATA: Refining categories by using substructures and physicochemical and biochemical parameters related to neurotoxicity, 11th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (2022.10.20, Chapel Hill)
 5. 山田 隆志 : ヒト用医薬品の環境リスク評価を支援する生態毒性データベースと予測の不確実性を考慮した *in silico* アプローチの開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.2, 札幌)
 6. 山田 隆志, 勝谷 成男, 丸山 多恵子, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦 : ピロリジジナルカロイドの肝毒性評価への New Approach Method (NAM) の適用, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
 7. 勝谷 成男, 山田 隆志, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦 : 食品中に含まれるクマリンの肝毒性リスク評価についての *in silico* アプローチ, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
- F.3 シンポジウム/講習会/Work Group での

発表

1. 山田 隆志: ヒト健康影響に係る化学物質安全性データベースの開発および情報科学技術の導入によるリスク評価の迅速化へ向けた課題. 化学物質の安全管理に関するシンポジウムー Society 5.0 実現に向けた化学物質管理に係るデータ利活用の推進ー, 化学物質の安全管理に関するシンポジウム実行委員会主催, 内閣府等共催 (2022.12.21, Online)
2. Yamada T, Maruyama-Komoda T, Furuhama A. QSAR evaluation trial based on the checklist -Case study on prediction of Ames mutagenicity using two QSAR models-, OECD Meeting of the QSAR Assessment Framework Working Group (2022.11.15, Paris)
3. 山田 隆志: ヒト健康影響に関連した QSAR とリードアクロス. 令和 4 年度 QSAR/リードアクロス講習会, 独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター主催, 環境省 大臣官房環境保健部後援 (2022.10.17, Online)
4. Yamada T, Read-across case studies for repeated-dose toxicity of chemicals: Lessons learned from the OECD IATA case studies project. The 9th European Food Safety Authority (EFSA) Read-across Work Group Meeting. (2022.9.28, Parma-Online Hybrid)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- G.1. 特許取得
なし

G.2. 実用新案登録
なし

G.3. その他
なし

	Member 1	Member 2	Member 3	Member 4	Member 5	Member 6	Member 7	Member 8	
CAS	76-01-7	75-34-3	630-20-6	79-00-5	79-34-5	67-72-1	71-55-6	107-06-2	
Name	1,1,1,2,2-pentachloroethane	1,1-dichloroethane	1,1,1,2-tetrachloroethane	1,1,2-trichloroethane	1,1,2,2-Tetrachloroethane	Hexachloroethane	1,1,1-Trichloroethane	1,2-dichloroethane	
Chemical information									
Molecular weight	202.3	99.0	167.8	133.4	167.8	238.7	133.4	99.0	
logP (measured value)	3.2	1.8	2.8	1.9	2.4	4.1	2.5	1.5	
ACD logP (calculated value)	3.2	1.5	2.5	1.7	2.2	4.5	2.1	1.4	
Boiling Point (°C)	162.0	57.4	130.2	113.8	146.0	196.8	74.0	83.4	
Henry's Law constant	0.001900	0.005620	0.002500	0.000824	0.000420	0.003890	0.016300	0.001180	
Blood/air partition coefficient	104.0	11.2	41.7	58.0	142.0	62.7	5.8	30.4	
Toxicity information					Liver: degenerative hepatocellular (hepatocyte) (20 mg/kg/d in male and 40 mg/kg/d in female), hypertrophy (hepatocyte) (80 mg/kg/d in male and female), necrosis (hepatocyte) (170 mg/kg/d in male and 80 mg/kg/d in female), hyperplasia (bile duct) and mitotic alteration (hepatocyte) (320 mg/kg/d in male and 170 mg/kg/d in female), relative organ weight increase (40 mg/kg/d in male)	Liver: hepatocellular necrosis (375 mg/kg/d in male and 188 mg/kg/d in female), relative organ weight increase (188 mg/kg/d in male and 94 mg/kg/d in female); Kidney: hyaline degeneration, tubular regeneration, and tubular casts (47 mg/kg/d in male), relative organ weight increase (84 mg/kg/d in male and 375 mg/kg/d in female); Spleen: pigmentation (40 mg/kg/d in male and 80 mg/kg/d in female) Hematology: manual Hct and PCV decrease (80 mg/kg/d in male and 40 mg/kg/d in female), High decrease (40 mg/kg/d in male and 80 mg/kg/d in female), RBC increase (170 mg/kg/d in male and 40 mg/kg/d in female), and Ret decrease (80 mg/kg/d in male and 170 mg/kg/d in female) Blood chemistry: Cho decrease (20 mg/kg/d in male and female), TP decrease (40 mg/kg/d in male and 170 mg/kg/d in female), Alb increase (170 mg/kg/d in male and 40 mg/kg/d in female), and ALT increase (80 mg/kg/d in male and female) Rats (F344N), 20, 40, 170, 300 mg/kg/day. Feeding	Liver: hepatocellular necrosis (375 mg/kg/d in male and 188 mg/kg/d in female), relative organ weight increase (188 mg/kg/d in male and 94 mg/kg/d in female); Kidney: hyaline degeneration, tubular regeneration, and tubular casts (47 mg/kg/d in male), relative organ weight increase (84 mg/kg/d in male and 375 mg/kg/d in female); Spleen: pigmentation (40 mg/kg/d in male and 80 mg/kg/d in female) Hematology: Hct decrease (600 mg/kg/d in male and 300 mg/kg/d in female), Hgb and RBC decrease (4000 mg/kg/d in male and 2000 mg/kg/d in female) Thymus: relative organ weight increase (750 mg/kg/d in female) and Right testis: relative organ weight increase (750 mg/kg/d in female) Clinical observation: hyperactivity (94 mg/kg/d in male and female) and convulsions (375 mg/kg/d in male and female) Rats (F344N), 47, 94, 188, 375, 750 mg/kg/day, 31 d, Gavage	Kidney: inflammation, chromocystitis (200 mg/kg/d in male and 2000 mg/kg/d in female), renal tubule, casts, and renal tubule, degeneration, hyaline (1200 mg/kg/d in male) Liver: absolute organ weight decrease (4800 mg/kg/d in male and 5000 mg/kg/d in female) and relative organ weight decrease (3000 mg/kg/d in male) Right testis: relative organ weight increase (2400 mg/kg/d in male) Hematology: Hct decrease (600 mg/kg/d in male and 300 mg/kg/d in female), Hgb and RBC decrease (4000 mg/kg/d in male and 2000 mg/kg/d in female) Blood chemistry: CPK increase (5000 mg/kg/d in female) Rats (F344N), 5000, 10000, 20000, 40000, 80000 (ppm 200), 600, 1200, 2400, 4800 mg/kg/d in male and 310, 650, 1250, 2500, 5000 mg/kg/d in female) 31 d, Feeding	Foetus/mother: hypertoxia and inflammation (120 mg/kg/d in male and 300 mg/kg/d in female), and mineralization (240 mg/kg/d in male and 300 mg/kg/d in female) Cerebellum: necrosis (240 mg/kg/d in male and 300 mg/kg/d in female) Thymus: necrosis (240 mg/kg/d in male and 300 mg/kg/d in female) Liver: absolute and relative organ weight increase (120 mg/kg/d in male and 18 mg/kg/d in female) Heart: absolute organ weight increase (75 mg/kg/d in female) and relative organ weight increase (150 mg/kg/d in male and 75 mg/kg/d in female) Right kidney: absolute organ weight increase (30 mg/kg/d in male and 75 mg/kg/d in female) and relative organ weight increase (80 mg/kg/d in male and 75 mg/kg/d in female) Clinical observation: tremors, salivation, emaciation, abnormal postures, and ruffled fur (240 mg/kg/d in male and 300 mg/kg/d in female) Rats (F344N), 30, 60, 120, 240, 480 mg/kg/day in male and 18, 37, 75, 150, 300 mg/kg/d in female, 91d, Gavage
Integrated conclusion (eg. read-across)	read across from Member 5 LOAEL: 23.4 mg/kg/d	read across from Member 7 NOAEL: 219 mg/kg/d	read across from Member 5 LOAEL: 20 mg/kg/d	read across from Member 5 LOAEL: 15.9 mg/kg/d	LOAEL: 20 mg/kg/d	NOAEL: 47 mg/kg/d	NOAEL: 290 mg/kg/d	LOAEL: 18 mg/kg/d	
D value	0.01	1.45	0.01	0.009	0.01	0.235	1.45	0.009	
CSCL Hazard Class	class 3	out of class	class 3	class 3	class 3	class 4	out of class	class 3	

表 1. 塩化エタン類の反復投与毒性のリードアクロス予測のためのデータマトリックス

Member 1-4 : 評価対象物質、Member 5-8 : 類似物質。塩化エタン類の物理化学的性質、およびNIHS 統合DB から得られた反復投与毒性試験のデータを示す。

	Member 1	Member 2	Member 3	Member 4	Member 5	Member 6	Member 7	Member 8
CAS	76-01-7	75-34-3	630-20-6	79-00-5	79-34-5	67-72-1	71-55-6	107-06-2
Name	1,1,1,2,2-pentachloroethane	1,1-dichloroethane	1,1,1,2-tetrachloroethane	1,1,2-trichloroethane	1,1,2,2-Tetrachloroethane	Hexachloroethane	1,1,1-Trichloroethane	1,2-dichloroethane
Chemical information								
Absorption and excretion information	Mice were injected with (14C)-pentachloroethane subcutaneously at doses of 1.1, 1.3, 3.0 mg and the excretion over a 3 d period was determined. About 1/3 of the dose (12.6%) was excreted unchanged.	Rats excreted 56% as unchanged 1,1-dichloroethane and mice 70%.	Rat excreted 34% of unchanged 1,1,1,2-dichloroethane in the air, 60% of the ingested dose was metabolized in urine.	Rodents excreted 40% of unchanged 1,1,2-trichloroethane in the air	46% were eliminated in urine as metabolites. 7% is excreted air (4 weeks, oral rat.)	Rats excreted 65% as unchanged 1,1-dichloroethane, 29% of the ingested dose was metabolized (4 weeks, oral rat.)	The primary route of excretion was rapid elimination in expired air; only 3% of the ingested dose was metabolized (6 hours, oral rat.)	Excretion of 1,2-dichloroethane and metabolites is rapid; in animal studies, excretion was essentially complete 48 hr after acute exposure. A large percentage of the dose (23%) was excreted as unchanged 1,2-dichloroethane in the exhaled air.
Ref.	Bingham, E., Coates, B., Powell, C.H., Parry, A. Toxicology Volume 1: 8-56 ed. John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2001), p. 144	Bingham, E., Coates, B., Powell, C.H., Parry, A. Toxicology Volume 1: 8-56 ed. John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2001), p. 16-119	Moore, C. et al. (1985). "Metabolic exposure study of chlorinated hydrocarbons in rats and mice." <i>Drug Chem Toxicol</i> 2(3): 183-194.	Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2001. Toxicologic profile for 1,1,2-Trichloroethane. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.	ARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, p. V71-820 (1996)	American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Documentation of the TLV's and BEI's with Other World Wide Occupational Exposure Values. CD-ROM Cincinnati, OH 45240-1524 2000. p. 3	ARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, p. V71-888 (1999)	Moore, C. et al. <i>Drug Chem Toxicol</i> 2(3): 183-194 (1985)
PubChem link	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6514#section=Pharmacology-and-Biochemistry	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6525#section=Pharmacology-and-Biochemistry	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1741#section=Pharmacology-and-Biochemistry	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6577#section=Pharmacology-and-Biochemistry	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6572#section=Pharmacology-and-Biochemistry	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6572#section=Pharmacology-and-Biochemistry	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/118#section=Pharmacology-and-Biochemistry	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6572#section=Pharmacology-and-Biochemistry
Metabolism information					Reductive Dehalogenation of Halobethanes Oxidative Dehalogenation of Alkyl Halides	Reductive Dehalogenation of Halobethanes Oxidative Dehalogenation of Alkyl Halides	Aliphatic Hydrolytic Dehalogenation	Oxidative Dehalogenation of Alkyl Halides Conjugation of Alkyl Chlorides with Glutathione
in vivo / in vitro (species)					in vitro: Thompson et al., (1965) in vitro: Casciola & Ivanetich (1984)	in vitro: Salmon et al., (1955)	in vitro: Casciola & Ivanetich (1984) in vitro: Thompson et al., (1965) in vitro: Kaneko et al., (1994)	in vitro: Jean & Reed (1992) in vitro: Casciola & Ivanetich (1984)
[Predicted]	481 Reductive Dehalogenation of Halobethanes (76) 484 Oxidative Dehalogenation of Alkyl Halides (319)	484 Oxidative Dehalogenation of Alkyl Halides (494)	481 Reductive Dehalogenation of Halobethanes (734)	481 Reductive Dehalogenation of Halobethanes (430)	481 Reductive Dehalogenation of Halobethanes (704)	481 Reductive Dehalogenation of Halobethanes (850)	168 Aliphatic Hydrolytic Dehalogenation (214) 137 Aliphatic Reductive Dehalogenation (154)	168 Aliphatic Hydrolytic Dehalogenation (507) 051 Conjugation of Alkyl Chlorides with Glutathione (497) 464 Oxidative Dehalogenation of Alkyl Halides (453)
Meteor Nexus: 3.1.0 (score)	oxidative dehalogenation alkyl (0.778) aliphatic_dehalogenation (0.776) aliphatic hydroxylation (0.776)	oxidative dehalogenation alkyl (0.800) aliphatic hydroxylation (0.800)	oxidative dehalogenation alkyl (0.545) aliphatic_dehalogenation (0.545)	aliphatic hydroxylation (0.824) aliphatic_dehalogenation alkyl (0.824) oxidative dehalogenation alkyl (0.824)	aliphatic_dehalogenation (0.824) aliphatic hydroxylation (0.824) oxidative dehalogenation alkyl (0.824)	reductive dehalogenation (0.8664)	aliphatic_hydroxylation_primary_carbon_and_in_SPC_or_SPL (0.303) carboxylation_primary_carbon_next_to_quaternary_carbon (0.368)	oxidative dehalogenation alkyl (0.616) aliphatic_dehalogenation (0.616) aliphatic hydroxylation (0.616)
TIMES (score)	#125 Aliphatic C-Hydroxylation (0.358) #240 Hydrolytic Cleavage (0.350) #614 Oxidative Dehalogenation (0.283)	#115 Aliphatic C-Hydroxylation (0.358) #125 Aliphatic C-Hydroxylation (0.358) #614 Oxidative Dehalogenation (0.283)	#332 Oxidative Dehalogenation (0.900)	#127 Aliphatic C-Hydroxylation (0.484) #332 Oxidative Dehalogenation (0.484)	#125 Aliphatic C-Hydroxylation (0.218) #182 Dehalogenation (0.218) #614 Oxidative Dehalogenation (0.172)	#625 Reductive dehalogenation (0.455)	#520 Aliphatic C-Hydroxylation (0.850)	#332 Oxidative Dehalogenation (0.146) #421 Conjugation of Alkyl Chlorides with Glutathione (0.146)
in vivo rat v.08.14								

表 1. (続き)

PubChem から得られた吸収・代謝・排出についての情報を示す。代謝は実測の結果と Meteor、GLORYx、TIMES による予測の結果を示す。

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(21KD2005)

令和4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 客員研究員
研究協力者	山田 隆志	国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長
研究協力者	Susanne Stalford	ラーサ研究所 研究員
研究協力者	Alex Cayley	ラーサ研究所 研究員
研究協力者	Alun Myden	ラーサ研究所 研究員
研究協力者	Emma Hill	ラーサ研究所 研究員

研究要旨

リードアクロスの信頼性の向上へ向けて、毒性機序に基づく生殖発生毒性(DART) AOP キーイベント等のデータをリスク評価に用いるため、REACH 登録情報など国際的なデータベースなどから毒性データを追加収集し、さらなる AOP 作成のためのデータマイニングを行うことを目的とした。令和4年度は、ECHA の REACH に登録されているデータセットを用いて、DART リスクと DART の原因となる潜在的メカニズムの探索を行った。その結果、ECHA REACH データセットの大部分は現時点での DART AOP ネットワーク内に含まれておらず、このデータセットが新たな AOP やそのメカニズム(MIE や KE 等)を開発する為の検証データセットとして有用であると考えられた。化学構造フィンガープリント法による類似性検索を用いると AOP ネットワークにヒットする物質数が上がり、*in silico* 毒性予測ツールである Derek Nexus よりも感度が高くなることがわかった。一方、偽陰性となる物質も多くあることが判明した。偽陰性となる物質について、DART と関連する Derek アラートの探索を行ったところ、ミトコンドリア毒性、トポイソメラーゼ II 阻害に関連する物質が比較的多く検出できた。今後はこれらのキーイベントに関して詳細な検討を行うことにより新たな AOP 開発が可能となると考えられた。

A. 研究目的

現在、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。この *in silico* 予測手法の一

つである定量的構造活性相関(QSAR)について、医薬品不純物の遺伝毒性評価における ICH M7 ガイドラインの中で、行政利用として利用されるようになったものの、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。R3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リスク評価に適用する場合のケーススタディにより、AOP アプローチの優位性を検証したが、依然生殖毒性に関するデータギャップが多いことも示された。そこで R4年度は、ECHA-REACH 登録情報など国際的なデータベースなどから毒性データを追加収集し、さらなる AOP 作成のためのデータマイニングを行うことを目的とした。

B. 研究方法

データセットの作成

ECHA REACH に提出された 2,278 件の研究(陽性 711 件、陰性 1,567 件)から OECD ガイドライン(TG 421、TG 442、TG 414-416、TG 443)に従って実施された試験から生殖発生毒性(DART)データを抽出した。

モデルの検証

データギャップ検証のため、ラーサ研究所

の DART AOP ネットワークに対して類似検索方法を行うとともに Derek Nexus の性能も検証した。

データマイニングと知識抽出

in silico モデルがうまく機能しない化学的・生物学的空間の領域の特定するために、ECHA REACH DART データセットにおける化合物のアッセイおよびモデル結果をレビューした。

(倫理面への配慮)本研究は動物及びヒト試料等を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

データセットの作成

ECHA REACH に提出された 2,278 件のデータセットの解析により、CAS 番号に基づいて 1,647 種の化合物を特定した。データセットの構造を SMILES から INCHI に変換し、ラーサ研究所内で開発した KNIME ノードを用いて構造標準化とコンテキスト化を行った。この処理の結果、コンテキスト化した INCHI に基づく 1,590 種、標準化 INCHI では 1,612 種の化合物について 2,237 件のデータセットを得た(表 1)。

これらは、実施されたガイドライン毎に分類され、保守的な判断で陰性と陽性の結果に分類した(表 2)。表 2 は、AOP ネットワークにリンクするための有用なデータを提供し、表 1 は、AOP ネットワークのパフォーマンスを検証するために使用した。

表 1: コンテキスト化した化合物数と試験結果が陽性と陰性の化合物数:

Dataset	Total number of study records	Total number of compounds	Positive compounds (any assay)	Negative compounds (any assay)
Contextualised	2237	1590	558	1032

表 2: ガイドライン毎に分類されたデータセットと試験結果が陽性と陰性の化合物数:

OECD Guideline	Total number of study records	Total number of compounds	Positive compounds	Negative compounds
		Contextualised	Contextualised	Contextualised
414	630	609	197	412
415	85	78	47	31
416	176	166	75	91
421	444	341	105	236
422	883	671	198	473
443	19	19	4	15

モデルの検証

ECHA REACH データセットの化合物と AOP ネットワークのデータとの重複の比較: 類似性検索機能を行うに、ECHA REACH データセット内にある、ラーサ研究所の AOP ネットワークにそのアッセイデータがある化合物の数を求めた(表 3)。

表 3 データセット化合物と AOP ネットワークデータとの重複

	All assay data associated to our AOP network*	AO assay data associated to our AOP network
Number of compounds	786/1590	313/1590

この結果は、AOP ネットワークとリンクしていない新規の 804 化合物であることを示していると共に、AOP ネットワークに既に存在する 786 化合物のうち、毒性データがあるのは 313 化合物に留まっていることを示している。このため、ECHA REACH データセットには 1,277 種の化合物に対する新たな毒性データがある。したがって、このデータセットは AOP ネットワークツールを検証するのに役立つほか、現在のデータギャップを特定することができると考えられる。

類似性検索法の検証: 類似性検索における化学的フィンガープリントを生成する為のフラグメンテーション法のうち、CERES2(ラーサ独自方法)、EFP4(Extended-Connectivity Fingerprint 法に基づいてラーサ研究所が作成した方法)および、アトムペア extended sybyl(アトムペアに基づいた独自方法)を用いて、それぞれの手法で Tanimoto 類似性閾値を 100%、90%および 80%としたときの性能を検証した。その結果、CERES2 法が類似性検索閾値の減少に対して、カバーする化合物数の増加が最も大きく、明らかに類似していない化合物とのマッチが少ないことが示された。

図 1 及び表 4 に示すように、CERES2 類似性方法(類似性 90%、80%)の性能を、AOP ネットワーク内の完全一致の性能や DART 関連 DX アラートの性能と比較した。AOP ネットワーク内の完全一致の性能で判るように、類似検索する前に 74 の偽陽性(FP)が含まれている。この FP のうち 52 は、AOP ネットワークに MIE および KE ベースのデータがある化合物であるが、必ずしも *in*

vivo 毒性試験結果を反映していない MIE や KE のアッセイ結果に基づいている可能性がある。また 74 の FP のうち残りの 22 は、有害性発現 (AO) データに基づいているが、AO ベース試験の複雑さに基づいている可能性がある。AOP ネットワーク内の完全一致の性能のモデルでは、全体のバラン

ス精度は約 55%、感度は 20% 未満であり、DX DART 関連アラートの性能とよく一致している。これらのモデルを CERES2 に基づく類似性評価法の性能と比較した場合、バランス精度は類似化合物探索で影響を受けないことが、類似性の閾値を下げると感度は約 45% に劇的に増加した。

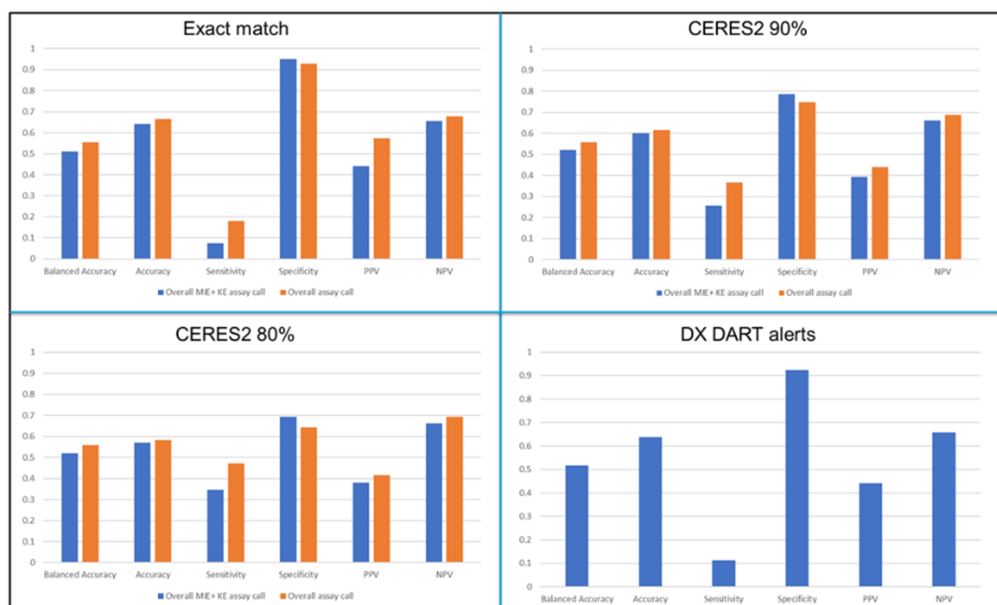


図 1：各予測法の性能の比較

表 4：各予測法の性能の比較

		Total	TP	FP	TN	FN	Equivocal	Out of Domain
exact match	Overall MIE+ KE assay call	1590	41	52	980	517	0	0
exact match	Overall assay call	1579	100	74	951	454	11	0
CERES2 0.9	Overall MIE+ KE assay call	1590	143	221	811	415	0	0
CERES2 0.9	Overall assay call	1580	203	259	767	351	10	0
CERES2 0.8	Overall MIE+ KE assay call	1590	193	317	715	365	0	0
CERES2 0.8	Overall assay call	1579	260	366	660	293	11	0
DX DART alerts	N/A	1590	63	80	952	495	0	0

類似性に基づくこの AOP 検索法は、Derek Nexus と比較して、陽性化合物の感度を改善するが改善の余地も示した。例え

ば、どのモデルでも「全体での MIE + KE アッセイコール」を「全体のアッセイコール」と比較することで感度に違いのあることが示さ

れている。これは、MIE または KE に関連する化合物とのマッチングを通じて、現時点で AOP を特定しうる DART 物質よりも多くの陽性物質を特定できる可能性のあることを示している。図 2 は、ECHA REACH データセットの陽性化合物に一致する関連データのある MIE アッセイを示したものである (CERES2 法、類似性閾値 80%)。これは、データセット内の化合物に重要な意味を持つ

とされる経路に関する知見を示しており、AOP ネットワーク内で最も多く予測される MIE が炭酸脱水酵素阻害であり、次が HDAC 阻害とアロマトラーゼ阻害であることが示されている。これ以外にも、ホルモン攪乱や神経伝達物質の阻害などの因子に関して、広範囲にわたる MIE が予測されている。

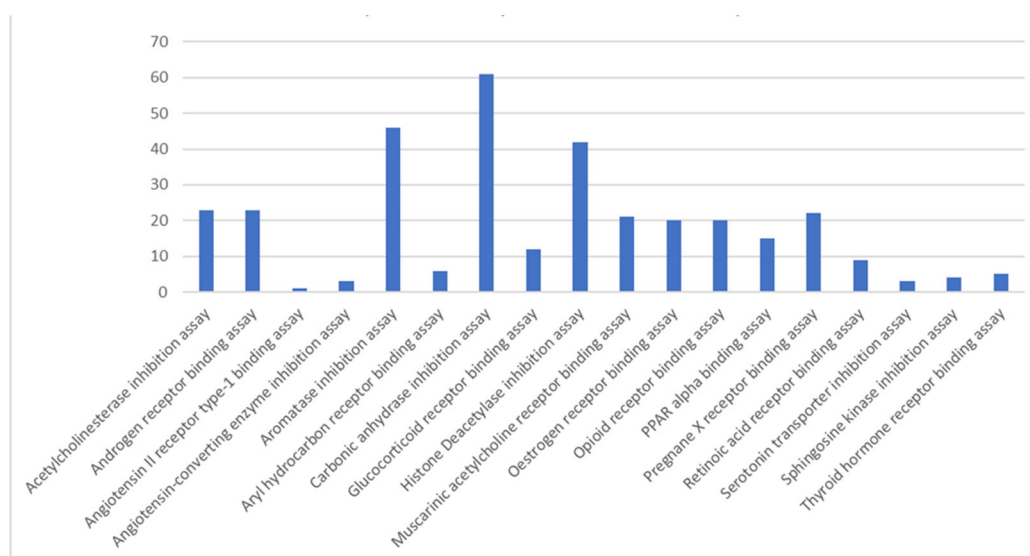


図 2: AOP ネットワークとリンクする MIE アッセイによって予測された陽性化合物の数

データマイニングと知識抽出

「全体での MIE + KE コール」を用いた AOP 類似性検索 ((CERES2 法、類似性閾値 80%)) における偽陰性 (FN) を対象として AOP ネットワーク内のデータおよびメカニズム的ギャップを調査した。FN と結びついた推定作用機序 (MoA) を特定する為、FN に関する Derek Nexus アラートの調査を行い、AOP ネットワーク内に適切な AOP があると考えられるが現時点では把握できていないものと、適切な AOP がネットワークにないと考えられるものの 2 種類をマイニングした。

まず、AOP ネットワーク内に既に適切な AOP があると考えられる FN の特定に関連する結果として、

・データセットにグルタチオン枯渇およびグルタチオンとの求電子反応に関連する Derek アラートとして 40 の FN を捕捉した (表 5)。これらのアラートは、雄の受精能低下の AOP をもたらすグルタチオン減少とリンクしている可能性があり、R 元年度の研究で既に開発したグルタチオン枯渇経路内の KE を予測する可能性もある。その他に AOP に対して 1~5 の化合物を捕捉するその他の Derek アラートが示された。

表 5:AOP ネットワーク内で KE にリンクする可能性がある Derek アラート

Putative MoAs associated to Derek alerts	Number of times a relevant alert was fired	Relevant DART AOP in network
Glutathione (GSH) depletion	41	Yes, (developed)
Glutathione (GSH) reaction with electrophile	13	Yes, (developed)
Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) binding	5	Yes, PPAR α – relevant pathway
Estrogen receptor (ER) binding	5	Yes
Choline deficiency	4	Potentially
Triiodothyronine (T3) decrease	2	Yes
Thyroxine (T4) decrease	2	Yes
Thyroid peroxidase inhibition	2	Yes
Gonadotrophin-releasing hormone inhibition	1	Yes, (developed)
Estrogen receptor (ER) modulation	1	Yes
Dihydrofolate reductase (DHFR) modulation	1	Yes
Cholinesterase inhibition	1	Yes
Aromatase (CYP19) inhibition	1	Yes

表 6:Derek アラートによって特定された推定 MoA を伴う FN(現時点では AOP がない)

Putative MoAs associate to DX alerts	No of times a relevant alert was fired	Relevant DART AOP in network	Additional evidence linking the MoA to DART
Mitochondrial dysfunction	21	No	Yes
Electron transport chain inhibition - succinate-coenzyme Q reductase (SQR)*	1	No	Yes
Krebs cycle inhibition - alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex inhibition*	1	No	Yes
Carnitine depletion*	1	No	Yes
Beta-oxidation competitive substrate*	1	No	Yes
Uncoupling of oxidative phosphorylation*	5	No	Yes
Topoisomerase II-DNA cleavage complex binding	14	No	Yes
Cytochrome P-450 (CYP) inhibition	5	No	Insufficient clarity
Cytochrome P-450 (CYP) increase	2	No	Insufficient clarity
Phospholipidosis	4	No	Insufficient clarity
Constitutive androstane receptor (CAR) binding	3	No	Insufficient clarity
Protein disulfide exchange with nucleophile	3	No	Insufficient clarity
Haemoglobin binding (M)	2	No	Insufficient clarity
Tubulin binding	2	No	Yes
Phosphodiesterase inhibition	1	No	Yes
Pregnane X receptor (PXR) binding	1	No	Insufficient clarity

また、DART ネットワーク内の適切な AOP で、現時点でカバーしないと思われる FN の特定に関連する結果を表 6 に示した。このうち、いくつかの AOP について文献レビューを実施した。

- ・ データセットに約 20 の FN を捕捉するミトコンドリア毒性に関連するアラート
- ・ データセットに 14 の FN を捕捉するトポイソメラーゼ II 結合に関連するアラート
- ・ カルボン酸に代謝される可能性があり、亜鉛代謝、脂質代謝や胚 pH 不均衡を阻止するエステルおよびジエステル。しかし、毒性を引き起こす機序については不明。

D. 考察

ECHA REACH データセットを用いて、現在のラーサ研究所の DART AOP ネットワークに対して類似性検索方法を検証し、データセット内の化学物質の DART リスクと、DART の原因となる潜在的メカニズムを探索することを目的とした。その結果、ECHA REACH データセットの大部分は現時点での DART AOP ネットワーク内に含まれておらず、したがって、このデータセットは新たな AOP やそのメカニズム (MIE や KE 等) を開発する為の検証データセットとして有用であると考えられた。CERES2 化学構造フィンガープリント法による類似性検索を用いて類似度閾値を 80% とした場合、*in silico* 毒性予測ツールである Derek Nexus よりもモデルの感度が大幅に高くなることがわかった。しかし、同時に機構の根拠を予測しうる化合物 (MIE + KE コールにより予測された化合物) を検討したところ、提供

された活性化化合物 365 種が予測できない (FN となる) ことも判り、さらなる知識の集積が必要であることも判明した。

そこで、FN 化合物を調査したところ、一部の化合物は AOP ネットワークによって捕捉されたが、されないものもあることが判明した。これは、現時点で当社のネットワークにある関連 AOP にリンクしているデータが不十分であることが原因である。このような FN のいくつかを、関連する Derek アラートを AOP ネットワークにリンクすることによって捕捉することができると考え、推定される MoA の探索を行った。その結果、ミトコンドリア毒性、トポイソメラーゼ II 阻害を KE の候補とする等とする物質が多く検出された。その他に DART に関連する可能性のある KE もいくつか見つけることができた。今後はこれらの KE に関して、より詳細なメカニズム等について文献検索等を行得ことにより、新たな AOP 開発が可能となると考えられた。

E. 結論

国際的なデータベースなどから毒性データを追加収集し、さらなる AOP 作成のためのデータマイニングを行うことを目的とし、ECHA REACH データセットを用いて、DART リスクと、DART の原因となる潜在的メカニズムの探索を行った。その結果、ECHA REACH データセットの大部分は現時点での DART AOP ネットワーク内に含まれておらず、このデータセットが新たな AOP やそのメカニズム (MIE や KE 等) を開発する為の検証データセットとして有用であると

考えられた。化学構造フィンガープリント法による類似性検索を用いると AOP ネットワークにヒットする物質数が上がり、*in silico* 毒性予測ツールである Derek Nexus よりも感度が高くなることがわかった。一方、偽陰性となる物質も多くあることが判明した。偽陰性となる物質について、DART と関連する Derek アラートの探索を行ったところ、ミトコンドリア毒性、トポイソメラーゼ II 阻害に関連する物質が比較的多く検出できた。今後はこれらのキーイベントに関して、より詳細な検証を行うことにより、新たな AOP 開発が可能となると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada T, [Hirose A](#), Hill E, Fowkes A, Myden A, Stalford S. Development of Adverse Outcome Pathway for histone deacetylase inhibition leading to fetal skeletal malformations. *In preparation*

Stalford S, Myden A, Fowkes A, Hill E, [Hirose A](#), Yamada T. Using new data to identify gaps in knowledge: identification and development of an Adverse Outcome Pathway for glutathione depletion leading to impairment of male fertility. *In preparation*

Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Miura M, Ohata H, Katsutani K, Matsumoto M, [Hirose A](#). Formation and evaluation of mechanism-based chemical categories for regulatory read-across assessment of repeated-dose toxicity: a case of

hemolytic anemia. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*; 2022, 136: 105275.

Yamada T, Katsutani K, Maruyama T, Kawamura T, Yamazaki H, Murayama N, Tong W, Yamazoe Y, [Hirose A](#). Combined risk assessment of food-derived coumarin with *in silico* approaches. *Food Safety*. 2022, 10, 73-82.

Ohno A, Okiyama Y, [Hirose A](#), Fukuhara K., The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15; 441:115974, 2022.

Kawashima A, Inoue K, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Matsumoto M, Masumura K, [Hirose A](#). Derivation of human health hazard assessment values for toluene under the Japanese Chemical Substances Control Law. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2022;9(4), 123-133.

Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta 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 MutaTM mice. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2022; 9(2), 31-36.

2. 学会発表

山田 隆志, 辻井 伸治, 三浦 稔, 齊藤 亮子, 川村 智子, 丸山 多恵子, 勝谷 成男, [広瀬 明彦](#) : IATA による化学物質の神経毒性評価を補完する *in silico* アプローチ : 神経毒性に関連する部分構造と物理化学的および生化学的パラメータを用いたカテゴリ

- 一の精緻化, 日本動物実験代替法学会第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
- Yamada T, Tsujii S, Miura M, Saito A, Kawamura T, Maruyama T, Katsutani N, Hirose A, *In silico* approach that supports neurotoxicity assessment of chemical substances by IATA: Refining categories by using substructures and physicochemical and biochemical parameters related to neurotoxicity, 11th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (2022.10.20, Chapel Hill)
- Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Umamo T, Hirose A : Derivation of a target value of 1,3-butadiene, a possible contaminant, in drinking water. The 16th International Congress of Toxicology (ICTXVI) (2022.9.18-21, Maastricht)
- 山田 隆志, 勝谷 成男, 丸山 多恵子, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦 : ピロリジジンアルカロイドの肝毒性評価への New Approach Method (NAM) の適用, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
- 勝谷 成男, 山田 隆志, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦 : 食品中に含まれるクマリンの肝毒性リスク評価についての *in silico* アプローチ, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
- 広瀬明彦 : ニトロソアミン不純物の発がんリスク、ICH M7/QSAR ワークショップ (日本環境変異原ゲノム学会 第 51 回大会のサテライトミーティング) (2022.10.21, 東京 Online Hybrid)
- 田邊 思帆里, カデール サビーナ, 小野 竜一, カブラル オラシオ, 青柳 一彦, 広瀬 明彦, Edward J PERKINS, 横崎 宏, 佐々木 博己 : 治療抵抗性胃癌に関する Adverse Outcome Pathway (AOP ; 有害性発現経路) の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
- 小野 竜一, 山本 雄介, 成瀬 美衣, 田邊 思帆里, 吉岡 祐亮, 相崎 健一, 広瀬 明彦, 落谷 孝広, 平林 容子, 北嶋 聡 : cfDNA による毒性評価, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
- 大野 彰子, 沖山 佳生, 広瀬 明彦, 福原 潔 : 3 ニトロ多環芳香族炭化水素の変異原性 : ニトロ基の付加位置に関する *in silico* 解析, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
- 牛田 和夫, 井上 薫, 甲斐 薫, 山下 ルシア幸子, 鈴木 洋, 広瀬 明彦 : 化審法のリスク評価 (一次) 評価 I での発がん性定量的評価のために求められる変異原性評価のあり方 : 閾値の有無に関する再検討, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)

井上 薫, 鈴木 洋, 橋本 清弘, 三島 雅之,
古濱 彩子, 杉山 圭一, 広瀬 明彦 :
微量変異原性不純物として検出され
たニトロソアミン類の変異原性及び
発がん性ポテンシャルに応じた管理
のための条件の検索、第 49 回日本毒
性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札
幌)

松本 真理子, 広瀬 望, 磯 貴子, 村田 康
允, 重田 善之, 馬野 高昭, 広瀬 明
彦: Derivation of a target value of
perfluorooctanoic acid in drinking water.
第 49 回日本毒性学会学術年会
(2022.6.30-7.2)

磯 貴子, 村田 康允, 重田 善之, 広瀬 望,
馬野 高昭, 堀端 克良, 増村 健一,
杉山 圭一, 松本 真理子, 広瀬 明
彦 : Evaluation of the *in vivo*
mutagenicity of Carbendazim. 第 49 回
日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-
7.2)

村田 康允, 磯 貴子, 重田 善之, 広瀬 望,
馬野 高昭, 堀端 克良, 増村 健一,
杉山 圭一, 松本 真理子, 広瀬 明
彦 : The gene mutation test of styrene
using the transgenic mouse. 第 49 回日
本毒性学会学術年会 (2022.6.30-
7.2)

重田 善之, 広瀬 望, 磯 貴子, 村田 康允,
馬野 高昭, 松本 真理子, 広瀬 明
彦 : GHS classification study of

substances that caused occupational
accident. 第 49 回日本毒性学会学術
年会 (2022.6.30-7.2)

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4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	
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	
研究協力者	小野 敦	国立大学法人岡山大学 学術研究院	医歯薬学域
研究協力者	加来田博貴	国立大学法人岡山大学 学術研究院	医歯薬学域
研究協力者	児玉 進	国立大学法人岡山大学 学術研究院	医歯薬学域

研究要旨

欧米で活発に検討されている *in vitro-in vivo* 外挿（IVIVE）の実用性について検討した。この検討は多岐に亘るため、昨年度は、1) IVIVE に使用される PBK モデルの解析とそれらを用いた IVIVE 論文のトレース、2) IVIVE 用 PBK モデルに必要なパラメータ値の整備に関する調査、3) IVIVE の予備的な試行について検討した。本年度は、経口摂取後の化学物質が、血流により肝臓、脂肪、腎臓等のコンパートメントに輸送・分配されるとともに、肝代謝と腎排泄により消失すると想定した汎用マウス PBK モデルを作成し、bisphenol A 単回投与時のマウス血中濃度のモデル推定値が実験データと一致することを確認した。PBK モデルパラメータ値のうち腸管吸収に係るパラメータを得ることを目的として Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験及び PBK モデルに必要な代謝クリアランスに係るパラメータを得ることを目的としてマウス肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験を実施した。細胞膜透過性試験では、指標化合物 1 物質及び被験物質 5 物質について透過係数（Papp）の算出を実施したが試験系の妥当性が確保できなかったため腸管吸収に関する有用なパラメータを得ることはできなかった。一方、代謝安定性試験では 1 物質のみであるが 4- α -cumylphenol の肝クリアランスについてのパラメータを得ることができた。さらに、4- α -cumylphenol の PBK モデルパラメータ値を *in vitro* および *in silico* 手法で決定し、*in vitro* アッセイ濃度と等価な *in vivo* 影響用量への換算係数をモデルで求めた。この換算係数を用い、エストロゲン受容体（ER）アゴニスト活性に関する *in vitro* アッセイの AC₅₀ 値や ACC 値から外挿した等価 *in vivo* 影響用量は、マウスの子宮肥大試験の NOEL や LOEL の値と大きな相違はなく *in vitro* アッセイデータの IVIVE は有用と思われた。次年度は、さらに検討物質を増やし、*in vitro* 測定や *in silico* 推定によりパラメータ値を整備して IVIVE を実施し、子宮肥大影響評価における IVIVE の実用性を検討する。

A. 研究目的

現在、多数の化学物質が安全性未評価のまま流通しており、それらのリスク管理は世界的な課題である。化学物質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* 手法等の利用促進を図っているが、ヒト健康リスク評価での利用は限定的である。定量的構造活性相関 (QSAR) は、ICHM7 ガイドラインに基づいた医薬品不純物の遺伝毒性評価で利用されるようになったが、化学物質規制での利用拡大には、高品質データセットの使用、モデル予測精度の更なる向上、予測結果の信頼性評価法等、手法の高度化が必要である。

また、動物福祉は国際的に大きな流れとなっており、動物試験の段階的削減は不可避である。有害性評価において、New Approach Methodology (NAM) は、*toxicokinetics* や *toxicodynamics* を包含する動物不使用の *in silico*, *in vitro* 等のアプローチ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の向上が期待されている。諸外国の規制当局は、新規動物試験を最小限に抑え、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受け入れは未だ限定的で、ケーススタディで信頼性や規制上のニーズを満たし得ることの概念実証が求められる。さらに、NAM 受け入れ促進のため、その知識をリスク評価関係者が共有する必要がある。

本研究では、化学物質の体内動態を推定する生理学的動力学 (PBK) モデルを利用した *in vitro*-*in vivo* 外挿 (IVIVE) が欧米で活発に研究されていることを考慮し、この手法の実用性について検討する。

IVIVE は、*in vitro* アッセイ試験液中遊離

態濃度と等価な血中濃度の推定、PBK モデルによる等価血中濃度と投与量の関係の推定、さらに等価響量用量の推定を含み、実用性の評価には多岐に亘る検討が必要であり、昨年度は、使用される PBK モデルとそれらを用いた IVIVE 論文のトレース、モデルパラメータ値の整備に関する調査および IVIVE の予備的試行を行った。その結果、調査した PBK モデルは血中濃度を適切に推定できるが、モデルパラメータの中には *in vitro* 肝クリアランスのように、既存のオンラインデータベースや推定ツールの値と既報文献値の間に大きなバラツキが存在するものもあることが明らかになった。しかし、これらのデータベースや推定ツールの値で IVIVE の試行の結果、現状で IVIVE の試行は可能と判断された。

そこで、本年度は、エストロゲン受容体 (ER) アゴニスト活性に関する既報の *in vitro* アッセイの結果から IVIVE でアッセイ濃度と等価な *in vivo* 影響用量を推定し、国衛研が保有しているマウスの子宮肥大試験結果との比較を試み、内分泌かく乱影響評価への適用性を検討した。また、この検討に際しては、IVIVE に適用可能な汎用的なマウス PBK モデルを構築し、*in vitro* および *in silico* 手法で決定したパラメータ値を使用した。

B. 研究方法

昨年度に実施した調査および検討の結果と今年度に新たに得られた文献情報を基に、IVIVE に適用する汎用的なマウス PBK モデルを構築し、既報のマウス血中濃度の時間変化と比較することにより、モデルの検証を行った。さらに、*in vitro* および *in silico* の手法で整備したモデルパラメータ値を用いて、ER アゴニスト活性に関する *in vitro* アッ

セイの濃度を等価な*in vivo*影響用量に外挿するための換算係数をモデルで算出した。そして換算係数を用いて、*in vitro*アッセイのAC₅₀とACC値を等価な影響用量を外挿し、マウスの子宮肥大試験結果と比較し、評価した。

B.1. 汎用マウスPBKモデルの構築

マウス PBK モデルは、今後、様々な物質に適用する可能性があることを考慮して、汎用的なモデルとした。マウスの身体は、血液、脂肪、高血流組織、低血流組織、腎臓、肝臓の代表的な 6 コンパートメントで構成し、経口摂取した化学物質は消化管から吸収され、肝臓を経由して血流により全身の各コンパートメントに輸送・分配されるとともに、肝臓で代謝され、また腎臓から排泄されると想定して、R 言語でモデルをコード化した。

体重、組織重量、血流量等の生理学的パラメータはマウスに特異的な値を採用したが、化学物質に固有のパラメータについては情報がほとんど得られない（特にマウスに対して）ため、それらのパラメータ値は以下のように整備した。

- ・組織と血液間の分配係数：オクタノール/水分配係数 (Kow) で推定されるラットに対する値を代用
- ・消化管からの吸収速度定数：Caco-2 透過係数 (*in vitro* 測定値または *in silico* 推定値) から算出
- ・肝クリアランス：*in vitro* で測定または *in silico* で推定される S9、肝細胞または肝ミクロソームでのクリアランスから計算
- ・腎クリアランス：血漿蛋白質非結合割合 (*in vitro* 測定値または *in silico* 推定値)、尿細管再吸収率 (Kow から計算) 等から

計算

作成したモデルを用いて、bisphenol A (BPA) を 0.4 mg/kg および 100 mg/kg でマウスに単回経口投与した場合の血中濃度の投与後 30 分～6 時間までの変化を計算し、CD1 マウスでの実験結果 (Taylor et al., 2011) と比較した。計算に際して、組織/血液分配係数、Caco-2 透過係数、ミクロソームでの *in vitro* クリアランスおよび血漿蛋白質非結合割合はラットに対する値を代用した。組織/血液分配係数以外は測定値であり、ミクロソームでのクリアランスは、フェーズ I の NADPH 依存性反応に加えて、フェーズ II のグルクロン酸抱合と硫酸抱合も含む総クリアランス測定値である。

さらに各組織/血液分配係数、血漿蛋白質非結合割合、*in vitro* ミクロソームクリアランス、Caco-2 透過係数等の単回経口投与時の BPA の血中最高濃度に及ぼす感度を解析した。

B.2. *in vitro*試験によるPBKモデルパラメータ値の整備

国立大学法人岡山大学において、PBK モデルに必要な腸管吸収に係るパラメータを得ることを目的として Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験及び PBK モデルに必要な代謝クリアランスに係るパラメータを得ることを目的としてマウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験を実施した。

被験物質は、ER アゴニスト活性に関する既報の *in vivo* 及び *in vitro* アッセイ両方のデータがある物質とした。具体的には、*in vivo* アッセイとして国衛研が保有しているマウスを用いた経口投与による子宮肥大試験、これと関連する *In vitro* アッセイとして ER レポーター遺伝子アッセイのア

ゴニスト活性評価系に相当するハイスクリーンアップスクリーニング (HTS) アッセイである Tox21_Era_BLA_Agonist_ratio および/あるいは Tox21_Era_LUC_VM7_Agonist として下表に示す 12 物質を選定した。

表 1 被験物質

化学物質	CAS
4-Alpha-cumylphenol	599-64-4
Daidzein	486-66-8
Dicumyl peroxide	80-43-3
4-Hydroxybiphenyl	92-69-3
Phenolphthalein	77-09-8
2-Cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester	5232-99-5
Nordihydroguaiaretic acid	500-38-9
1,1,1-Tris(4-hydroxyphenyl)-ethane	27955-94-8
4,4'-Thiodianiline	139-65-1
N,N-Diphenyl-p-phenylenediamine	74-31-7
Cinnamic acid, phenethyl ester	103-53-7
Triphenyl phosphate	115-86-6

・Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験

対象物質は、被験物質 12 物質及び試験系の検証のため FDA ガイダンスで透過クラスが明記されている指標化合物のうち 3 物質 (透過性高: phenytoin (CAS 57-41-0), 透過性中: furosemide (CAS 54-31-9), 透過性低: chlorothiazide (CAS 58-94-6)) の計 15 物質とした。Caco-2 単層膜は岡山大学で保有する Caco-2 細胞から作成した。細胞の健全性を確認するため実験開始前後に経上皮電気抵抗 (TEER) を測定し TEER が 1,100 Ω 以上のチャンパーを実験に用いた。細胞

膜透過性試験に先立ち、UV-吸収測定、LC/MS/MS 測定のための測定条件プロトコル作成、MeOH 及び DMSO による溶解度試験を実施した。溶解度試験において溶解性に問題があった 4 物質 (dicumyl peroxide, N,N-diphenyl-p-phenylenediamine, cinnamic acid, phenethyl ester, triphenyl phosphate) を除く 11 物質について細胞膜透過性試験を実施した。このうち指標化合物 1 物質 (phenytoin) と被験物質 5 物質 (4-alpha-cumylphenol, 4-hydroxybiphenyl, phenolphthalein, 2-cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester, nordihydroguaiaretic acid) の計 6 物質について化合物濃度を LC/MS/MS 装置にて測定して透過係数 (Papp) (cm/sec) を算出した。残り 5 物質についてはサンプリングまで実施したが濃度測定までは完了できなかった。

・マウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験

試験実施するに当たり、7-ethoxycoumarin (7EC) を薬物代謝第 1 相酵素の陽性対照基質に用いて解析諸条件を検討し、評価実施用プロトコルを確定した。次いで、Caco-2 細胞膜透過性試験において透過性が確認された被験物質 4-alpha-cumylphenol (4-CP) および phenolphthalein (PP) の 2 物質についてマウス肝臓 S9 画分及び第 1 相酵素 (NADPH 再生系) による代謝の有無確認、または代謝安定性試験を実施した。なお、陽性対照基質及び被験物質の残存量は、各々について条件プロトコルを作成したのち、LC/MS/MS 装置を用いて測定した。消失速度定数 (k_e) 及び *in vitro* 代謝クリアランス CL_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ -蛋白質) は、次の通り算出した。代謝安定性試験における基質の未変化体残存率 (y 軸、%) を反応時間 x 軸、min) に対して片対数プロットした。

この場合、各反応液の 0 min のピーク面積を 100%とし、各時点における割合を算出した。得られた直線の傾きを ke とした。次いで、マウス肝臓 S9 画分の CL_{int} は、下記の式により算出した。

$$CL_{int} = 1,000 \times ke \text{ S9 画分タンパク質濃度 (mg protein/mL)}$$

B.3. IVIVEの試行

4-CP を対象に ER アゴニスト活性に関する既報の *in vitro* アッセイの結果から IVIVE で等価な *in vivo* 影響用量を推定し、国衛研が保有しているマウスの子宮肥大試験結果との比較を試み、内分泌かく乱影響評価への適用性を検討した。

4-CP に固有の PBK モデルパラメータである脂肪、高血流組織、低血流組織、腎臓および肝臓の組織/血液分配係数はオクタノール/水分配係数 ($\log Kow = 4.07$) を基に DeJongh et al., (1997) の式で推定した。さらに、消化管からの化学物質の吸収速度定数は、オンライン推計ツール *pkCSM* (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>) で推定した *Caco-2* 透過係数から算出し、肝クリアランスは、B.2 に記したように、*in vitro* で測定した S9 でのクリアランスの結果から算出した。また、血漿蛋白質非結合割合は、米国 EPA のオンラインデータベース *CompTox Chemicals Dashboard* (<https://comptox.epa.gov/dashboard/>) からヒトに対する *in vitro* での測定値を入手した。

整備した4-CPに特異的なパラメータ値を用い、汎用マウスPBKモデルで、単位経口投与量 (1 mg/kg/day) での血漿中非結合態のピーク濃度を推計し、IVIVEで等価な影響用量の推定に用いる換算係数を求めた。

IVIVEの対象とする*in vitro*アッセイデータとして、Tox21_ERa_BLA_Agonist_ratio

(AC_{50} : 10.37 μ M , ACC : 4.98 μ M) と Tox21_ERa_LUC_VM7_Agonist (AC_{50} : 0.67 μ M, ACC : 0.28 μ M) を選択し、マウスでの子宮肥大試験の結果 (NOEL: 300 mg/kg/day, LOEL: 1,000 mg/kg/day) と比較し、妥当性を評価した。なお、 AC_{50} は50%影響濃度、 ACC は有意な影響が見られる最小濃度である。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C.1. 汎用マウスPBKモデルの構築

作成した汎用マウス PBK モデルを用い、ラットに対する BPA の組織/血液分配係数の推定値と *Caco-2* 透過係数、ミクロソームでのクリアランスおよび血漿蛋白質非結合割合の測定値をマウスに代用して推定した 0.4 mg/kg および 100 mg/kg で BPA を単回経口投与した場合の血漿中濃度の時間変化は、CD1 マウスでの測定濃度の 1/2 ~ 1.5 倍の範囲内で、良い一致を示した (BPA の血液/血漿比をヒトと同じ 1.05 と仮定)。

単回経口投与時の BPA の血中最高濃度に及ぼす感度に関する分析では、血中最高濃度は、*in vitro* ミクロソームクリアランスと *Caco-2* 透過速係数に大きな感度があり、脂肪、高血流組織、低血流組織、腎臓および肝臓に対する組織/血液分配係数、血漿蛋白質非結合割合に対する感度は低かった。

C.2. *in vitro*試験によるPBKモデルパラメータ値の整備

- *Caco-2* 細胞を用いた細胞膜透過性試験
指標化合物 1 物質及び被験物質 5 物質について Papp 算出を実施した。その結果、指標化合物である phenytoin および被験物質

は 4-CP および PP について Caco-2 透過係数 (Papp) が下表のように算出された。他の 3 物質 (4-hydroxybiphenyl, 2-cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester, nordihydroguaiaretic acid) については検出限界以下のため測定値が得られず Papp は算出されなかった。

表 2 Papp ($\times 10^{-6}$ cm/sec)

Substance	sec	Ave. \pm SD
Phenytoin	900	1.94 \pm 0.24
	1,800	2.68 \pm 0.51
	3,600	2.98 \pm 0.39
	7,200	2.82 \pm 0.21
4-CP	900	N.D.
	1,800	0.019 \pm 0.004
	3,600	0.030 \pm 0.008
	7,200	0.033 \pm 0.018
PP	900	ND
	1,800	0.16 \pm 0.02
	3,600	0.26 \pm 0.02
	7,200	0.30 \pm 0.02

・マウス肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験

陽性対照物質 7EC 及び被験物質 4-CP についてそれぞれの *ke* および *CLint* を算出した。7EC の *ke* は 0.406, それから求められた消失半減期 (*t* (1/2)) および *CLint* はそれぞれ 1.71 min および 406 μ L/min/mg-蛋白質であった。なお, NDAPH 再生系を添加しない場合 7EC の残存率は 95.3%であった。4-CP の *ke*, *t* (1/2)) および *CLint* はそれぞれ 0.117, 5.92 min および 117 μ L/min/mg-蛋白質であった。なお, NDAPH 再生系を添加しない場合 4-CP の残存率はばらつきが大きかったものの平均値は

102.5%であった。諸条件(濃度, 反応時間)は残存率と時間雄回帰式の線形性を十分に確保していた。なお, PP については, 測定装置 LC/MS/MS の不調などから *ke* および *CLint* の算出には至らなかった。

C.3. IVIVEの試行

log Kow を基に推定した 4-CP の脂肪, 高血流組織, 低血流組織, 腎臓および肝臓の組織/血液分配係数はそれぞれ, 148, 4.57, 1.15, 4.57 および 4.57 であった。また, Caco-2 透過係数推定値 (4.0×10^{-5} cm/s) から算出した消化管からの吸収の 1 次速度定数は 0.66/h で速やかに吸収されると推定された。また, S9 クリアランス測定値 (117 μ L/min/mg-蛋白質) から計算した肝クリアランスは 1.06 L/h で, ヒトでの血漿蛋白質非結合割合の測定値 (0.02) 等から算出した腎クリアランスは尿細管再吸収率が 1 のため, 4-CP の消失に寄与しないと推定された。

1 mg/kg/day で連続経口投与した場合に予想される血漿蛋白質非結合態の平均濃度は 0.00015 μ M (3.21×10^{-5} mg/L), ピーク濃度は 0.0063 μ M ($0.001.33 \times 10^{-3}$ mg/L) と算出された。さらに, ピーク濃度に基づく IVIVE 用換算係数は 160 mg/kg/day/ μ M (= 1 mg/kg/day/0.0063 μ M) と求められた。この換算係数から Tox21_ERa_BLA_Agonist_ratio と Tox21_ERa_LUC_VM7_Agonist の AC₅₀ 値から求めた等価の経口用量はそれぞれ, 1,660 および 107 mg/kg/day と外挿され, また, それぞれのアッセイの ACC 値から外挿された等価の経口用量はそれぞれ, 797 および 45 mg/kg/day であった。これらの等価経口用量は, マウスでの子宮肥大試験の NOEL と LOEL の値 (それぞれ, 300 と 1,000 mg/kg/day) と大きな相違はなかった。

D. 考察

2 投与レベルでの BPA のケースのみであるが、作成したマウス PBK モデルは、血中濃度の時間変化を再現した。使用した消化管吸収速度定数や肝クリアランスの値は、ラットに対する値であるが、ラットの値をマウスに代用することは PBK モデルの論文ではしばしば見られ、今回が特殊な事例ということはない。しかし、マウスと異なる生物種に対して得られる吸収速度定数や肝クリアランスを使用する場合は、PBK モデル計算結果や IVIVE の結果に不確実性が生じる可能性があることに注意が必要であるが、この不果実性の程度の定量化には、今後もマウス PBK モデルの検証が必要と考えられる。

Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験では、指標化合物とした 3 物質のうち高透過クラスの phenytoin 以外の物質では Papp が得られておらずこの試験の妥当性を確保できなかった。また、phenytoin の Papp 値についても文献値 26.9×10^{-6} cm/s (Yazdanian et al., 1998 referred in Hou et al., 2004) と比較して低い値であった。さらに、委託報告書には、透過試験後の薬液を LC/MS/MS 測定までの期間凍結にて保存したことにより化学物質の析出が認められ、LC/MS/MS での測定値が想定値よりも低く検出されたと報告されている。したがって、この試験で得られた Papp については、参考値として取り扱うことが望ましいと考えられる。一方、マウス S9 を用いた *in vitro* 代謝安定性試験については、陽性対照の 7EC のラットのクリアランスの文献値 (Carilile et al., 1998) をもとに両者を同じ肝臓 1 g 当たりのクリアランスで比較すると岡山大 2.12 L/h/g-liver, 文献値 : 0.97 L/h/g-liver となり 2 倍程度の差であり、4-CP のクリアランスについては、U.S.EPA の

CompTox Chemicals Dashboard に肝細胞 10^6 個当たりの *in vitro* クリアランスの測定値として、27.2 μ L/min/million hepatocytes があり、ラットの肝臓 1 g 中の細胞数 135×10^6 cells/g (Fabian et al., 2019) をもとに両者を同じ肝臓 1 g 当たりのクリアランスで比較すると岡山大 : 0.640 L/h/g-liver, U.S.EPA : 0.220 L/h/g-liver となり、3 倍弱であることから得られた試験データは妥当と考えられる。

4-CP, 1 物質のみであるが、2 種類の ER アゴニスト活性に関する *in vitro* アッセイのデータの AC₅₀ 値や ACC 値から IVIVE で推定した等価の *in vivo* 影響用量はマウスの子宮肥大試験の NOEL や LOEL と大きくは異ならなかったことから、今回検討した外挿手法は妥当と思われるが、手法の妥当性を判断するには、さらに他の物質での検討が必要である。さらに検討の過程において *in vitro* で測定されたパラメータ値を用いて、*in silico* 推定法の検証も同時に行うことができる。*In silico* 手法の導入は将来的には、IVIVE 法に必須と考えられるため、この検証も大事である。

E. 結論

本年度の検討の結果、*in vitro* アッセイのデータからのマウスの子宮肥大試験の影響用量推定を IVIVE で試行することは可能と思われた。次年度は、既報物性値や *in silico* 手法による推定値を基に、さらに検討に供する物質を選定し、*in vitro* 測定や *in silico* 推定によりパラメータ値を整備するとともに、IVIVE を試行し、子宮肥大影響評価への適用の妥当性をさらに検討する。

F. 研究発表

F.1. 論文発表
なし

F.2 学会発表

なし

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

H. 引用文献

Carlile, D.J, Stevens, A.J., Ashforth, E. L., Waghela, D., and Houston, J.B. (1998). *In Vivo* Clearance of Ethoxycoumarin and Its Prediction from; *In Vitro* Systems Use of Drug Depletion and Metabolite Formation Methods in Hepatic Microsomes and Isolated Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. 26, 216-221.

DeJongh, J., Verhaar, H.J., and Hermens, J.L. (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.

Fabian, E., Gomes, C., Birk, B., Williford, T., Hernandez, T.R., Haase, C., Zbranek, R., van Ravenzwaay, B., and Landsiedel, R. (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.

Hou, T.J., Zhang, K., Xia, W., Qiao, X.B., and Xu X.J. (2004). ADME Evaluation in Drug Discovery. 5. Correlation of Caco-2 Permeation with Simple Molecular Properties. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44, 1585-1600.

Taylor, J.A., Vom Saal, F., Welshons, W.V., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P.A., Toutain, P-L., Laffont, C.M., and Vandervoort, C.A. (2011). Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: Relevance for human exposure. *Environ. Health Perspect.* 119, 422-430.

Yazdanian, M., Glynn, S.L., Wright, J.L., and Hawi, A. (1998). Correlating Partitioning and Caco-2 Cell Permeability of Structurally Diverse Small Molecular Weight Compounds. *Pharm. Res.* 15, 1490-1494.

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4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
研究協力者 伊藤 潤 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
研究協力者 木下 啓 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
研究協力者 村崎 亘 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
研究協力者 中森 瑞季 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
研究協力者 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。本課題ではガイドラインNo.497にて検討された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）を学習データとして、OECDのテストガイドラインに記載されている*in vitro*試験結果やOECD QSAR Toolboxの化学物質情報を組み合わせて機械学習による皮膚感作性強度予測モデルを構築した。開発した予測モデルを基に、性能評価手法や適用領域の検討を行い、規制安全性評価への受け入れを目指した実用的な*in silico*モデル開発を進めている。また、テストガイドラインに記載されている*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*モデルの開発を行い、組み合わせ評価における有用性を検証した。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かつ汎化性の高い予測モデルの構築も行った。

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評価を行う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領域について評価する。また、開発した予測モデルの適用領域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

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 に関するテストガイドライ

ンに記載されている *in vitro* 試験結果 (DPRA、KeratinoSensTM、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。勾配ブースティング決定木による回帰モデルを作成し、予測モデルの性能評価は交差検証を用いて、決定係数 R² 値により行った。

B.2 *In vitro* 実験の予測モデル構築

皮膚感作性のAOPに関する*in vitro*実験結果を*in silico*で予測することは、難溶性物質等の*in vitro*実験の実施が困難な化学物質への対応など欠損値補完に対する有益なアプローチとなる。本課題では、令和3年度に、皮膚感作性の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) を評価する比較的簡便な*in chemico*試験である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KeratinoSensTM (OECD TG442D) に着目し、DPRAの実験結果とMOEで計算した分子記述子情報のみからKeratinoSensTMの実験結果を予測する*in silico*モデルを構築した。勾配ブースティング決定木系のアルゴリズムXGBoost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、Urbischのデータセット (*Regul Toxicol Pharmacol.* 2015; 71(2): 337-351) を外部検証データとしたところ正確度0.80となり高性能な予測モデルが得られた。そこで、令和4年度は開発したKeratinoSensTMの*in silico*モデルの有用性を確認するために、Defined Approachのガイドライン (No.497) にて示されたハザード同定のためのDefined Approachである”2 out of 3” (2試験の一致した

結果に基づき評価する方法) において、KeratinoSensTMの実測値を使用した場合と予測値を使用した場合の組み合わせ評価の性能を比較した。

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化学物質の構造情報のみから*in silico*で予測する機械学習モデルの構築に取り組んでおり、令和4年度は学習用データを追加した。Goldenらの文献 (*ALTEX.* 2021; 38(1): 33-48) に加えてHoffmannらの文献 (*Regul Toxicol Pharmacol.* 2022; 131: 105169)、Basketterらの文献 (*Dermatitis.* 2014; 25(1): 11-21)、Apiらの文献 (*Dermatitis.* 2017; 28(5): 299-307) 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。また、外部検証データは、信頼性が高く情報量の多い、Hoffmann (2022)、Basketter (2014)、Api (2017)の3つの文献から陽性20物質、陰性20物質の計40物質をランダムに抽出し、構築した予測モデルの汎用性を確認した。また、*in silico*モデルにおいて重要なデータ分割、性能評価、変数重要度によるモデルの説明性、適用領域について検討した。

(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

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。LLNA EC3値情報が正確に得られた128物質を用いて、CatBoost 1.0.3 (python 3.9.7)による回帰モデルを構築した。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、物性値を用いた。一つ抜き交差検証を実施したところ、決定係数 R^2 値が0.738となり高性能なモデルが得られた。また、欧州化学物質生態毒性・毒性センター (ECETOC, 2003) による4段階 (extreme, strong, moderate, weak) の感作性強度カテゴリーに予測EC3値を分類したところ、extremeに属する強感作性物質8物質のうち4物質を正しく予測することができた。特に、感作性の強い代表的な酸化染料であるパラフェニレンジアミン (pPD) とその3量体であるバンドルスキーベース (BB) の予測結果を確認したところ、pPDの本モデルでの予測値は0.264 (実験値0.11, strong)、BBの予測値0.069 (実験値0.03, extreme) であり、モデルの改良により強感作性物質の予測も可能となった。

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、予測性能と透明性を有している。

C.2 *In vitro* 実験の予測モデル構築

令和3年度に構築したKeratinoSens™の予測モデル化では、Hoffmann (2018)らの文献から122物質を訓練用データセット、Urbisch (2015)らの文献から102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と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種から選択された7種の記述子を説明変数とした。XGBoost 1.4.2 (python 3.8.12)による分類モデル (KeratinoSens™の陽性、陰性を判別) は、検証用データセットにおいて、正確度0.80、ROC-AUC 0.84の高い予測性能を示した。今年度は、Defined Approachである”2 out of 3”の組み合わせ評価において、使用するKeratinoSens™の結果を実験値の場合と、我々のモデルによる予測値の場合で比較した。検証用データセットに用いたUrbisch (2015)らの文献から48物質を用いた。”2 out of 3”による感作性判定結果と、LLNAにおける感作性の有無の一致率を確認した。KeratinoSens™の実験値を使用した”2 out of 3”では、LLNAの結果との一致率0.73、感度0.85、特異度0.47だった。一方で、KeratinoSens™の*in silico*予測値を使用した場合は、一致率0.77、感度0.82、特異度0.67だった。KeratinoSens™の予測値 (陽性、陰性の二値) は実験値と比較して、LLNAとの結果の一致率、感度が高い傾向が確認できた。以上の結果からKeratinoSens™の予測モデルは組み合わせ評価において有用である可能性が示唆された。

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、令和3年度に学習データとして使用したGolden(2020)らの文献に加えて、Hoffmann (2022)、Basketter (2014)、Api (2017)らの文献情報を追加し、陽性293物質、陰性182物質を学習用データセットとした。また、これまでの検証用データセットは陽性物質と陰性物

質の不均衡が大きかったため、Hoffmann (2022)、Basketter (2014)、Api (2017)の3つの信頼性が高い文献情報から40物質（陽性20物質、陰性20物質）を検証用データセットとした。MOEを用いて算出した440種の分子記述子から変数重要度の高い134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0.90、特異度0.60、ROC-AUC 0.85であり、高い予測性能を示した。分類モデルはPython3.8.5のCatBoostを使用した。また、変数重要度の高い134種において、LUMOに関する3つの変数は全て含まれていた。本モデルの適用領域はモデル構築に使用した分子記述子から計算したユークリッド距離を用いて、k近傍法 (k=5) により設定したデータ距離内の物質とした (図1)。

D. 考察

皮膚感作性強度を予測する機械学習モデルでは、OECD の皮膚感作性に関する Defined Approach のガイドライン (No.497) において公開された化学物質の試験情報を使用し、強度指標である LLNA の EC3 値を高性能で予測することができた。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、テストガイドラインに掲載された *in vitro* 試験法の結果、OECD QSAR ToolBox を用いた化学物質情報を用いており、予測性能と解釈性・透明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、本モデルを使用した外部検証を実施し、予測結果に基づきモデルの適用領域についても検討する必要がある。さらに適用領域の設定や変数重要度によるモデルの説明性向上に取り組むことで、実用的な *in silico* 評価手法となり得ることが期待され

る。今後は本モデルに対して、OECD が取りまとめている QSAR モデルの予測結果の信頼性を評価する方法の原則に従って、規制評価に必要な情報の明確化を検討する。

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、高い予測性能と汎化性能を示した。*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、実験結果が得られない場合がある。*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、Defined Approach である ”2 out of 3” の組み合わせ評価において、本モデルの KeratinoSens™ 予測値は、実験値を使用した場合と比較して同等またはそれ以上の予測性能 (LLNA における皮膚感作性の有無との一致) が確認されたため、代替法の組み合わせによる皮膚感作性評価において一定の有用性が期待できる。

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。また、本モデルでは、*in silico* モデルにおいて重要なデータ分割、性能評価手法、変数重要度によるモデルの説明性、適用領域についても検討しており、QSAR モデル構築へのフィードバックが可能となる。

E. 結論

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、信頼性の高い学習データを用いて高性能で感作性強度を予測する回

帰モデルを構築した。また、皮膚感作性のキーイベントである*in vitro*実験結果を*in silico*で予測する高性能かつ汎化性能の高いモデルを構築し、Defined Approachへの適用を検証した。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、性能評価や適用領域も検討した。今後は外部検証や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を整理する。また、本モデルに対して、OECDが取りまとめているQSARモデルの予測結果の信頼性を評価する方法の原則に従って、規制評価に必要な情報の明確化を検討する。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Ambe K., Akita A., Wei J., Yoshii Y., Onishi M., Tohkin M. Comparison of Efficacy and Safety of Direct Oral Anticoagulants and Warfarin between Patients in Asian and Non-Asian Regions: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. *Clin Pharmacol Ther.* Mar 2. doi: 10.1002/cpt.2881. 2023, Epub ahead of print.
2. Ashikaga T, Narita K, Kobayashi M, Tachibana S, Murasaki W, Suzuki M, Ambe K, Tohkin M. Skin sensitization potency prediction of ingredients in hair colorants using *in silico* models of machine learning. *Journal of Japanese Cosmetic Science Society.* 47(1), 1-5, 2023.
3. 安部賀央里 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発 コスメティックステージ 2月号 60-65, 2023.

F.2. 学会発表

1. 安部賀央里、成田和人、小林睦、立花 滋博、村崎亘、鈴木政晴、頭金正博、足利太可雄：機械学習アプローチを用いた *in silico* モデルによるヘアカラー原料の皮膚感作性強度予測. 第47回日本化粧品学会 (2022.6.10-6.11、東京-Online Hybrid)
2. 土井更良、安部賀央里、頭金正博：FAERS を用いた機械学習による薬物性肝障害の予測モデルの開発. 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2、札幌)
3. 安部賀央里：ヒトの副作用予測に向けた機械学習アプローチ シンポジウム13 「計算機科学を活用したヒトの有害事象研究の現状と展望」. 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2、札幌)
4. 村崎亘、安部賀央里、頭金正博、山田隆志、足利太可雄：機械学習アプローチによる皮膚感作性強度を予測する回帰モデルの開発. 第49回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2、札幌)
5. 吉井優花、大西真由、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 (DMARDs) の安全性の研究. 第6回日本臨床薬理学会東海北陸地方会 (2022.7.30、オンライン)
6. 木下啓、安部賀央里、足利太可雄、頭金正博：皮膚感作性の *in vitro* 試験法である KeratinoSens™ の結果を予測する機械学習モデルの構築. 第8回 次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26、東京)
7. 青木優佳、安部賀央里、村島美穂、濱野高行、頭金正博：低 Na 血症の発症を予

- 測する機械学習モデルの構築. 第 8 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2022.8.26、東京)
8. 吉井優花、大西真由、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の解析. 第 32 回日本医療薬学会年会 (2022.9.23-9.25、群馬・ハイブリッド)
 9. 土井更良、安部賀央里、頭金正博: Prediction of drug-induced liver injury *in silico* using large-scale adverse event database. CBI 学会 2022 年大会 (2022.10.25-10.27、東京)
 10. 榎波多真奈、安部賀央里、頭金正博: 化学構造の画像認識技術を用いた機械学習による CYP3A4 阻害活性の予測モデルの開発. 日本薬物動態学会第 37 回年会 (2022.11.8-11.10、横浜)
 11. 伊藤潤、安部賀央里、足利太可雄、頭金正博: 化学構造情報からヒトの皮膚感作性を予測する機械学習モデルの開発. 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.18-11.20、静岡)
 12. 木下啓、安部賀央里、足利太可雄、頭金正博: 皮膚感作性評価における *in vitro* 試験法の効率化を目指した機械学習モデルの開発. 日本動物実験代替法学会 第 35 回大会 (2022.11.18-11.20、静岡)
 13. 大西真由、吉井優花、劉臨風、安部賀央里、頭金正博: 臨床試験データを用いた生物学的製剤および JAK 阻害薬のメトトレキサート併用療法における有効性と安全性に関する研究. 第 43 回日本臨床薬理学会学術総会 (2022.11.30-12.3、横浜)
 14. 渡邊崇、安部賀央里、頭金正博: 機械学習を用いた添付文書への重大な副作用の追記予測. 第 43 回日本臨床薬理学会学術総会 (2022.11.30-12.3、横浜)
 15. 片山早紀、安部賀央里、頭金正博: 化学構造情報と *in vitro* 情報を使用した特異体質性薬物性肝障害の予測手法の開発. 第 5 回医薬品毒性機序研究会 (2022.12.8-12.9、東京)
 16. Kaori Ambe: Development of *in silico* model for skin sensitization evaluation using machine learning. ACAAE2022 the 3rd Asian Congress for Alternatives to Animal Experiments (2022.12.14-12.16、韓国 済州島- Online Hybrid)
 17. 濱上敦史、土井更良、安部賀央里、頭金正博: JAPIC AERS と機械学習を活用した胆汁うっ滞型薬物性肝障害の予測モデルの開発. 日本薬学会第 143 年会 (2023.3.25-3.28、札幌)
- 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

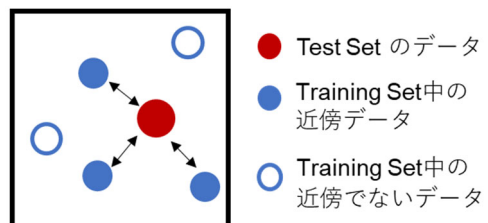


図 1 適用領域の設定方法 (k 近傍法)

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
Thakkar S, Slikker W, Yiannas F, Silva P, Blais B, Chng KR, Liu Z, Adholeya A, Pappalardo F, Soares MdLC, Beeler P, Whelan M, Roberts R, Borlak J, Hugas M, Torrecilla-Salinas C, Girard P, Diamond MC, Verloo D, Panda B, Rose MC, Jornet JB, Furuhashi A, Fang H, Kwegyir-Afful E, Heintz K, Arvidson K, Burgos JG, Horst A, Tong W.	Artificial intelligence and real-world data for drug and food safety – A regulatory science perspective.	Regul. Toxicol. Pharmacol.,	140	105388	2023
Murayama N, Yamada T, Yamazoe Y.	Application of CYP1A2-Template system to understand metabolic processes in the safety assessment.	Food Safety	10	129-139	2022
Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Miura M, Ohata H, Katsutani K, Matsumoto M, Hirose A.	Formation and evaluation of mechanism-based chemical categories for regulatory read-across	Regul. Toxicol. Pharmacol.	136	105275	2022

	assessment of repeated-dose toxicity: a case of hemolytic anemia.				
Yamada T, Katsutani K, Maruyama T, Kawamura T, Yamazaki H, Murayama N, Tong W, Yamazoe Y, Hirose A.	Combined risk assessment of food-derived coumarin with in silico approaches.	Food Safety	10	73-82	2022
<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	150	4-12	2022
Ohno A, Okiyama Y, Hirose A, Fukuhara K.	The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes.	Toxicol Appl Pharmacol.	441	115974	2022
Kawashima A, Inoue K, Ushika K, Kai K, Suzuki H, Matsumoto M, Masumura K, Hirose A.	Derivation of human health hazard assessment values for toluene under the Japanese Chemical Substances Control Law.	Fundam. Toxicol. Sci.	9(4)	123-133	2022
Murata, Y, Natsume, M, Iso, T, Shigeta, Y, Hirose, N, Umamo, T, Horibata, K, Sugiyama, K, Masumura, K, Hirose, A, Matsumoto, M.	In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung.	Genes and Environment	45(1)	12	2023
Murata Y, Umamo T,	Summary information	Bull. Natl Inst.	140	54-60	2022

Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Masumura K, Matsumoto M.	of human health hazard assessment of existing chemical substances (VIII).	Health Sci.			
Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A.	Absence of in vivo mutagenicity of 4,4'- oxybis(benzenesulfono hydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ mice.	Fundam. Toxicol. Sci.	9(2)	31-36	2022
Ambe K., Akita A., Wei J., Yoshii Y., Onishi M., Tohkin M.	Comparison of Efficacy and Safety of Direct Oral Anticoagulants and Warfarin between Patients in Asian and Non-Asian Regions: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis.	Clin Pharmacol Ther.	Epub ahead of print.	doi: 10.1002/ cpt.2881	2023
Ashikaga T, Narita K, Kobayashi M, Tachibana S, Murasaki W, Suzuki M, Ambe K, Tohkin M.	Skin sensitization potency prediction of ingredients in hair colorants using in silico models of machine learning.	Journal of Japanese Cosmetic Science Society	47(1)	1-5	2023
安部賀央里	機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発	コスメティックステージ	2月号	60-65	2023

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4年度厚生労働行政推進調査事業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4年度厚生労働行政推進調査事業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) 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部・部長
(氏名・フリガナ) 杉山 圭一・スギヤマ ケイイチ

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。

令和5年3月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長
氏名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金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4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。

令和5年3月30日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長
氏名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働行政推進調査事業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・客員研究員
(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4年度厚生労働行政推進調査事業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三室・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。

令和5年4月4日

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4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。