

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5年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山田 隆志

令和6年(2024年)5月

目 次

I. 総括研究報告	
<i>In silico</i> 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の 統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究	
山田 隆志.....	1
II. 研究分担報告	
1. 遺伝毒性評価に資する Ames/QSAR の深化	
杉山 圭一、古濱 彩子、本間 正充.....	19
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.....	36
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.....	51
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.....	72
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.....	84
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	92

令和5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

化学物質リスク評価の迅速化と 3Rs への対応のため、本研究では規制安全性評価に関連するエンドポイントを対象に、QSAR の高度化と、国際的に必要性が強く認識されている New Approach Methodology (NAM) の活用に基づく統合的評価系の基盤整備を遂行した。

Ames 変異原性を対象とした QSAR の高度化では、第二回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの成果を論文で公表し、Ames/QSAR の社会実装に有益となる情報の公開を果たした。更に、発がん性の懸念が高いが既存データにおいて陽性と陰性が混在する N-ニトロソアミン化合物の Ames 試験を実施し、Ames/QSAR 評価に資する知見を蓄積した。あわせて、深層学習ベースのモデルの Ames 変異原性予測への応用可能性を検討した。

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、リードアクロスを低毒性が予測される物質群へ拡大適用することを検討した。作成した低毒性カテゴリーをトキシコキネティクス (TK) の性質に基づいて正当化した。本アプローチは他の物質への適用は十分可能であり、さらなる事例を積み重ねることにより、行政リスク評価への実装が期待される。

生殖発生毒性予測系構築では、ECHA REACH 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、可能性の高い AOP としてミトコンドリア毒性による生殖毒性の AOP の作成を試みた。さらにデータセットに含まれる精巣毒性についても AOP ネットワークによるスクリーニングを行うことでさらなる AOP の可能性を見いだした。

In vitro-in vivo 外挿 (IVIVE) 用の生理学的動力学 (PBK) モデル構築のための基盤整備では、エストロゲン受容体 (ER) アゴニスト等を対象にした *in vitro* アッセイの IVIVE で使用されている生理学的動態 (PBK) モデルの既存研究を調査、解析し、IVIVE を試行し、例数が少ないながら、OED から推測される子宮肥大試験の判定結果は子宮肥大試験のアゴニスト活性を予測できる可能性があることを確認した。

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、OECD (Q)SAR Assessment Framework (QAF) に基づいたモデル評価項目について検討した。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 への適用可能性が期待できる。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できた。

本研究の成果は、*in silico/in vitro* NAM のデータをリスク評価に統合させるための科学的に堅牢な方法の確立に資するものである。そして、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構築の基盤となるものである。

研究分担者

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

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

本間 正充

国立医薬品食品衛生研究所 所長

広瀬 明彦

一般財団法人化学物質評価研究機構
安全性評価技術研究所 技術顧問

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。

Ames変異原性予測(Ames/QSAR)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開発者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(第二回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクト)を先導し、QSAR予測精度の向上に貢献を果たす。更に、新規データの追加により高信頼

性のデータセットを開発しその考察を進めると共に、QSAR予測の向上に資する改良を推進し、情報共有する。今後の展開を見据えAmes/QSARモデルによる検証に加えて、深層学習ベースのモデルとして、Transformerモデルの開発と応用可能性の検討も行う。以上、Ames/QSARの結果を行政における判断基準として積極的に活用する統合的な遺伝毒性評価系開発の基盤を構築する。

反復投与毒性、生殖発生毒性については、リードアクロスの適用範囲の拡大を目指して、大規模毒性データベースの構築、カテゴリーの構築、有害性発現経路（AOP）の開発を行ってきた。そこで本研究では、機序に基づくリードアクロスの信頼性の向上へ向けて、NAMデータを活用した統合的アプローチの優位性を検証する。反復投与毒性では、化学物質の既知の代謝情報を収集し、種々の代謝予測モデルと類似物質の既知代謝情報を組み合わせて代謝予測の不確実性を減少させ、代謝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。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。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。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。

欧米において、化学物質の生理学的動態（PBK）モデルを用いて、*in vitro*アッセイの活性濃度を*in vivo*経口等価用量（OED）に変換する*in vitro-in vivo*外挿（IVIVE）が活発に行われている。しかし、PBKモデルに必要なパラメータの既報値は限られており、IVIVEの実用性を向上させるためには、*in vitro*試験や*in silico*法により得られ

るモデルパラメータを使用することが有効と考えられる。そこで、エストロゲン受容体（ER）アゴニスト等を対象にした*in vitro*アッセイのIVIVEで使用されているPBKモデルについて調査を行い、それらのモデルを再現し、精度等を評価する。この評価結果を基に、*in vitro*手法および*in silico*手法により決定したパラメータを用い、IVIVEに適用可能な汎用的なPBKモデルを構築する。また、PBKモデルに必要なかつ重要な吸収と消失に係るパラメータ値を得るため、*in vitro*試験を実施し、得られたパラメータ値等を基にIVIVEによりOEDを算出し、*in vivo*試験で報告されている影響量との比較を試行する。さらに、試行結果に基づき、ヒト健康リスク評価等への適用可能性について検討する。

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。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。

B. 研究方法

B.1. 遺伝毒性評価に資するAmes/QSARの深化（杉山・古濱・本間）

QSARによるAmes予測精度向上に必須となる高信頼性のデータセットを開発するため、i) Ames変異原性試験を実施した。ii)更に、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。iii)また、自然言語処理分野で使用されている深層学習モデルであるTransformerモデルのAmes変異原性予測への応用可能性の検証を委託研究で行った。

i) 発がん性が高く過去のAmes試験結果で陽性と陰性が混在するN-ニトロソアミン化合物に注目し、令和3年度の6物質、令和4年度の9物質に加え、さらに基礎情報を収集するため令和5年度は3物質のAmes試験を実施した。Ames試験は、OECDテストガイドライン471に準拠して、5菌株（TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA）、代謝活性化条件と非活性化条件による試験を実施した。試験では、最高用量を5 mg/plateとした用量設定試験の結果をもとに本試験を実施し、2回の試験実施で再現性の担保を図った。また、プレインキュベーションを37℃で20分実施し、代謝活性化条件では、10% Rat S9を使用した。得られた結果は更に市販のQSARモデル（CASE Ultra, Derek Nexus, TIMES）による評価を実施し、実試験結果との比較を行った。ii) 第二回プロジェクトは、11か国から21チームが参加することとなった。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、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部からは各チーム内でのBest modelを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モデルのパターンで統計量の評価を実施し、考察と総括を行った。iii) K. Hansen, J. Chem. Inf. Model., 49 (2009) 2077 から6512物質のAmes変異原性情報とSMILES構造を抽出した[以下Hansenデータと表記]。学習データ情報ならびに大規模化合物データベースZINC、及びPubChemを活用し、SMILESをTransformerモデルに入力し、適切な構造記述子を抽出する。構造記述子の生成に用いた入力情報、モデルの詳細、出力結果も適宜とりまとめた。得られた構造記述子から標準的な機械学習モデルXGBoostにより、Ames変異原性予測モデルを構築した。実験データと比較し、感度・特異度・陽性率などの指標を計算した。令和3,4,5年度の本研究分担課題で実施した18物質のAmes試験結果[以下in houseデータと表記]で外部検証を行った。

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

令和5年度は、反復投与毒性試験で病理所見が認められず、高いNOAEL値により化学物質審査規制法（化審法）のスクリーニング評価で有害性クラス“外”または“4”に分類される物質をNIHS反復投与毒性統合DBから抽出し、それらを“低毒性物質”とした。それらを化学構造、物性および代謝類似性の観点からグループ化してカテゴリーを構築し、低毒性に対する考察を行った。

さらに、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Cytocchrome P450 (P450)基質テンプレートモデルの汎用化を目指し、CYP3A4を対象に各々の基質のテンプレートへの当てはめを実施し、そのプロトコルの確認と精緻化を行った。

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5年度は、昨年度の調査で新たなAOPの有力候補のひとつとなったミトコンドリア毒性についてAOPの可能性調査を行うと共に、生殖発生毒性試験データの精巣毒性研究の化合物情報についてAOPネットワークによるスクリーニングを実施した。

B.4. IVIVE用のPBKモデル構築のための基盤整備（松本）

令和5年度は、マウスPBKモデルの汎用性向上のために、ラットとヒトにも適用可能なモデルを構築した。また、Caco-2細胞を用いた細胞膜透過性試験およびS9画分を用いたin vitro代謝安定性試験も引き続き実施し、令和4年度に検討できなかった物質についてCaco-2膜透過係数（Papp）とS9蛋白質ベースのin vitroクリアランスの値を

得た。さらに、4-alpha-Cumylphenol (4-CP)、4-Hydroxybiphenyl (4-HB)、2-Cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester (CE2)、1,1,1-tris(4-hydroxyphenyl)-ethane (THE) の4物質について、*in vitro*代謝安定性試験や既報値、*in silico*法で得たパラメータ値を用いてマウスPBKモデルで、血漿蛋白質非結合態のピーク濃度に基づく*in vitro*活性濃度のOEDへの換算係数を算出した。ERアゴニスト経路に関連する14の*in vitro*アッセイのACC (有意な影響が見られる最小濃度) およびAC₅₀ (50%影響濃度) 値をマウスのOEDに外挿し、可能な場合はマウスの子宮肥大試験結果と比較し、内分泌かく乱影響評価へのIVIVEの適用性を評価した。

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、適用領域の設定や外部検証を実施した。本モデルを用いて、2023年に公表されたOECDのQSAR Assessment Frameworkに関するガイダンスを基に、(Q)SARモデル評価項目について検討した。

C. 研究結果

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

i) 令和5年度は、N-Nitrosfenfluramine、N-

Nitrosodimethylamine (以下NDMAと表記)、N-Nitrosodiethylamine (以下NDEAと表記) のAmes試験を実施した。溶媒はN-NitrosfenfluramineとNMEAはDMSOとし、NDMAのみ水とDMSOの両方に溶解したため、溶媒の種類の違いによる検証を行った。結果は、N-NitrosfenfluramineはWP2uvrA + S9で陽性であった。NDEAはTA1535 + S9、WP2uvrA + S9で陽性、TA100 + S9は陽性ではないが用量依存性があった。一方、NDMAは水、DMSO溶媒共に陰性であった。しかしながら、NDMAにおいてはTA100 + S9については用量依存的なコロニー数の増大が観測された。QSARの予測結果はCASE Ultra、Derek Nexus、TIMESいずれも陽性であった。なお、NDMAとNDEAについては最近実施されたOECDテストガイドライン471に準拠した試験結果報告 (F. Bringezu, and S. Simon, Toxicology Reports 9 (2022), pp. 250-255) との比較も行った。我々の試験との相違点としては、プレインキュベーション時間が37℃、60分と3倍長いこと、NDMAは水、NDEAは水とDMSOで試験がされていること、プレート法試験がなされていること等が挙げられる。Bringezuらの結果では、NDMA、NDEAともにTA100、TA1535、WP2uvrA (いずれも+S9) で陽性であり、プレート法の感度が低く、NDEAでの溶媒依存性は顕著ではないという結果であり、我々のAmes試験結果と異なる部分があった。ii) 第二回プロジェクト参加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。その全体結果は、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) が低い傾向であったうえ、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。陰性と陽性の試験データの比率が85 : 15と偏りがあることが、感度が低い要因の一つではあるが、全モデルの平均値は

50%を下回った。各チームが選択したBest modelについては、第一回と第二回のプロジェクト両方に参加したチームで精度の向上が比較的良好な傾向があった。iii) 最初の検討として、これまでに構築されたZINCデータ学習済みのTransformerモデル(以下、ZINCモデルと表記)を用い、Hansenデータの化合物の数値化に取り組んだ。その結果、翻訳精度(SMILESを符号化して記述子を得た後に元のSMILESへと復号化する際の精度、モデルによるSMILES表記の理解度の指標、[0, 100])は25.5%であり、著しく低下した。同指標はPubChemデータ学習済みモデル(以下PubChemモデルと表記)でも同様に低く、30.6%であった。一方、ZINCとPubChemでは、一般にケミカルスペースが広いとされる後者の翻訳精度が高かったことから、それぞれのTransformerモデルが受容可能なSMILES表記の違いに起因していることが示唆された。

そこで翻訳精度が低いこれらのモデルを用いてHansenデータの記述子を生成し、当該記述子を入力としたXGBoostによるAmes変異原性情報の予測を行った。結果は、変異原性陽性・陰性の精度(分類精度)はZINCモデル、及びPubChemモデル由来の記述子を使った分類モデル(以下、ZINC-XGBoostモデル、及びPubChem-XGBoostモデルと表記)で84.5%、及び83.9%を示した。ZINC-XGBoost、及びPubChem-XGBoostモデルを用い18物質のin-houseデータでAmes変異原性情報の予測の外部検証を行った結果、分類精度はそれぞれ61.1%、及び55.6%であった。実際判定がモデル間で異なった化合物は1つのみであった。in-houseデータのうち、Hansenデータと重複する化合物で、かつ陽性・陰性のラベルが食い違う化合物について特に誤っていた。

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)

NIHS反復投与毒性統合DB(1518物質、1908試

験)から、189の低毒性物質の化学構造を抽出した。それらをPubChem等に登録されているADME情報と関連付けることにより、化学構造とADMEの類似性の観点から10個のカテゴリーを作成した。

続いて、関連する既存データの量および新規性の観点からベンゼンスルホン酸類カテゴリーを優先的に選択して、その妥当性を評価した。ADMET Predictor、OECD QSAR Toolbox、CompTox Chemicals Dashboardを用いてトキシコダイナミクス(TD)およびトキシコキネティクス(TK)に関する*in silico/in vitro*プロファイリングを行った結果、極性の大きいスルホ基の作用により体内に吸収され、代謝はあまり受けず速やかに排泄されること、化学反応性や生物活性は総じて高くないことから、反復経口投与では低毒性となると考えられた。定義された構造領域とTKパラメータ領域に基づき、ベンゼンスルホン酸類の未試験の2物質の28日間反復投与毒性を、*in silico/in vitro*プロファイルの類似性に基づきカテゴリー化し、最も類似する試験済み物質のデータを用いてリードアクロスにより予測するケーススタディを行った。

反応部位の予測精度が極めて高い(≥99%)とされるYamazoeの基質テンプレートシステムに基づくヒトCYP代謝モデルの汎用性向上については、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。CYP3A4を対象に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11物質を選択した。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、基質になる配置とならない配置を検討し、予測の再現性を確認した。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った。

C.3. AOP に基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究 (広瀬)

R4年度の調査で新たなAOPの有力候補のひとつとなったミトコンドリア機能障害による受精、胚の生存率、着床および胚胎児発生を含む複数の生殖発生過程と関連する情報を精査したところ、酸化的リン酸化脱共役やATP産生への影響が妊娠げっ歯類に投与すると卵成熟異常、胎仔体重減少および同腹仔数減少を引き起こすという情報を整理することによりAOPの構築を行った。その結果、雄性生殖毒性、雌性生殖毒性および胚胎児毒性につながるミトコンドリア機能障害に関係する6つのMIEを含むAOPネットワークの可能性が示された。また、データセットに含まれていた精巢毒性陽性の126物質に関して、AOPネットワークによるスクリーニングを行ったところ22の物質でAOPネットワーク内の14のMIEと2のKEに関連しており、DART AOPネットワーク内の8つのAOPに含まれていることが示された。類似構造に基づくスクリーニングでは、さらなる化合物の追加が可能であることも示された。

C.4. IVIVE用のPBKモデル構築のための基盤整備 (松本)

令和5年度は、追加試験が必要な物質のリスクベースの優先順位付けのためのOED算出を主な目的とした「Nontargeted IVIVE」での使用が想定される米国NTPのIntegrated Chemical Environment (ICE) (<https://ice.ntp.niehs.nih.gov/>)の「PBPK」ツールと特定の有害影響を生じる同じAOPのMolecular initiating event (MIE) やKey event (KE) に対応した*in vitro*アッセイからOEDを定量的に予測するための「Targeted IVIVE」での使用が想定されるWageningen University and ResearchのWebツールボックス「PBK workflow」(www.qivivetools.wur.nl)を解析した結果を基に、基本構造がマウスモデルと同じラットとヒトの

PBKモデルを構築し、マウスとラットのモデルを統合し、PBKモデルの汎用性向上を図った。構築したラットモデルは、2レベルで単回経口投与されたイソプロピルアルコールのラット血中濃度の時間変化の計算値と既報の測定濃度の比較により検証した。また、ヒトモデルも、単回投与されたアセトアミノフェンとイルベサルタンのヒト血中濃度の時間変化の計算値と既報の測定濃度の比較により検証した。以上により、同一の基本構造のPBKモデルで、ヒト、ラット、マウスのトキシコキネティクス (TK) の推定が可能になった。

細胞膜透過性試験については D、4-HB、PP 及び THE の 4 物質についてデータが得られたが、既知指標物質と本研究で得られた Papp を比較したところ良好な結果が得られなかったため、試験系の信頼性評価において、結果の使用は限定的にせざるを得ないと判断した。一方、肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験では 5 物質 (4-HB, PP, CE2, Nor, THE) についてそれぞれの ke および CLint を算出することが出来た。

OED を算出する 4-CP、4-HB、CE2 および THE の 4 物質の各組織の対血液分配係数の推定値には最大でも 1.8 倍の差異しかなく、fub も最小の物質と最大の物質で 3.3 倍の差異であったが、Papp から算出した消化管からの吸収の 1 次速度定数および S9 蛋白質でのクリアランス測定値から計算した肝クリアランスには最小と最大で 12 倍の差異があった。これらのパラメータの変動に伴い PBK モデルで算出された血漿蛋白質非結合態のピーク濃度に基づく *in vitro* 活性濃度の OED への換算係数には最小と最大で 97 倍の差異があった。これらの換算係数を基に ER アゴニスト経路に関連する 14 の *in vitro* アッセイの ACC から外挿された 4 物質の OED の算術平均は、4-CP で 125 mg/kg/day (有効アッセイ数: 14)、4-HB で 276 mg/kg/day (有効アッセイ数: 13)、CE2 で 80800 mg/kg/day (有効アッセイ数: 1)、

そして THE で 311 mg/kg/day (有効アッセイ数: 13) であった。また、AC₅₀からの OED の算術平均は、4-CP で 484 mg/kg/day (有効アッセイ数: 14)、4-HB で 677 mg/kg/day (有効アッセイ数: 13)、CE2 で 41300 mg/kg/day (有効アッセイ数: 1)、そして THE で 981 mg/kg/day (有効アッセイ数: 13) であった。

子宮肥大試験のエストロゲン様作用陽性物質 (4-CP, THE) および 陰性物質 (CE2) の OED と子宮肥大試験の NOAEL は概ね一致していた。しかし、経口投与で陰性・皮下投与で陽性物質である 4-HB については、OED が陽性判定に相当する数値を示した。

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

これまでに我々が開発した皮膚感作性の強度指標 (LLNA EC3 値) の予測モデルを基に、Defined Approach のガイドライン (No.497) において検討された化学物質の試験情報を使用してモデルの改良を行った。LLNA EC3 値情報が得られた 154 物質を用いて、XGBoost 1.7.3 (python 3.8.13) による回帰モデルを構築し、層化5分割交差検証による内部検証を実施した。モデルの適用領域判定は、説明変数を使用したk近傍法からデータ密度の高い領域を設定する方法と、皮膚感作性に関する in vitro 試験法 (DPRA, KeratinoSensTM, h-CLAT) の実験結果を用いて設定する方法を組み合わせた。Hoffmann (2022) の 72 物質を用いて外部検証も実施した。内部検証では決定係数R²値が0.67であった。また、GHS 区分による3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、適用領域内物質における一致率は0.79だった。外部検証の適用領域内物質におけるGHS区分の一致率は0.50であった。本モデルはOECDのQSAR Assessment Frameworkに関するガイダンスを基に、in silico予測モデル評

価について報告書式 (QSAR model reporting format) に従って検討した。

D. 考察

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

i) Ames変異原性試験結果の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ある物質が挙げられる。また発がん性の高い物質に対する情報の拡充も重要である。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。令和5年度は典型的なN-ニトロソアミン類であるNDMA、NDEAを含む3物質のN-ニトロソアミンのAmes試験を実施した。我々の結果では、NDMAの溶媒依存性はありうる傾向があり、DMSOよりも水で用量依存性があった。NDMAやNDEAは一般にS9代謝活性化条件で陽性であることが知られているが、過去に様々な条件で試験が実施され菌株や条件によって結果が異なる報告がある。また、これまでの試験結果は試験条件が一定でなく (OECDテストガイドライン準拠の5菌株の試験ではない、試験の最高用量が原則5 mg/plateではなく、333 µg/plateや10,000 µg/plate等の試験等)、こちらも結果に影響を及ぼすと考えられる。今回OECDテストガイドライン471に準拠した試験を実施したうえで、最近の報告であるBringezuらの結果と比較検討した。プレインキュベーション時間は、我々は20分だが、Bringezuらは60分であった。いずれの時間もOECDテストガイドライン471に準拠しているが、プレインキュベーション時間20分では活性化には短い可能性があった。更に、我々も引用文献も10% Rat S9で実施したが、10% Rat S9の代謝活性化では検証は不十分な可能性があり、近年海外の規制の場で採用されつつあるEnhanced Ames Test (EAT) Conditions for N-

nitrosaminesを適用する検証も必要な道の一つと考えられる。

ii) 第二回プロジェクトでは、第一回プロジェクトに参加したチームのほうがBest modelsの予測能も高まる傾向がみられた。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。試験結果の陽性の比率の低さもあるが新規物質の感度の低さが課題であることや、経験値が高いモデルで精度が高くなる傾向がみられることは、Ames/QSARを行政の場で活用する際の基本情報として役立つと見込まれる。以上、モデル開発者のボトムアップにつながるプロジェクトを完結させた。

プロジェクトとAmes試験結果の評価により得られた成果は、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として期待できる。

iii)今回用いたTransformerモデルは、低い翻訳精度が示すようにHansenデータ内の化合物構造の全長を認識できていないことが確認された。その原因としては、化学言語モデルである今回用いたTransformerモデルが、Hansenデータに固有のSMILES表記のスタイルを把握できていない可能性が挙げられる。このようなSMILES表記の方言とも呼べるデータセットごとの揺らぎを研究し解決することは、適切な化合物構造情報の抽出につながり、Ames変異原性予測モデルの発展に資すると期待される。

In-houseデータを用いた評価では、Hansenデータと重複する化合物が概ねHansenデータと同じラベルを示したことから、Hansenデータを過学習していると推察される。一方Ames変異原性試験の結果には揺らぎが存在する。機械学習による予測モデルは、学習データセットに依存するため、各研究機関での統一された条件でのデータについての外部検証をすることで、予測モデルの汎化性能評価が可能になると期待される。ラベルが揺らぐ場合、どちらを真と判断するかは

極めて困難ではあるが、モデルがどの構造に基づいて判断しているかを把握することで、引き続き専門家による判断に資する知見を得ることが可能になると期待される。今回用いているTransformerモデルはアテンション機構を有しており、これを可視化する方法論を実装することで、化合物構造中のどの部位に基づいてAmes変異原性を判断しているか把握可能になると期待される。

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

本年度は、リードアクロスを低毒性物質の予測に適用することを検討した。低毒性カテゴリーの信頼性の担保のためには、“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必要である。

しかし、化学物質の体内動態や代謝に関する実測データは限られている。特に低毒性の物質は、毒性が強い物質より既存データは少ない。したがって体内動態や代謝物構造を予測するin silicoモデルの活用が期待される。

ベンゼンスルホン酸類および比較対象としたスルホ基を有しないベンゼン誘導体類いずれも生体高分子との化学反応性および生物活性のin silico/in vitroプロファイルに顕著な差は認められなかった。したがって、ベンゼンスルホン酸類の低毒性を説明する要因として、TDよりむしろTKの性質の寄与が示唆された。

TKに関するパラメータでは、logP、Peff、Vd、Clint、予測代謝物数について両グループの間に明確な差が認められた。これらのパラメータ値を用いる時に留意すべき点として、モデルの適用範囲と全体的な予測精度に関する不確実性を評価しておくことが挙げられる。それを実施するために必要な情報が利用できない場合には、予測モデルが限られた実測データを再現できるか、すなわち局所的な予測精度の評価を実施す

ることが求められる。独立した異なるモデルから同一構造に対する一貫した（一致する）予測結果が得られ、それを統合して最終結果が生成される場合、個々の予測の不確実性を低減することができると考えられる。

事例研究として、ベンゼンスルホン酸類2物質を評価対象物質とし、化審法スクリーニング評価を想定した反復投与毒性の予測と有害性クラス分類を行った。評価対象の2物質はいずれも同カテゴリーの適用範囲内にあった。TKパラメータの推計値に不確実性はあるが、評価対象物質と極めて類似の試験済み物質が同定されたことから、リードアクロス全体の不確実性は大きくないと考えられた。したがって、この毒性予測結果は化審法スクリーニング評価の文脈で受け入れられる可能性は十分にあると考えられる。

CYP代謝予測モデルは、*in vitro*試験で検出が難しい代謝物を含めて、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。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を構築する検討が必要であると考えられる。

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5年度はミトコンドリア毒性による生殖

発生毒性の酸化的リン酸化脱共役などに基づくAOPネットワークの可能性が示された。しかし、ミトコンドリアの機能は多様であり、複数の生物学的過程に関与していることからミトコンドリア機能障害がは、化合物が持つ他のストレス要因によって発生毒性を誘発される可能性もありえることは考慮しておく必要がある。一方、データセットに含まれていた精巣毒性陽性物質に対してのAOPネットワークのスクリーニングにおいては、22の精巣毒性陽性化合物と関連するAOPが8つ特定された。さらにAOPネットワークにリンクされたDerek Nexusアラートを調べた結果には、「雄性生殖毒性につながるグルタチオン減少」というAOPも含まれており、先行研究で開発してきたDART AOPネットワークの性能が改善されていることも確認できた。

D.4. IVIVE用のPBKモデル構築のための基盤整備（松本）

化学物質に特異的なパラメータとして、log Kow、Papp、*in vitro*クリアランス（肝細胞、ミクロソーム蛋白質またはS9蛋白質ベース）およびfubの4つのみを使用する汎用的なPBKモデルを構築し、ERアゴニストを対象とした*in vitro*アッセイでの活性濃度をマウスのOEDに外挿した。得られたOEDとマウスの子宮肥大試験の結果と比較した。その結果、汎用的なPBKモデルを使用して短期曝露により生じ得る特定の有害影響のAOPのMIEやKEに関連した*in vitro*アッセイからOEDを導出可能なことが示された。しかし、経口投与で陰性・皮下投与で陽性物質である4-HBについてOEDが陽性判定に相当する数値を示していたことから、経口経路における毒性を予測するために、更に検討すべき観点があることが示された。

IVIVEに使用する汎用的なPBKモデルに関する問題点としては、物質に特異的なパラメータであるPapp、*in vitro*クリアランスおよびfubの測定

は、いわゆるロースループレットであり、パラメータ値を得るには時間が掛かることが挙げられる。今後、これらのパラメータの測定法のハイスループレットアッセイ化の検討とともに、信頼できる*in silico*の推定法の開発が望まれる。

また、IVIVEを検討する*in vitro*アッセイとしては、ERアゴニストを対象としたアッセイを検討したが、米国NTPのICEでは、急性致死、がん、心毒性および生殖・発生毒性の作用機序と関連付けられた*in vitro*アッセイについても結果が公開されている。今後は、IVIVEの対象をこれらの作用機序と関連付けられた*in vitro*アッセイに拡大し、IVIVEアプローチの適用性拡大を検討していく必要もあると思われる。

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、構築した*in silico*モデルについて、OECDのQSAR Assessment Frameworkに関するガイダンスを基に、モデル報告書式（QSAR model reporting format）の項目を検討し課題を整理した。使用するデータの信頼性やモデルの透明性は概ね問題ないが、適用領域、外部検証の妥当性評価については、規制評価における*in silico*モデルの活用においてさらなる検討が必要だと考えられる。

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作成した生殖発生毒性のデータベースを、OECD 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、新しい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た。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”及び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。本OECDガイダンスは、2023年8月に公開さ

れた。

さらに、本ガイダンスに基づくAmes QSAR予測結果の信頼性評価のケーススタディを当該プロジェクトに提供し、OECDのQSAR関連のホームページから共有された(<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>)。これらを踏まえて、その最新動向を本研究事業の成果へ取り込んだ。“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を整理した。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試行的に反映させた。

2023年のOECD QSAR Toolbox Management Group会議は、QSAR Toolboxの開発とQSARの規制利用活動の議論の2部構成となった。研究代表者は、後者において毒性データベース、統合的アプローチを支えるNAM、QSAR開発、新しいAOP等の本研究班のこれまでの成果を発表した。規制安全性評価の現場が抱える諸課題の解決に資する実際的な取り組みに対して評価を得て議論を活性化させたとともに、同会議参加者からはこれらの成果をQSAR Toolbox等へ共有することに期待が寄せられた。

F. 結論

Ames/QSARの深化を目指し、発がん性の懸念が高く、試験条件や文献によってAmes試験結果が異なるN-ニトロソアミン化合物のAmes試験を継続的に実施し、試験結果とQSARの結果を比較し考察を進め、*in silico*でのAmes変異原性評価に

資する知見を得た。特に令和5年度は、得られた結果から試験条件の相違についての考察を深めた。さらに、第二回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトを総括して成果を公表し、Ames/QSARの社会実装に有益となる情報の公開を果たした。深層学習モデルであるTransformerモデルは、Ames変異原性予測に資すると期待される。

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、リードアクロスを低毒性が予測される物質群へ拡大適用することを検討した。作成した低毒性カテゴリーをTKの性質に基づいて正当化した。本アプローチは他の物質への適用は十分可能であり、さらなる事例を積み重ねることにより、行政リスク評価への実装が期待される。

生殖発生毒性予測系構築では、ECHA REACH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、可能性の高いAOPとしてミトコンドリア毒性による生殖毒性のAOPの作成を試みた。さらにデータセットに含まれる精巣毒性についてもAOPネットワークによるスクリーニングを行うことでさらなるAOPの可能性を見いだした。

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、適切に化学物質の体内動態を再現することを確認した。さらに、PBKモデルによる逆用量推定に基づくIVIVEにより、4物質についてマウスの子宮肥大試験の結果予測を行う事が出来た。1物質については、予測と実験結果に乖離があり、課題が確認されたが、ヒト健康リスク評価で活用されるであろうOEDを定量的に示すことが出来たことに一定の意義があると考えられる。

機械学習による皮膚感作性の予測モデル構築については、感作性強度を予測する回帰モデルを精緻化し、適用領域設定や外部検証を実施し

た。本モデルについて、OECD QSAR Assessment Framework ガイダンスに基づいた(Q)SARモデル評価項目について検討し、適用領域や外部検証の妥当性評価における課題が明らかになった。

以上、本研究では、化学物質の規制安全性評価に関連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、予測モデルの開発・評価、代謝やAOPに基づく毒性予測のケーススタディの実践による予測結果の信頼性評価などに取り組んで着実にその目標を達成すると共に、新しい知見を幅広く蓄積した。

ヒト健康に係るリスク評価プロセスは、多くは実験動物の*in vivo*試験データに依存してきた。一方、海外リスク評価機関や規制当局は、新しい動物試験要求を最小限に抑え、NAM活用を促進するロードマップをこの2, 3年に相次いで公表した。これらの戦略に基づき、NAMの開発と活用の研究が今後活発に促進されると予想される。

本研究の成果は、*in silico/in vitro* NAMのデータをリスク評価にうまく統合するための科学的に堅牢な方法の確立に資する先駆的な成果であると位置づけられる。そして、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. Furuhama A, Kitazawa A, Yao J, Matos dos Santos CE, Rathman J, Yang C, Ribeiro JV, Cross K, Myatt G, Raitano G, Benfenati E, Jeliaskova N, Saiakhov R, Chakravarti SK, Foster RS, Bossa C, Battistelli CL, Benigni R, Sawada T, Wasada H, Hashimoto T, Wu M, Barzilay R, Daga PR, Clark RD, Mestres J, Montero A, Gregori-Puigjané E, Petkov P, Ivanova H, Mekenyan O, Matthews S, Guan D,

Spicer J, Lui R, Uesawa Y, Kurosaki K, Matsuzaka Y, Sasaki S, Cronin M, Belfield SJ, Firman JW, Spînu N, Qiu M, Keca JM, Gini G, Li T, Tong W, Hong H, Liu Z, Igarashi Y, Yamada H, Sugiyama K, Honma M. Evaluation of QSAR models for predicting mutagenicity: outcome of the Second Ames/QSAR international challenge project. SAR QSAR Environ. Res. 2023;34:983-1001.

2. Furuhama A, Kasamatsu T, Sugiyama K, Honma M. Curation of more than 10,000 Ames Test Data Used in the Ames/QSAR International Challenge Projects. In “QSAR in Safety Evaluation and Risk Assessment” “QSAR in Safety Evaluation and Risk Assessment” edited by Dr. Huixiao Hong. (Elsevier) Academic Press. 2023. p 365-372. DOI: 10.1016/B978-0-443-15339-6.00022-9
3. 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.
4. 山田隆志, 丸山 (薦田) 多恵子. 化学物質のヒト健康影響評価に資するリードアクロス - 行政リスク評価への適用を目指して - (CICSJ Bulletin 2023, Vo.41, No.1, 6-10.

5. Myden A, Stalford SA, Fowkes A, White E, Hirose A, Yamada T. Enhancing developmental and reproductive toxicity knowledge: A new AOP stemming from glutathione depletion. *Curr Res Toxicol*. 2023 Sep 15;5:100124.
6. Yamazoe Y, Murayama N, Kawamura T, Yamada T. Application of fused-grid-based CYP-Template systems for genotoxic substances to understand the metabolisms. *Genes Environ*. 2023 Aug 7;45(1):22.
7. 山田隆志. Next Generation Risk Assessment の現状と行政利用へ向けた課題 (動物実験代替法と New Approach Methods の開発・利用動向. 監修: 小島肇夫. 発行日: 2023.9.29, シーエムシー出版)
8. Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Shigeta Y, Iso T, Umamo T, Hirose A. Derivation of subacute guidance values for chemical contaminants of drinking water quality standard in Japan. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2023 Jun;141:105401. doi: 10.1016/j.yrtph.2023.105401.
9. Murata Y, Natsume M, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M. *In vivo* mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes Environ*. 2023 Apr 11;45(1):12. doi: 10.1186/s41021-023-00270-9.
10. Hirose N, Umamo T, Murata Y, Iso T, Hasegawa S, Inoue K, Yamada T, Masumura K, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (IX). *Bull. Natl Inst. Health Sci*. 2023, 141, 61-68
11. Murata Y, Suzuki K, Shigeta Y, Iso T, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama K, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M. *In vivo* mutagenicity assessment of orally treated tert-butyl hydroperoxide in the liver and glandular stomach of MutaMouse. *Genes Environ.*, 2023, 45(1), 29.
12. 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.
13. 安部賀央里. 皮膚感作性強度の予測に向けた機械学習による *in silico* アプローチ. *フレグランスジャーナル*, 7, 16-20, 2023
14. 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.
15. 安部賀央里. 【第V編 化粧品業界】第4章 皮膚感作性 *in silico* 予測モデル (動物実験代替法と New Approach Methods の開発・利用動向. 監修: 小島肇夫. 発行日: 2023.9.29, シーエムシー出版)

2. 学会発表

1. Furuhama A, Maruyama T, Yamada T, Sugiyama K, Honma M: Evaluating Ames mutagenicity predictions for 1,3,5-tris(2,3-dibromopropyl)-1,3,5-triazinane-2,4,6-trione under the OECD QSAR Assessment Framework. The 20th

- International Workshop on (Q)SAR in Environmental and Health Sciences (June 7 2023, Copenhagen, Denmark)
2. 古濱彩子、杉山圭一、本間正充: ニトロソアミンに関する情報提供 -NDMAとNDEAのAmes試験概要-. 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会 ICH M7/QSAR ワークショップ (2023.10.27・東京) 招待講演
 3. 古濱彩子、丸山 (薦田) 多恵子、山田隆志、杉山圭一、本間正充: OECD QSAR評価フレームワーク(QAF)の概要とケーススタディ. 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会 (2023.11.12・福岡) ポスター
 4. 山田隆志: 化学物質の規制安全性評価の国際動向: OECD (Q)SAR評価フレームワーク(QAF)の概要. 日本薬学会第144年会 (2024.3.30, 横浜)
 5. Rathman J, Yamada T, Yang C, Mostrag A, Hobocienski B, Ribeiro V, Barber C.: Computational decision workflows evaluation following the new OECD QSAR Assessment Framework. Society of Toxicology 63rd Annual Meeting (2024.3.11, Salt Lake City, US).
 6. Yamada T, Tamehiro N, Teratani N: Case studies on refining risk assessment of food-related substances with New Approach Methods. (13th Global Summit on Regulatory Science (GSR23), Parma, 2023.9.27).
 7. Yamada T, Katsutani N, Hirose A, Hill E, Fowkes A, Stalford S, Myden A: An Adverse Outcome Pathway for histone deacetylase inhibition leading to axial skeletal defects: Development and potential to improve decision support in chemical safety assessment. (12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC12), Niagara Falls, August 30, 2023).
 8. 山田隆志: 次世代リスク評価の信頼性構築へ向けたNew Approach Methodologyの活用の課題. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.19)
 9. 山本 繁史, 明関 由里子, 吉田 喜久雄, 山田隆志: 生理学的薬物動力学 (PBK) モデリングを用いた環境化学物質のトキシコキネティクス予測のためのデータベースの構築. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
 10. 勝谷成男, 山田隆志, 広瀬明彦, Emma Hill, Adrian Fowkes, Susanne A. Stalford, Alun Myden: ヒストン脱アセチル化酵素阻害から発生毒性につながるAOPの開発. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
 11. 丸山 (薦田) 多恵子, 山添康, 齊藤亮子, 山田隆志: 試験データベース解析に基づく肝毒性関連情報の抽出—予測精度向上を目指して. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
 12. 山田隆志, 大畑秀雄, 古濱綾子, 杉山圭一, 本間正充, 瀬川勝智, 相崎健一, 広瀬明彦, 増村健一: 行政における化学物質リスク評価を支援するAIを用いた安全性予測プラットフォームの開発. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
 13. 広瀬明彦: ペル及びポリフルオロ化合物 (PFAS) の環境曝露によるリスク評価の現状と課題、第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)
 14. 広瀬明彦: ExtractablesとLeachablesの毒性評価の考え方、第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)
 15. 村田康允、重田善之、磯貴子、馬野高昭、広瀬望、長谷川彩由香、堀端克良、杉山圭一、広瀬明彦、増村健一、松本真理子: トランスジェニックマウスを用いたtert-ブチルヒドロペルオキシドの遺伝子突然変異試験、第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-

- 6.21, 横浜)
16. Iso T, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Shigeta Y, Hasegawa S, Horibata K, Mutsuga M, Sugiyama K, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M. ; Evaluation of the *in vivo* mutagenicity of azodicarbonamide、第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)
 17. Akahori Y., Ishida K., Ohno F., Hirose A.: Possibility for Liver Toxicity Evaluation by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using Key Event-Specific Gene Sets Applying Gene Expression Data Obtained in Rat Primary Hepatocytes, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)
 18. Hayashi T, Kotaki A, Fukushima A, Kawamura T, Katsutani N, Yamada T, Hirose A.: Development of modifying factor for exposure route extrapolation from oral TTC to parenteral TTC、EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)
 19. Murata Y, Matsumoto M, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Horibata K, Sugiyama K, Inoue K, Hirose A, Masumura K : *In vivo* mutagenicity assessment and derivation of oral and inhalation hazard assessment values of styrene、EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)
 20. Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Hirose A : Derivation of a target value of acrylic acid in drinking water、EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)
 21. Hirose A, Shigeta Y., Kawamura T., Inoue K., Matsumoto M : Comparison of BMDL calculation performance by the recently developed Bayesian BMD calculation tools using quantal datasets of animal toxicity studies、EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)
 22. 松本 真理子, 広瀬 望, 磯 貴子, 村田 康允, 重田 善之, 長谷川 彩由香, 馬野 高昭, 広瀬 明彦: Derivation of a target value of perfluorooctanesulfonic acid in drinking water. (第 50 回日本毒性学会学術年会、6 月) (2023.6)
 23. Linfeng Liu, Mayu Onishi, Yuka Yoshii, Kaori Ambe, Toshiaki Makino, Masahiro Tohkin: Efficacy and safety of new class disease-modifying anti-rheumatic drugs: Bayesian and frequentist network meta-analysis. 日本薬学会第 144 年会 (2024.3.28 - 3.31, 横浜)
 24. 安部 賀央里, 木下 啓, 山田 隆志, 足利 太可雄, 頭金 正博: 皮膚感作性評価における*in silico* 予測モデルの開発. 第10回CBI学会個別化医療研究会 (2024.2.27, 岐阜)
 25. 青木 優佳, 安部 賀央里, 頭金 正博, 村島 美穂, 濱野 高行, 和知野 千春, 木村 和哲, 日比 陽子, 近藤 勝弘: 電子カルテ情報と機械学習を活用したシスプラチン誘発性急性腎障害の予測モデルの構築. 第44回日本臨床薬理学会学術総会 (2023.12.14 - 12.16, 神戸)
 26. Linfeng Liu, Mayu Ohnishi, Yuka Yoshii, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Comparison of the efficacy and safety of various anti-rheumatic drugs for rheumatoid arthritis: Network Meta-Analysis. 第44回日本臨床薬理学会学術総会 (2023.12.14 - 12.16, 神戸)
 27. 徳永 朱莉, 安部 賀央里, 山田 隆志, 足利 太可雄, 頭金 正博: 過小評価の回避を指向した皮膚感作性強度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36回大会 (2023.11.27 - 11.29, 千葉)
 28. 青木 優佳, 安部 賀央里, 頭金 正博, 村島 美穂, 濱野 高行: 悪性腫瘍患者における化学療法中の低Na血症を予測する機械学習モデルの構築およびリスク因子の検討. 第33回日本医療

- 薬学会年会 (2023.11.3 - 11.5, 仙台)
29. 大西 真由, 劉 臨風, 吉井 優花, 安部 賀央里, 頭金 正博: ネットワークメタアナリシスによる新規抗リウマチ薬の有効性と安全性の比較検討. 第33回日本医療薬学会年会 (2023.11.3 - 11.5, 仙台)
 30. 木下啓, 安部 賀央里, 山田 隆志, 足利 太可雄, 頭金 正博: Establishment of *in silico* prediction model for skin sensitization aiming for practical application. CBI学会2024年大会 (2024.10.23 - 10.26, 東京)
 31. Tamana Enami, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Development of a model for predicting a chemical-induced CYP inhibitory activity using images data showing chemical structure information. 2023年ICCP450/JSSX国際合同大会 (2023.9.25 - 9.29, 静岡)
 32. 出来 佑都, 安部 賀央里, 頭金 正博, 和知野 千春, 木村 和哲, 日比 陽子, 近藤 勝弘, 村島 美穂, 濱野 高行: 電子カルテ情報と機械学習を用いたバンコマイシン誘発性急性腎障害の予測手法開発. 第9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 (2023.9.16, 東京)
 33. 濱上 敦史, 土井 更良, 安部 賀央里, 頭金 正博: 副作用報告データベースとトランスポーター阻害活性情報を用いた機械学習による胆汁うっ滞型薬物性肝障害の予測モデルの開発. 第69回日本薬学会東海支部大会 (2023.7.8, 名古屋)
 34. 足利 太可雄, 波多野 浩太, 岩佐 帆乃夏, 木下 啓, 中村 伸昭, 安部 賀央里, 頭金 正博: Next Generation Risk Assessment事例研究: ヘアカラー製剤に存在するバンドロフスキーベースの定量的皮膚感作性リスク評価. 第48回日本化粧品学会 (2023.6.23 - 6.24, 東京-Online Hybrid)
 35. 安部 賀央里: データベースと機械学習を活用した毒性予測へのアプローチ～有機化学から視野を広げて～ シンポジウム29 トキシコロジストのキャリア形成支援プログラム: デジタル時代の人材育成と教育. 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19 - 6.21, 横浜)
 36. 木下 啓, 安部 賀央里, 山田 隆志, 足利 太可雄, 頭金 正博: 機械学習を用いた皮膚感作性強度予測モデルの開発と実用化に向けた検討. 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19 - 6.21, 横浜)
 37. Linfeng Liu, Mayu Ohnishi, Yuka Yoshii, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Efficacy and Safety of Anti-rheumatic Drugs in Patients with Rheumatoid Arthritis: Bayesian Network Meta-Analysis. 第50回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19 - 6.21, 横浜)
 38. 大西 真由, 劉 臨風, 吉井 優花, 安部 賀央里, 頭金 正博: 新規抗リウマチ薬の有効性と安全性に関する研究ーネットワークメタ解析手法を用いた検討ー. 第7回日本臨床薬理学会東海北陸地方会 (2023.6.4, オンライン)
3. シンポジウム/講習会/Work Groupでの発表
1. Furuhama A, Maruyama-Komoda T, Yamada T, Sugiyama K, Honma M: Evaluating Ames mutagenicity predictions for 1,3,5-tris(2,3-dibromopropyl)-1,3,5-triazinane-2,4,6-trione under the OECD QSAR Assessment Framework. (OECD 20th Meeting of the QSAR Toolbox Management Group, Paris, 2023.11.17).
 2. Yamada T: Development and application of toxicity databases for improvement of *in silico* approaches for regulatory chemical safety assessment. (OECD 20th Meeting of the QSAR Toolbox Management Group, Boulogne, France, 2023.11.17).
 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 5 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 (2023.10.11, 東京-Online)

4. 山田隆志: *In silico* 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づくヒト健康リスク評価の効率化・迅速化を目指して. シンポジウム [リスク評価手法の現状と今後], 2023 年 日化協 LRI 研究報告会 (東京, 2023.8.25)

4. ガイダンス作成

1. (Q)SAR Assessment Framework: Guidance for the regulatory assessment of (Quantitative) Structure – Activity Relationship models, predictions, and results based on multiple predictions. OECD Series on Testing and Assessment. No. 386, [https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO\(2023\)32/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO(2023)32/en/pdf), (イタリア Istituto Superiore di Sanità (ISS) と欧州化学品庁 (ECHA) の共同リードのもと、OECD メンバー国の QSAR 専門家が本ガイダンス作成プロジェクトに参加。本研究班からは、山田隆志および古濱彩子が本ガイダンス作成に貢献)

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5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 所長
研究協力者 水野 忠快 東京大学大学院薬学系研究科 助教
研究協力者 菊池 陽介 東京大学大学院薬学系研究科 学部生

研究要旨

定量的構造活性相関（QSAR）を用いた Ames 変異原性予測（Ames/QSAR）の行政利用の拡大に向けて、発がん性の懸念が高く既存データにおいて陽性と陰性が混在する N-ニトロソアミン化合物の Ames 試験を継続的に実施し、既存の結果や QSAR 予測結果と比較しながら結果の整理および考察を行った。また、2020 年から実施している第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト成果を総括し、論文化を果たした。あわせて、Transformer モデルによる Ames 変異原性予測への応用可能性を検討した。学習に用いた公開データでは既報と同程度の性能を示した一方、外部検証データでは公開データのラベルに引っ張られる傾向にあった。

A. 研究目的

Ames 変異原性を定量的構造活性相関（QSAR）によって *in silico* 予測し遺伝毒性評価を実施する流れは、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や国内外の農薬のリスク評価等の分野において活用が進みつつある。化学物質の *in silico* による Ames 変異原性予測（Ames/QSAR）評価の活用を進めるためには高度化するなか、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、Ames/QSAR 深化が必要とされている。

本分担課題においては、これまで国際共

同研究（第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト、以下「第 2 回プロジェクト」と呼ぶ）によるモデルの向上、並びに、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とする。

更に、令和 5 年度においては、行政活用への検討が進められている統計ベースや知識ベースの Ames 変異原性予測 QSAR モデルによる検証に加え、深層学習ベースの QSAR モデルの利用可能性に関する検証も必要とされていることから、Transformer モデルの開発と応用可能性の検討も研究目的とする。

本研究を通じて、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ことを目指す。

B. 研究方法

B1. Ames 変異原性試験の実施

発がん性の懸念が高く既存データにおいて陽性と陰性が混在する N-ニトロソアミン 3 物質について令和 5 年度は Ames 試験を実施した。被験物質の名称・CAS 番号純度・用いた溶媒や構造は表 1 の通りである。Ames 試験は、OECD テストガイドライン 471 に準拠した 5 菌株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA)、代謝活性化条件と非活性化条件による試験を実施した。最高用量を 5 mg/plate とした用量設定試験の結果をもとに本試験を実施し、2 回の試験試験実施で再現性の担保を図った。また、プレインキュベーションを 37 度 20 分実施し、代謝活性化条件では 10% Rat S9 を使用した。試験溶媒は水を第一選択肢としたが、水に不溶な場合にはジメチルスルホキシド (DMSO) を使用する方針とした。N-Nitrosodimethylamine (NDMA) については水と共に DMSO 溶媒で試験を実施・比較検討したが、DMSO 溶媒では本試験のみの実施とした。陽性の判定条件は、基本的には陰性対照から 2 倍以上のコロニー数の増大が観られた場合と定義した。

また、知識ベース QSAR モデルの DEREK Nexus (ver. 6.2.1, Nexus 2.5.2, Lhasa Limited 社 (英国))、及び統計ベース QSAR モデル CASE Ultra (GT1_BMUT モジュール, ver. 1.9.0.2, MultiCASE 社 (米国)) を用いた QSAR 評価をおこなった。更にブルガス大学 数理化学研究所 LMC (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。

B2. 第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの総括

第 2 回プロジェクトでは、最終的に表 2 で示した 11 か国の 21 チームが参加することとなった。うち 9 チームが第 1 回プロジェクトにも参加したチームである。

第 1 回プロジェクトの評価対象物質に相当する物質に対して安衛法試験結果に基づき本研究分担課題を通じて精査し、12,134 物質を第 2 回プロジェクトにおける学習データとして提供した。なお、非公開の安衛法試験結果の詳細等については、令和 3 年度および令和 4 年度の本課題の分担報告書ならびに厚生労働行政推進調査事業費 (化学物質リスク研究事業)「インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質のヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発 (H30-化学-指定-005)」における平成 31 年度および令和 2 年度分担研究報告書「Ames/QSAR 予測性の向上と運用可能な Ames 変異原性予測のスキームの確立に関する研究」に記載されている。

第 2 回プロジェクトで予測対象とした 1589 物質のデータは、陽性 (A 判定 ; Ames 試験における比活性値が 1,000 rev/mg 以上であり、強い陽性と判定される物質が 80 物質、B 判定 ; Ames 試験における比活性値が 1,000 rev/mg 未満である陽性と判定される物質が 156 物質) 236 物質であり陰性 (C 判定) 1353 物質となり、第 1 回プロジェクト以降に収集した安衛法試験結果 (非公開) に相当した。

参加 21 チームは 12,134 物質の Ames 試験陰性・陽性と化学物質構造情報を学習データ情報として機密保持契約の元で提供を受け、各チーム独自のモデルで予測対象

である 1,589 物質 (Ames 試験結果がわからない物質) の化学物質構造情報から Ames 陽性陰性予測を行い、国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部に予測結果を送付し、同変異遺伝部で評価 (感度・特異度等の精度の検証) を行った。なお、参加チームは複数のモデルによる予測結果を提出可としていたが、同変異遺伝部からは各チーム内での Best model を選択するように依頼していた。参加チームのそれぞれの Best model と複数モデルを含む約 50 モデルのパターンで統計量の考察を行った。

B3. Transformer モデルの開発と検証

- ①文献[K. Hansen ら, J. Chem. Inf. Model., 49 (2009) 2077] から 6512 物質の Ames 変異原性情報と SMILES 構造を抽出した。本データセットを以下 Hansen データと呼称する。
- ② ①の学習データ情報ならびに大規模化合物データベース ZINC、及び PubChem を活用し、SMILES を Transformer モデルに入力(※1)し、適切な構造記述子を抽出する。構造記述子の生成に用いた入力情報、モデルの詳細、出力結果も適宜とりまとめた。
- ③得られた構造記述子から標準的な機械学習モデル XGBoost(※2)により、Ames 変異原性予測モデルを構築した。実験データと比較し、感度・特異度・陽性率などの指標を計算しとりまとめた。
- ④令和 3～5 年度の本研究分担課題で実施した 18 物質の Ames 試験結果[以下 in-house データと呼称する]で外部検証を行い、③と併せて予測結果を総括した。

※1. それぞれ以下の条件を満たす化合物を用いている: ZINC[・塩除去 (元データの時点)・H, C, N, O, F, S, P, Si, Cl, Br, I, B, Sn 以外の原子を含む化合物の除外 (元データの時点)・SMILES 表記の長さ 250 まで]、PubChem[・塩除去・水素からウランまでの化合物・SMILES

表記の長さ 250 まで]

※2. Tree 系の非線形な機械学習モデル。デフォルトパラメーターでのモデルの性能が比較的高く、様々な機械学習タスクで用いられている。

(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

C1. Ames 変異原性試験の実施

表 1 に示した通り、N-Nitrosufenfluramine と N-Nitrosodiethylamine (NDEA) は代謝活性化条件下において陽性であり、N-Nitrosodimethylamine (NDMA) は水溶媒、DMSO 溶媒の試験共に陰性であった。

NDEA と MDMA の Ames 試験結果のうち、代謝活性化条件下の結果について、陰性対照からの常用対数(log)比からのコロニー数の増大の比を図 1 に示した。NDEA は TA1535、WP2uvrA で陽性であり、TA100 は陽性ではないが用量依存性があった。NDMA は陰性だが、水溶媒では TA100 で用量依存的に増加する傾向がみられた。一方 NDMA の DMSO 溶媒では増加傾向はみられなかった (図 2)。

QSAR の予測結果表 1 に示す通り CASE Ultra、Derek Nexus、TIMES いずれもどの物質においても陽性予測であった。なお、NDMA と NDEA については最近実施された OECD テストガイドライン 471 に準拠した試験結果報告 (F. Bringezu, and S. Simon, *Salmonella typhimurium* TA100 and TA1535 and *E. coli* WP2 uvrA are highly sensitive to detect the mutagenicity of short Alkyl-N-Nitrosamines in the Bacterial Reverse Mutation Test, Toxicology Reports 9 (2022), pp. 250-255) との比較も行った。我々の試験との相違点

としては、プレインキュベーション時間が 37 度 60 分と 3 倍長いこと、NDMA は水、NDEA は水と DMSO で試験がされていること、プレート法試験がなされていること等が挙げられる。Bringezu らの結果では、NDMA、NDEA とともに TA100、TA1535、WP2*uvrA* (いずれも +S9) で陽性であり、プレート法の感度が低く、NDEA での溶媒依存性は顕著ではないという結果であり、我々の Ames 試験結果との相違がみられた。

C2. 第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの総括

第 2 回プロジェクト参加 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、表 3 の通りである。

第 2 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) が低い傾向であったうえ、第 2 回プロジェクトは前回第 1 回プロジェクトよりも参加チーム間でのモデルの感度、F1 Score (適合率 [モデル予測が陽性のうち実際に陽性だった物質の割合] と感度の調和平均) の差が顕著であった。陰性と陽性の試験データの比率が 85 : 15 と偏りがあることが、感度が低い要因の一つではあるが、全モデルの平均値は 50% をしたまわった。各チームが選択した Best model については、第 1 回と第 2 回のプロジェクト両方に参加したチームで比較的良好な結果であった。これらの結果をとりまとめ、2023 年 SAR QSAR Environ Res 誌に掲載された。

C3. Transformer モデルの開発と検証

本研究で用いたモデルの概念図と計算フローを記載した概要を作成し、別紙 1、及び 2 に記載した。

最初の検討として、これまでに水野グル

ープにて構築した ZINC データ学習済みの Transformer モデル (以下 ZINC モデルと記載) を用い、Hansen データの化合物の数値化に取り組んだ結果、翻訳精度 (SMILES を符号化して記述子を得た後に元の SMILES へと復号化する際の精度、モデルによる SMILES 表記の理解度の指標, [0, 100]) は 25.5% であり、著しく低くなった。同指標は PubChem データ学習済みモデル (以下 PubChem モデルと記載) でも同様に低く、30.6% であった。一方、ZINC と PubChem では、一般にケミカルスペースが広いとされる後者の翻訳精度が高かったことから、それぞれの Transformer モデルが受容可能な SMILES 表記の違いに起因していることが示唆された。

このように翻訳精度としては低いものの、これまでの水野グループの成果より、既存の多くの化合物関連のタスクは必ずしも化合物構造の全長の情報を必要とせず、部分的な構造情報でも精度が出ることが明らかとなっている (Nemoto S, Mizuno T, Kusuhara H. Investigation of chemical structure recognition by encoder-decoder models in learning progress. *J Cheminform.* 2023 Apr 12;15(1):45.). そこで翻訳精度が低いこれらのモデルを用いて Hansen データの記述子を生成し、当該記述子を入力とした XGBoost による Ames 変異原性情報の予測を行った結果、変異原性陽性・陰性の精度 (分類精度) は ZINC モデル、及び PubChem モデル由来の記述子を使った分類モデル (以下、ZINC-XGBoost モデル、及び PubChem-XGBoost モデルと称する) で 84.5%、及び 83.9% を示し、既存の Ames 試験に関する予測モデルと遜色ないことが明らかとなった (Huang K, Fu T, Gao W, Zhao Y, Roohani Y, Leskovec J, Coley CW, Xiao C, Sun J, Zitnik M. Artificial intelligence

foundation for therapeutic science. Nat Chem Biol. 2022 Oct;18(10):1033-1036).

ZINC-XGBoost, 及び PubChem-XGBoost モデルを用い、国立医薬品食品衛生研究所が提供する 18 物質の in-house データで Ames 変異原性情報の予測の外部検証を行った結果、分類精度はそれぞれ 61.1%, 及び 55.6%であった。なおパーセンテージとしては比較的大きな差に見えるが、実際判定がモデル間で異なった化合物は1つのみである。in-house データのうち、Hansen データと重複する化合物で、かつ陽性・陰性のラベルが食い違う化合物について特に誤っていた他、比較的陽性を返しやすいモデルとなった。

D. 考察

D1. Ames 変異原性試験の実施

QSAR の活用拡大の観点から、Ames 変異原性試験結果の精緻化が必要となる物質として、陽性の懸念は高いが陰性の実試験報告がなされている物質など判定の難しい物質が挙げられる。つまり、Ames/QSAR 予測が難しいアラート構造がある物質の精査が必要である。加えて、発がん性の高い物質に対する情報の拡充も重要となる。これらの物質に対し、Ames 試験を行い、情報を更新・拡充することは Ames/QSAR の改善に直接寄与する。この典型である N-ニトロソアミン化合物に注目して、これまで令和 3, 4 年度で合計 15 試験を実施したうえで QSAR の解析結果による考察を加え、既存の情報の更新に資する提案を行うべく学術論文投稿に向けて整理を行っている。さらに令和 5 年度は典型的な N-ニトロソアミン類である NDMA、NDEA を含む 3 物質の N-ニトロソアミンの Ames 試験を実施した。NDMA や NDEA は一般に S9 代謝活性化条件で陽性であることが知られて

いるが、過去に様々な条件で試験が実施され菌株や条件によって結果が異なる報告がある。例えば、TA1535 の Rat S9 では陰性だが、Hamster S9 では陽性であったり、30% Rat または Hamster S9 では TA100 と WP2uvrA/pKM101 陽性の報告がある。しかしながら、これまでの試験結果は試験条件が一定でなく (OECD テストガイドライン準拠の 5 菌株の試験ではない、試験の最高用量が原則 5mg/plate ではなく、333 µg/plate や 10000 µg/plate 等の試験等)、結果も陽性・陰性の両方が混在していた。そこで、今回 OECD テストガイドライン 471 に準拠した試験を実施したうえで、最近の報告である Bringezu らの結果と比較検討も行った。我々は 20 分だが、Bringezu らは 60 分のプレインキュベーション時間であった。いずれの時間も OECD テストガイドライン 471 に準拠しているが、プレインキュベーション時間 20 分では活性化には短い可能性があった。更に、我々も引用文献も 10% Rat S9 で実施したが、10% Rat S9 の代謝活性化では検証は不十分な可能性があり、近年海外の規制の場で採用されつつある Enhanced Ames Test (EAT) Conditions for N-nitrosamines を適用する検証も必要な道の一つと考えられる。EAT では試験菌株は TA98, TA100, TA1535, TA1537 と *E. coli* WP2uvrA (pKM101) を含むべきで、プレインキュベーションで時間は 30 分を推奨している。なお、EAT では S9 による代謝活性化では、ラット肝 30%S9 だけではなく、ハムスター肝 30%S9 の条件での実施が記載されている。S9 の種類や濃度も結果に影響していると考えられる。

D2. 第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの総括

第 2 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1回プロジェクトに参加したチームであった。また、第1回プロジェクトに参加したチームのほうが Best models の予測能も高まる傾向がみられた。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。試験結果の陽性の比率の低さもあるが新規物質の感度の低さが課題であることや、経験値が高いモデルで精度が高くなる傾向がみられることは、Ames/QSAR を行政の場で活用する際の基本情報として役立つと見込まれる。以上、モデル開発者のボトムアップにつながるプロジェクトを完結させた。

プロジェクトと Ames 試験結果の評価により得られた成果は、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として期待できる。

D3. Transformer モデルの開発と検証

Transformer モデルにより生成された記述子に基づく機械学習モデルは、既存の Ames 変異原性予測モデルと同程度の精度を示すことが明らかとなった。一方、今回用いた Transformer モデルは、低い翻訳精度が示すように Hansen データ内の化合物構造の全長を認識できていないことが確認された。その原因としては、化学言語モデルである今回用いた Transformer モデルが、Hansen データに固有の SMILES 表記のスタイルを把握できていない可能性が挙げられる。実際、これまでも、様々な化合物関連のデータセットが集約されている MoleculeNet (Wu Z, Ramsundar B, Feinberg EN, Gomes J, Geniesse C, Pappu AS, Leswing K, Pande V. MoleculeNet: a benchmark for molecular machine learning. *Chem Sci*. 2017 Oct 31;9(2):513-530.)を用い、様々な化合物

関連のタスクを評価した際、データセットごとに翻訳精度が異なる事例が存在した。このような SMILES 表記の方言とも呼べるデータセットごとの揺らぎを研究し解決することは、適切な化合物構造情報の抽出につながり、Ames 変異原性予測モデルの発展に資すると期待される。

In-house データを用いた汎化性能評価では、Hansen データと重複する化合物が概ね Hansen データと同じラベルを示したことから、Hansen データを過学習していると推察される。一方、in-house データと Hansen データのラベルに食い違いが存在するように、そもそも Ames 変異原性試験の結果には揺らぎが存在する。用いる S9 の由来など実験条件がラベルに揺らぎを与えている可能性がある。機械学習による予測モデルは、学習データセットに依存するため。各研究機関での統一された条件でのデータについての外部検証をすることで、予測モデルの汎化性能評価が可能になると期待される。ラベルが揺らぐ場合、どちらを真と判断するかは極めて困難ではあるが、モデルがどの構造に基づいて判断しているかを把握することで、引き続き専門家による判断に資する知見を得ることが可能になると期待される。今回用いている Transformer モデルはアテンション機構(トークンと呼ばれる単位の集合で表現可能なデータの学習に際し、どのトークンにどれだけ重みをつけるかを同時に学習するというアルゴリズム)を有しており、これを可視化する方法論を実装することで、化合物構造中のどの部位に基づいて Ames 変異原性を判断しているか把握可能になると期待される。

E. 結論

QSAR の利用拡大に資する情報の拡充を目的として、発がん性の懸念が高いが、試験条件や文献によって Ames 試験結果が異なる N-ニトロソアミン化合物の Ames 試験を継続的に実施した。得られた試験結果と QSAR 予測の結果を比較し考察を進め、今後の評価に資する知見が蓄積された。特に今年度試験を実施した NMDA と DEDA の試験結果と既存の知見等から試験条件の相違についての考察を深めた。

第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトを総括して成果を公表し、継続したプロジェクトの実施が Ames/QSAR の社会実装に有益となる情報の公開を果たした。

Transformer モデルによる記述子は、Ames 変異原性予測に資する知見が得られた。より精度を向上する方策として、SMILES 表記の方言への対処が今後の検討課題である。また Transformer モデルに特徴的なアテンション機構を用いることで結果の解釈性が大幅に向上し、特に変異原性のラベルがデータセット間で異なる際により総合的な解釈を可能にすると期待される。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Furuhama A, Kitazawa A, Yao J, Matos dos Santos CE, Rathman J, Yang C, Ribeiro JV, Cross K, Myatt G, Raitano G, Benfenati E, Jeliaskova N, Saiakhov R, Chakravarti SK, Foster RS, Bossa C, Battistelli CL, Benigni R, Sawada T, Wasada H, Hashimoto T, Wu M, Barzilay R, Daga PR, Clark RD, Mestres J, Montero A, Gregori-Puigjané E, Petkov P, Ivanova H, Mekenyan O, Matthews S, Guan D, Spicer J, Lui R, Uesawa Y, Kurosaki K, Matsuzaka Y, Sasaki S,

Cronin M, Belfield SJ, Firman JW, Spînu N, Qiu M, Keca JM, Gini G, Li T, Tong W, Hong H, Liu Z, Igarashi Y, Yamada H, Sugiyama K, Honma M. Evaluation of QSAR models for predicting mutagenicity: outcome of the Second Ames/QSAR international challenge project. SAR QSAR Environ. Res. 2023;34:983-1001.

2. Furuhama A, Kasamatsu T, Sugiyama K, Honma. Curation of more than 10,000 Ames Test Data Used in the Ames/QSAR International Challenge Projects. In “QSAR in Safety Evaluation and Risk Assessment” “QSAR in Safety Evaluation and Risk Assessment” edited by Dr. Huixiao Hong. (Elsevier) Academic Press. 2023. p 365-372. DOI: 10.1016/B978-0-443-15339-6.00022-9

F.2 学会発表

1. Furuhama A, Maruyama T, Yamada T, Sugiyama K, Honma M: Evaluating Ames mutagenicity predictions for 1,3,5-tris(2,3-dibromopropyl)-1,3,5-triazinane-2,4,6-trione under the OECD QSAR Assessment Framework, The 20th International Workshop on (Q)SAR in Environmental and Health Sciences (June 7 2023, Copenhagen, Denmark)
2. 古濱彩子、杉山圭一、本間正充: 「ニトロソアミンに関する情報提供 -NDMA と NDEA の Ames 試験概要-」日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会 ICH M7/QSAR ワークショップ (2023.10.27・東京) 招待講演、(2023.11.11・福岡) ポスター

3. 古濱彩子、丸山（薦田）多恵子、山田 隆志、杉山圭一、本間正充:「:OECD QSAR 評価フレームワーク(QAF)の概要とケーススタディ」日本環境変異原ゲノム学会第 52 回大会（2023.11.12・福岡）ポスター

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表1 Ames試験被験物質と試験条件・結果並びにQSARモデルによる予測結果

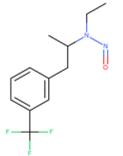
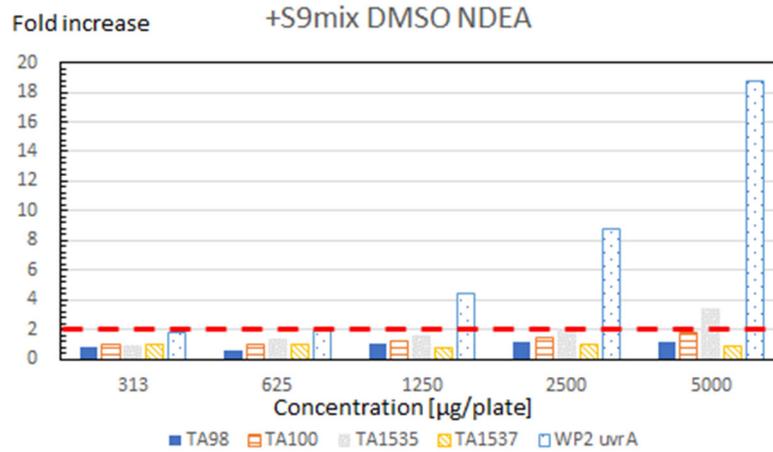
ID	Name	CAS RN	構造図	溶媒	Ames試験結果	陽性の菌株	最大比活性値	その用量	最大比活性値の菌株	CASE Ultra GT1_BMU T 1.9.0.2 (Prob%)	Derek Nexus 6.2.1 (Nexus 2.5.2)	TIMES Kinetic v03.03	TIMES non-Kinetic v18.18
1	N-Nitrosufenfluramine	19023-40-6		DMSO	陽性	WP2 uvrA + S9	256	78.1 μg/plate	WP2 uvrA + S9 (用量設定試験)	Positive (92.2)	PLAUSIBLE	in vitro Ames positive	in vitro Ames positive
2	N-Nitrosodimethylamine	62-75-9		水	陰性					Known Positive (99.2)	PROBABLE	in vitro Ames positive	in vitro Ames positive
				DMSO (本試験のみ)	陰性								
3	N-Nitrosodiethylamine	55-18-5		DMSO	陽性	WP2 uvrA TA1535 + S9	110	5000 μg/plate	WP2 uvrA + S9 (本試験)	Known Positive (99.2)	PROBABLE	in vitro Ames positive	in vitro Ames positive

表2 第2回プロジェクト参加チーム

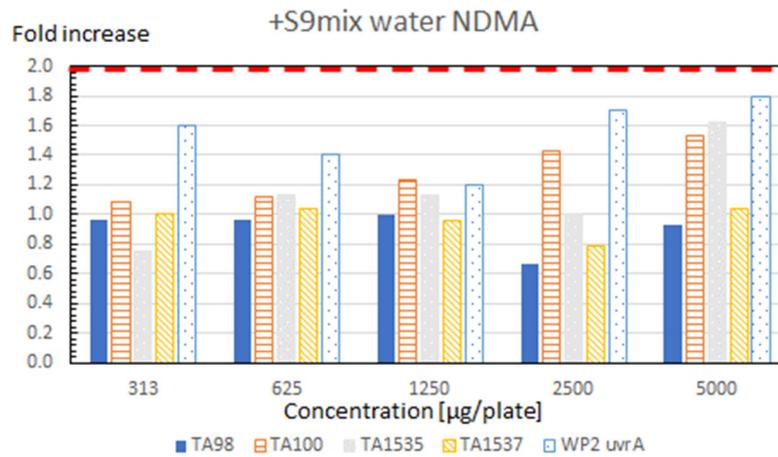
第1回プロジェクトにも参加した9チームを右側に示す

	チーム名	国	第1回プロジェクトに参加したか
1	Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences (SIOC, CAS)	中国	
2	Alttox Ltd.	ブラジル	
3	MN-AM	ドイツ/米国	Yes
4	Instem	米国	Yes
5	Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS (IRFMN)	イタリア	Yes
6	IdeaConsult Ltd.	ブルガリア	Yes
7	MultiCASE Inc.	米国	Yes
8	Lhasa Ltd.	英国	Yes
9	Istituto Superiore di Sanità (ISS)	イタリア	Yes
10	Gifu University (岐阜大学)	日本	
11	Massachusetts Institute of Technology	米国	
12	Simulations Plus, Inc.	米国	Yes
13	Chemotargets	スペイン	
14	LMC - Bourgas University	ブルガリア	Yes
15	The University of Sydney	オーストラリア	
16	Meiji Pharmaceutical University (明治薬科大学)	日本	
17	Liverpool John Moores University	英国	
18	Evergreen AI, Inc.	カナダ	
19	Politecnico di Milano	イタリア	
20	National Center for Toxicological Research U.S. Food and Drug Administration (NCTR/FDA)	米国	
21	National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所)	日本	

(a)



(b)



(c)

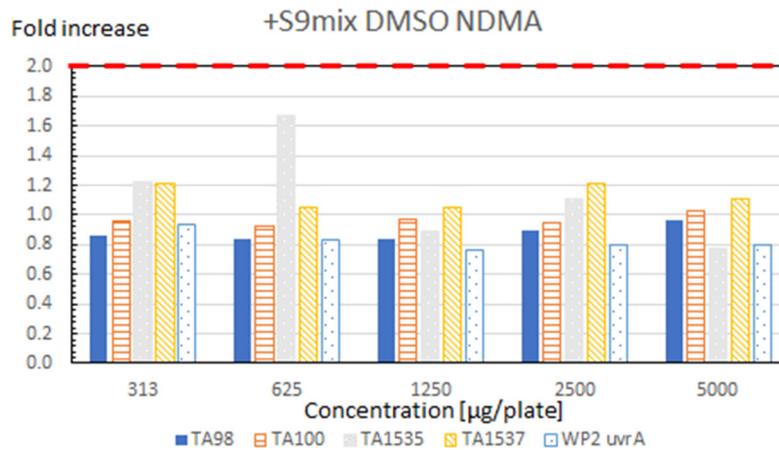
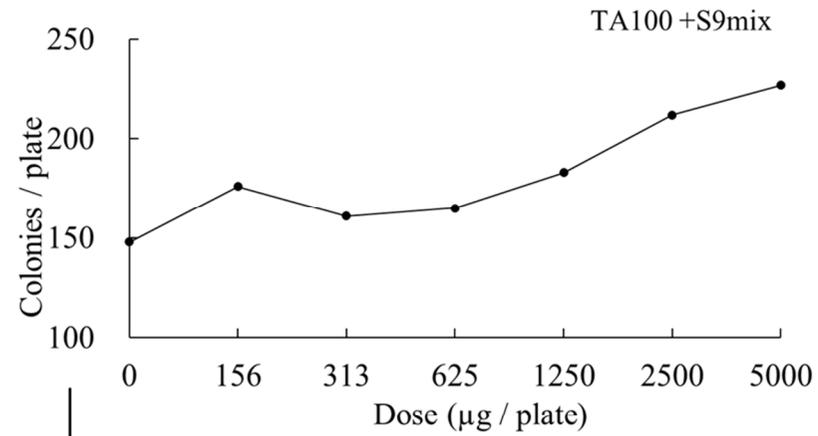
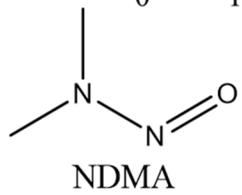
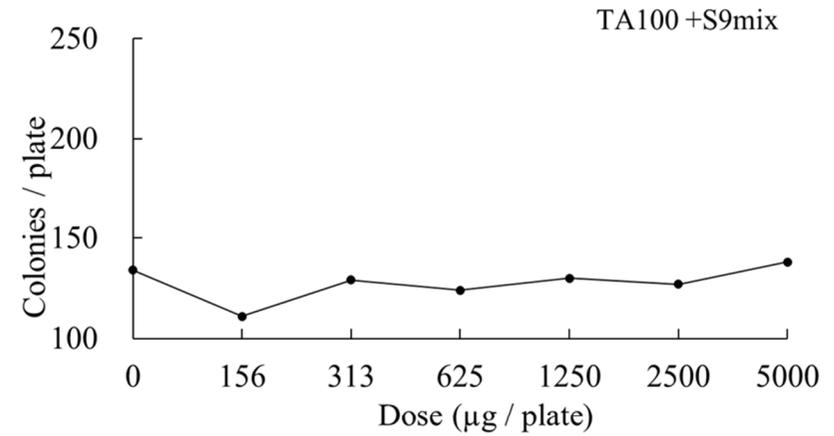


図1 代謝活性化条件下(Rat +S9)でのNDEA(a)、NDMA水溶媒 (b) ならびにNDMA DMSO溶媒(c) Ames試験 陰性対照からのコロニー数の増大の比 (本試験の結果) (2倍以上：赤点線部分以上の増大がみられるものが陽性)

溶媒：水



溶媒：DMSO



N-nitrosodimethylamine

図2 代謝活性化条件下(Rat +S9)でのNDMAの溶媒依存性

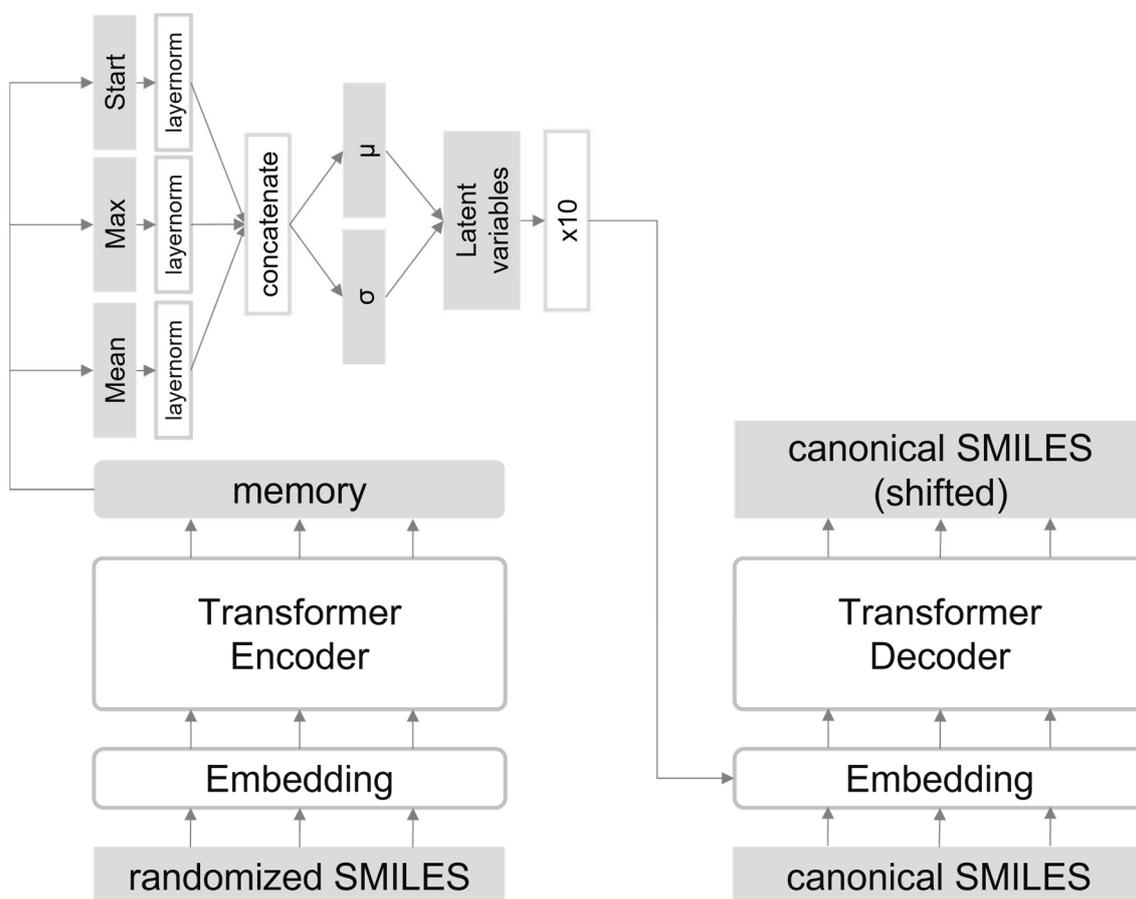
表3 第2回および第1回プロジェクトの結果概要（全モデルの平均比と値の幅）

	第2回プロジェクト			第1回プロジェクト(本間ら2019)		
	Ames試験結果を知る前に選択したBest models	Ames試験結果を知る前に選択したBest models (第1回プロジェクトに参加したチームのみ)	Ames試験結果を知った後に選択したBest models	フェーズI	フェーズII	フェーズIII
感度 (%)	46.3 (20.0-76.9)	56.2 (40.7-76.9)	52.0 (23.7-76.9)	55.8 (38.6-70.0)	56.6 (41.6-72.1)	56.6 (31.7-70.4)
特異度 (%)	87.5 (75.9-96.9)	83.9 (75.9-91.5)	85.2 (72.7-96.9)	78.7 (62.5-91.5)	85.4 (64.9-93.5)	80.1 (60.7-93.0)
精度 (%)	81.4 (70.5-86.8)	79.9 (73.6-85.9)	80.4 (71.5-86.8)	75.3 (63.6-83.9)	81.2 (65.8-87.7)	76.8 (61.1-87.3)
バランス精度 (%)	66.9 (49.6-78.5)	70.1 (62.8-78.5)	68.6 (59.2-78.5)	67.2 (62.1-72.5)	71.0 (64.0-78.9)	68.4 (62.0-74.4)
カバー率 (%)	93.0 (35.9-100)	84.2 (35.9-100)	92.3 (35.9-100)	86.7 (14.5-100)	85.5 (18.0-100)	86.0 (9.7-100)
F1スコア (%)	42.2 (16.8-53.8)	45.1 (34.8-53.8)	43.7 (30.4-53.8)	40.0 (31.8-48.9)	47.8 (36.9-57.9)	41.5 (31.7-51.5)
評価対象モデル数	21	9	22	18	21	19
予測対象物質数	1,589	1,589	1,589	3,902	3,829	4,409

詳細はFuruhama A, et al 2023. SAR QSAR Environ. Res. 34(12):983-1001参照。各チームが選択したモデルでは、結果を知る前に複数のモデルの結果のうち自分たちのモデルの中で一番よいものを選択してもらった結果では、1チームが提出せず、1チームがチーム内の2グループの結果を提示したため21モデルとなった。結果を知った後に複数のモデルの結果のうち自分たちのモデルの中で一番よいものを選択してもらった結果では、1チームがチーム内の2グループの結果を提示したため22モデルとなった。

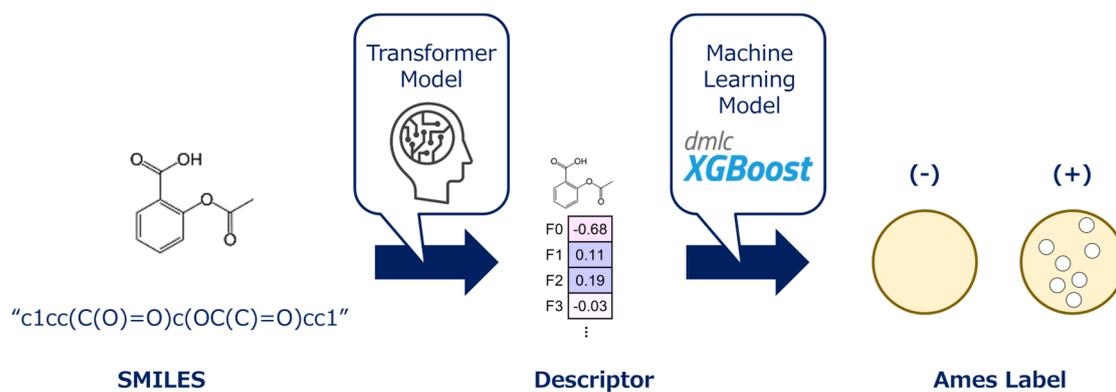
(別紙1) モデルの概念図

- Latent variables: 記述子
- μ , σ : 潜在表現の分布(正規分布)の平均, 標準偏差
- randomized SMILES: SMILES表記の開始順をランダムとしたもの (化合物構造としては対応するCanonical SMILESと同等)
- Canonical SMILES (shifted): Transformerモデルの予測対象。TransformerモデルはEncoder-Decoder構造をとっており, 入力したSMILESを潜在表現として符号化した後, 得られる固定長ベクトルから元のSMILESへと復号化する過程を学習している。復号化過程では, 一つ前までのトークン列から次にくるトークン列を予測するため, 元の入力データのトークンを一つシフトしたものがラベルとして用いられる
- Encoder-Decoder構造: データの符号化・復号化をタスクとする自己教師ありの学習構造
- トークン列: SMILES文字列情報の最小単位
- Embedding: SMILES表記を数値ベクトルへと変換する層
- LayerNorm: 学習安定化を目的にサンプル方向の正規化を行う層



(別紙2) 計算フロー

1. データセット内の化合物を表現するSMILES表記を取得する
2. 上記をTransformerモデルに入力し、記述子を得る
3. XGBoostモデルに対し、準備した記述子と対応するAmesラベル (変異原性有無)を入力し、変異原性予測を行う



(別紙3) Hansenデータを用いた性能評価

(%)	翻訳精度	分類精度	感度	特異度	陽性率
ZINC モデル	25.5	85.1	76.1	69.7	75.8
PubChem モデル	23.4	82.5	77.0	71.8	77.1

※精度： $\frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN}$

※感度： $\frac{TP}{TP+FN}$

※特異度： $\frac{TN}{FP+TN}$

※陽性率： $\frac{TP}{TP+FP}$

※TP:(Ames 予測の)真の陽性

※TN:真の陰性

※FP:偽陽性

※FN:偽陰性

(別紙 4) 18 物質の In-house データを用いた性能評価

(%)	翻訳精度	分類精度	感度	特異度	陽性率
ZINC モデル	88.9 (16/18)	61.1 (11/18)	76.9 (10/13)	20.0 (1/5)	71.4 (10/14)
PubChem モデル	94.4 (17/18)	55.6 (10/18)	69.2 (9/13)	20.0 (1/5)	69.2 (9/13)

令和5年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：

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	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	山本 繁史	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	勝谷 成男	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	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
研究協力者	安部 賀央里	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	講師

研究要旨

反復投与毒性は、化学物質リスク評価における主要な毒性エンドポイントである。そのデータギャップをリードアクロスにより補完するためには、構造類似性だけでなく生物学的類似性に基づき、試験データのない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。しかし、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、評価対象物質が生体内で速やかに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と考えられるケースはしばしばあり、代謝を含めたトキシコキネティクス（TK）の類似性にもとづくグループ化は、適用範囲の拡大のための有用且つ必要なアプローチであると考えられる。本年度は、リードアクロスTKの類似性に基づき低毒性が予測される物質群へ拡大適用することを検討した。反復投与毒性の統合データベースから低毒性物質を抽出して化学構造に基づいてグループ化した。続いて既存のTKや代謝のデータに基づいて低毒性となる理由を正当化し10個のカテゴリーを作成した。さらに事例研究として、ベンゼンスルホン酸類2物質を評価対象物質として、化学物質審査規制法（化審法）スクリーニング評価を想定した反復投与毒性の予測を行った。本アプローチは他の物質への適用が十分可能であり、さらなる事例を積み重ねることにより、行政リスク評価への実装が期待される。

A. 研究目的

反復投与毒性は、化学物質安全性評価に

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（定量的）構造活性相関（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、トキシコキネティクス（TK）やトキシコダイナミクス（TD）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、代謝や TK 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。したがって、それら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や TK を予測する生理学的動力学（PBK）モデルが開発されており、また実際の代謝物や TK パラメータに関する実測データの蓄積が進められている。一方、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、代謝や TK 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、代謝や TK 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。

本年度は、本アプローチを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、“該当する構造アラートや AOP がない”ことは十分でなく、“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必要である。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。

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. 低毒性物質の抽出とカテゴリー化

毒性試験公開データベースの HESS、COSMOS、FSCJ、RepDose、ToxRef から経口投与によるラット反復投与毒性試験データを統合した NIHS 反復投与毒性試験統合データベース (1518 物質、1908 試験) から、OECD テストガイドラインと同等あるいは準拠した試験を選定した。その中から病理組織学的所見が認められない且つ NOAEL 値を不確実性係数で除した有害性評価値により化学物質審査規制法 (化審法) スクリーニング評価の有害性クラス [一般毒性] “外” または “4” に分類される物質 (28 日間試験および 90 日間試験で NOAEL 値がそれぞれ 30 mg/kg/day または 90 mg/kg/day 以上で病理組織学的所見が認められなかった物質) を低毒性物質として抽出した。

次いでこれらを化学構造に基づいてグル

ープ化し、すべての物質について PubChem、HESS (ver.3.3) 等に登録されている ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion) 情報を検索した。さらに、OECD の高生産量物質のカテゴリー評価文書から、ADME に関する情報を収集した。化学構造と ADME 情報を関連付けて低毒性に対する考察を行い、化学構造、TK、毒性学的性質が類似すると考えられる物質群をカテゴリー化した。

続いて、関連する既存データの量と新規性の観点から優先的に選択したカテゴリーを対象に、共通する部分構造を有するが低用量から毒性影響 (病理組織学的変化) が観察された物質を統合データベースから抽出した。両グループを、1) 化学構造、2) ADMET Predictor (ver11)、OECD QSAR Toolbox (ver.4.4)、US EPA CompTox Chemicals Dashboard (ver. 2.4.1) より算出または抽出された TK 関連パラメータ、3) OECD QSAR Toolbox (ver.4.4)、EPA CompTox Chemicals Dashboard よりそれぞれ得られた化学反応性および生物活性に関するプロファイルを相互比較することにより、低毒性物質カテゴリーの構造領域及びパラメータ領域を定義した。

B.2. リードアクロスによる NOAEL 値推定

低毒性カテゴリーに該当すると考えられた 2 物質を選定し、その 28 日間反復投与毒性試験の NOAEL 値をリードアクロスにより推定した。評価対象物質が上で定義されたカテゴリーの領域内に入るかを確認したのち、化学反応性や特定の毒性メカニズムに関連する構造アラートがないかを確認し、試験済み類似物質と TK や毒性の観点から

類似性を評価し、最も適切な類似物質の試験の NOAEL 値をリードアクロスに適用した。そして NOAEL 値から有害性評価値を算出し、化審法有害性クラス分類を行った。

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. 反復投与毒性試験に対する低毒性物質の抽出およびカテゴリー化

まず、NIHS 反復投与毒性試験統合データベースから抽出した低毒性物質 189 物質について、その化学構造の類似性によりグループ化した。次にすべての物質について

個々の ADME 情報を検索したところ、入手可能な ADME 情報はごく一部に限られることが判明した。その中で構造情報と ADME 情報と関連付けることができたのは 10 グループ (鎖状脂肪族炭化水素類、鎖状脂肪族 1 級アルコール類、エチレングリコールアルキルエーテル類、プロピレングリコールアルキルエーテル類、安息香酸類、“プロパンジオール、プロパントリオールおよびペンタエリスリトール”類、ヒダントイン類、イミダゾリノン類、ベンゼンスルホン酸類、ナフタレンスルホン酸類) であった。

毒性レベルが低い理由を既存の ADME 情報に基づいて整理すると、経口投与後に① 吸収されにくい、② 吸収されるが代謝を受けて胆汁もしくは尿中に排泄される、③ 吸収されるが大部分は未変化体として尿中に速やかに排泄される、に分類されると考えられた。① に該当するカテゴリーとして、鎖状脂肪族炭化水素類、② に該当するカテゴリーとして鎖状脂肪族 1 級アルコール類、エチレングリコールアルキルエーテル類、プロピレングリコールアルキルエーテル類、安息香酸類、③ に該当するカテゴリーとして“プロパンジオール、プロパントリオールおよびペンタエリスリトール”類、ヒダントイン類、イミダゾリノン類、ベンゼンスルホン酸類、ナフタレンスルホン酸類がリストアップされた。

上記の低毒性物質グループを対象に、共通する部分構造を有するが低用量から毒性影響が観察された物質を統合データベースから抽出し、低毒性物質グループと予備的に比較したところ、鎖状脂肪族アルコール類、エチレングリコールアルキルエーテル類およびベンゼンスルホン酸類について、

低毒性物質群を構造領域や TK に関わるパラメータ領域の観点から定義できる可能性が示唆された。そこで、関連する既存データの量および新規性の観点からベンゼンスルホン酸類を優先的に選択してカテゴリーを作成し、その妥当性を評価した。

NIHS 反復投与毒試験統合データベースから抽出された 9 個のベンゼンスルホン酸類は、28~49 日間の反復投与毒性試験で NOAEL 値は 100 mg/kg/day~1000 mg/kg/day であった。2 物質の試験で病理組織学的所見が認められたもののいずれも胃への影響のみであった。経口投与時の局所的な刺激作用によると考えられ、それ以外の物質では全身で病理組織学的所見は認められなかった。一方、分子内にスルホ基を有しないがそれ以外の官能基は同様の種類を有するベンゼン誘導体 14 物質を同毒性データベースから抽出しその毒性影響を調べたところ、種々の臓器毒性が認められ、そのほとんどで NOAEL 値は数 mg/kg/day ~ 数十 mg/kg/day であった。以上より、ベンゼン環に置換するスルホ基は全身毒性影響を緩和する効果があると考えられた (表 1)。

28 日間反復投与毒性試験で毒性所見が観察されず NOAEL 値が 300 mg/kg/day であった Sodium toluene-4-sulphonate (CAS No: 657-84-1) では、PubChem 検索により実測の ADME 情報が見つかった。同試験は 1970 年代初期に報告され、原本の入手はできず詳細は不明であるが、経口投与後に速やかに体内に吸収され、大部分が未変化体として尿中排泄されることが示されている。したがって、ベンゼンスルホン酸類は、疎水性は高くないものの経口暴露時には一定量が体内に吸収されるが代謝を受けにくく、さら

に分布体積が小さく、化学反応性や生物活性は高くないために全体として低毒性であると考えられた。そして、スルホ基以外の置換基 (アミノ基、ニトロ基、クロロ基、短い炭素鎖 (C1~2)) の種類や数は、全身毒性に対し影響が大きいと考えられた。

そこで、ベンゼンスルホン酸類 9 物質とスルホ基を有しないベンゼン誘導体 14 物質について、TK に関わるパラメータの計算値を収集した。実測値がある場合にはそれも収集し、該当する *in silico* モデルの局所的な予測性能を評価した。さらに、化学反応性と生物活性に関連するプロファイルを収集した (表 2)。 *In vitro* 変異原性、皮膚感作性、急性毒性、生殖発生毒性の試験データも可能な限り収集した。

TK 関連パラメータの予測モデル (ADMET Predictor) の局所的な精度を評価した。実測の logP 値が利用できたベンゼンスルホン酸類 5 物質およびスルホ基を有しないベンゼン誘導体 11 物質についての S-logP 予測値は、実測値と比べて差はおよそ 1 以内であった。ヒト CL_{int} についても予測値は実測値と一桁以内の差であった。ベンゼンスルホン酸類はスルホ基を有しないベンゼン誘導体類と比べて、S+logP、ヒト S+Peff、Vd、HEP_hCL_{int} の値は低い傾向にあり、パラメータ領域に差が認められた (S-logP: -1.789~0.412 ⇔ 1.402~4.643、S+Peff: 0.464~3.409 ⇔ 3.055~12、Vd: 0.246~0.275 ⇔ 0.873~2.587、HEP_hCL_{int}: -2.705~6.394 ⇔ 1.917~91.4) (表 2)。

EPA CompTox Chemicals Dashboard が提供する、物性および ADME-IVIVE 情報を収集した。

logKOW(=logP)の実測値については、ベン

ゼンスルホン酸類のデータは少なく、一物質のみのため、比較が難しいが、スルホ基を有しないベンゼン誘導体類と比較して、logKOW が低い可能性が考えられた。PBK-IVIVE Intrinsic Hepatic Clearance、Fraction Unbound in Plasma の実測値、PK Half life (ラット、ヒト)、Volume of Distribution (ラット、ヒト) の予測値の情報を収集した。Intrinsic Hepatic Clearance と、Volume of Distribution に差が見られ、低毒性物質は肝クリアランスが小さく、分布容積も小さい傾向があった。

一方、生体高分子との反応性については、ベンゼンスルホン酸類およびスルホ基を有しないベンゼン誘導体類いずれも QSAR Toolbox の DNA binding および Protein binding アラートはほとんど示されず、両グループ間で明確な差は認められなかった。

ToxCast の *in vitro* ハイスループット試験データについては、ベンゼンスルホン酸類は、9 物質 (計 1777 アッセイ) に対して active call は 49 アッセイであった。ビニル基を有する CAS No. 2695-37-6 を除く 8 物質 (計 1559 アッセイ) に対して active call は 13 アッセイであった。一方、スルホ基を有しないベンゼン誘導体類では、11 物質 (計 5771 アッセイ) に対して、73 個の active call が認められた (表 2)。全体としてベンゼンスルホン酸類およびスルホ基を有しないベンゼン誘導体類の親物質の生物活性は共に低い傾向にあり、両グループに明確な差は認められなかった (表 2)。

代謝については、ラット肝の *in vitro* データがあるのはスルホ基を有しないベンゼン誘導体類の 4 物質のみであったが、QSAR Toolbox の代謝シミュレータ (Rat liver

metabolism simulator) はその実測代謝物をよく再現できていた。予測代謝物数は、ベンゼンスルホン酸類では 0~1 個、スルホ基を有しないベンゼン誘導体類では多くのケースで 5~10 個であり、ベンゼンスルホン酸類は代謝を受けにくい可能性があることが示唆された (表 2)。

In vitro 変異原性については、試験データのある物質については両グループともほとんど陰性であった。皮膚感作性については、陰性と陽性が混在しており、両グループ間で明確な差は認められなかった。

一方、急性毒性および生殖発生毒性については、試験データのある物質数は限られたが、ベンゼンスルホン酸類のその毒性レベルは低かった。一方、スルホ基を有しないベンゼン誘導体類では、より低い用量で毒性影響が認められる傾向にあった。試験データがない物質が多数あることに留意する必要はあるものの、両毒性の結果は、反復投与毒性試験結果とおよその傾向の一致性が認められた (表 2)。

以上より、ベンゼンスルホン酸類 9 物質は、極性の大きいスルホ基の作用により、体内に吸収され、代謝はあまり受けず速やかに排泄されること、化学反応性や生物活性は総じて高くないことから、反復経口投与では低毒性のカテゴリーとすることができると考えられた。

C.2. 低毒性カテゴリー物質の 28 日間反復投与毒性をリードアクロスにより予測する事例研究

評価対象物質は、2-Amino-4-chloro-5-methylbenzenesulfonic acid (CAS: 88-51-7: Target 1) および 2-Amino-4-methyl-

benzenesulfonic acid (CAS: 88-62-0: Target 2) 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、化審法有害性クラスのカテゴリ分けを行った。

Target 1 は、QSAR Toolbox を用いたデータ検索では、反復投与毒性の試験結果はなかった。

Target 1 は、ベンゼンスルホン酸にアミノ基、クロロ基、メチル基がそれぞれ 1 個置換しており、ベンゼンスルホン酸カテゴリの構造領域を満たした。

ADMET Predictor により TK 関連パラメータのデータを生成したところ、S+logP は 0.098、S+Peff は 3.023、Vd は 0.252、HEP_hCLint は 3.647 であった。CompTox Chemicals Dashboard を用いた検索では、ToxCast の Bioactivity 試験結果は 218 アッセイですべて "inactive" であった。ADME-IVIVE の結果は、Intrinsic Hepatic Clearance (Rat) は 6.25、Fraction Unbound in Plasma は 0.269 (いずれもラット実測値)、PK Half life は 0.5161 時間、Volume of Distribution は 0.3595 L/kg (いずれもラット推計値) であった。TK 関連パラメータは、カテゴリ物質のパラメータ範囲内である。QSAR Toolbox を用いたデータ検索では、Ames 変異原性の試験結果は陰性、急性毒性の LD50 値は 12,300 mg/kg であり、毒性影響は低いと考えられた。以上から Target 1 は当該カテゴリに属すると判断された。

化学構造と TK パラメータの類似性からもっとも適切な類似物質(ソース物質)は ID 6 (CAS No. 6627-59-4、Target 1 のナトリウム塩)と考えられた。当該ソース物質の毒性値を用いてリードアクロスすることにより、

NOAEL 値は 300 mg/kg/day と推計された。

Target 2 は、ベンゼンスルホン酸にアミノ基、メチル基がそれぞれ 1 個置換しており、ベンゼンスルホン酸カテゴリの構造領域を満たす。その TK 関連パラメータは、S+logP は -1.123、S+Peff は 1.048、Vd は 0.247、HEP_hCLint は 3.345 であり、カテゴリ物質のパラメータ範囲内である。以上から Target 2 も当該カテゴリに属すると判断された。

化学構造と TK パラメータの類似性からもっとも適切な類似物質(ソース物質)は ID 1 (CAS No. 88-44-8)と考えられた。当該ソース物質の毒性値を用いてリードアクロスすることにより、NOAEL 値は 300 mg/kg/day と推計された。

Target 1 および Target 2 の反復投与毒性の有害性評価値は、NOAEL 値を不確実性係数 600 で除すことによりいずれも 0.5 が導出された。したがって有害性クラス[一般毒性]はクラス 4 に分類された。

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 11 物質を対象とした (Androstenedione, Benzopyrene, Chrysene, Finasteride, Nitropyrene, Phenanthrene, Progesterone, Pregnenolone, Pyrene, Reactive blue 19, Testosterone)。昨年度と作業者を代えて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

らない配置を検討し、予測の再現性を確認した。

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要点を以下に示す。

- ・六員環を有する物質は当てはめが比較的容易である。
- ・最初にテンプレートの position 1 と position 6 にどの原子を配置するかを考えておくと当てはめ操作がしやすい。
- ・平面的な分子であれば、横向きのテンプレートで制約を受けることはほとんどない。一方で、立体的にかさ高い分子は、平面的な構造になるよう動かすことが必要である。
- ・「Cavity 2 residue: Trigger site には最後に trigger が落ちてくるので前から横からも経路を邪魔してはいけない」については、横から見た図の矢印上に原子や結合が重なっていないことを確認している。かさ高い分子の場合この制約が最も大きな障壁となることが多い。
- ・テンプレート内に 2 分子入る場合は、検討されている物質が少ないのでパターンを理解しにくい。ただ、現状ではサイズが小さい分子の場合 2 分子の可能性を考慮する必要がある一方で、(Reactive blue 19 等のように) サイズが大きい分子だと、2 分子入る可能性は少ないと考えられる。

D. 考察

本分担研究では、リードアクロスを低毒性物質の予測に適用することを検討した。その信頼性の担保のためには、“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必要である。

しかし、化学物質の体内動態や代謝に関する実測データは限られている。低毒性の物質は、毒性が強い物質より既存データはさらに少ない。したがって体内動態や代謝物構造を予測する *in silico* モデルの活用が期待される。

ベンゼンスルホン酸類および比較対象としたスルホ基を有しないベンゼン誘導體類いずれも生体高分子との化学反応性および生物活性の *in silico/in vitro* プロファイル、*in vitro* 変異原性や皮膚感作性に顕著な差は認められなかった。したがって、ベンゼンスルホン酸類の低毒性を説明する要因としてトキシコダイナミクスよりむしろ TK の性質の寄与が示唆された。

TK に関するパラメータでは、logP、Peff、Vd、Clint、予測代謝物数について両グループの間に明確な差が認められた。さらに急性毒性の LD50 値、生殖発生毒性の NOEL 値は試験データのある物質数は限られたが、ベンゼンスルホン酸類のその毒性レベルは低かった。既存の様々なタイプの既存データを説明できる NAM を選択し、それらを総合することにより、“極性の大きいスルホ基の作用により、体内に吸収され、代謝はあまり受けず速やかに排泄されること反復経口投与では低毒性のカテゴリー”を正当化できると考えられた。また、カテゴリー物質の構造の違いと TK パラメータ値から、このカテゴリーの適用範囲を定義づけすることができた。

TK に関連するパラメータ値を用いる時に留意すべき点として、モデルの適用範囲と全体的な予測精度に関する不確実性を同

定し評価しておくことが挙げられる。それを実施するために必要な情報が利用できない場合には、予測モデルは限られた実測データを再現できるか、すなわち局所的な精度評価を実施することが求められる。独立した異なるモデルから同一構造に対する一貫した（一致する）予測が得られ、それを統合して最終結果が生成される場合、個々の予測の不確実性を低減することができると思われる。

事例研究として、ベンゼンスルホン酸類 2 物質を評価対象物質として、化審法スクリーニング評価を想定した反復投与毒性の予測と有害性クラス分類を行った。評価対象の 2 物質はいずれも同カテゴリーの適用範囲内にあった。TK パラメータの推計値の不確実性はあるが、評価対象物質と極めて類似の試験済み物質が同定されたことから、リードアクロス全体の不確実性は大きくないと考えられた。導出された有害性クラス 4 が予測の不確実性を含めても、優先評価化学物質の候補になるクラス 2 になるとは考えにくいことから、この予測結果は化審法スクリーニング評価の文脈で受け入れの可能性は大きいと考えられる。

さらに本分担研究では、これまで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。選定した 11 物質について、複数のユーザーが基質テンプレートへの当てはめを再現できることを確認できた。さらに適用しやすい物質の基本的構造を整理できた。

一方、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、リードアクロスを TK の類似性に基づき低毒性が予測される物質群へ拡大適用することを検討した。作成した低毒性カテゴリーを TK の性質に基づいて正当化した。本アプローチは他の物質への適用は十分可能であり、さらなる事例を積み重ねることにより、行政リスク評価への実装が期待される。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. 山田隆志, 丸山 (薦田) 多恵子. 化学物質のヒト健康影響評価に資するリードアクロス -行政リスク評価への適用を目指して- (*CICSJ Bulletin* 2023, Vo.41, No.1, 6-10.
2. Myden A, Stalford SA, Fowkes A, White E, Hirose A, Yamada T. Enhancing developmental and reproductive toxicity knowledge: A new AOP stemming from glutathione depletion. *Curr Res Toxicol*. 2023 Sep 15;5:100124.
3. Yamazoe Y, Murayama N, Kawamura T, Yamada T. Application of fused-grid-

based CYP-Template systems for genotoxic substances to understand the metabolisms. *Genes Environ.* 2023 Aug 7;45(1):22.

4. 山田隆志. Next Generation Risk Assessment の現状と行政利用へ向けた課題 (動物実験代替法と New Approach Methods の開発・利用動向. 監修: 小島肇夫. 発行日: 2023.9.29, シーエムシー出版)

F.2 学会発表

1. 山田隆志: 化学物質の規制安全性評価の国際動向: OECD (Q)SAR 評価フレームワーク(QAF)の概要. 日本薬学会第144年会 (2024.3.30, 横浜)
2. Rathman J, Yamada T, Yang C, Mostrag A, Hobocienski B, Ribeiro V, Barber C.: Computational decision workflows evaluation following the new OECD QSAR Assessment Framework. Society of Toxicology 63rd Annual Meeting (2024.3.11, Salt Lake City, US).
3. Yamada T, Tamehiro N, Teratani N: Case studies on refining risk assessment of food-related substances with New Approach Methods. (13th Global Summit on Regulatory Science (GSR23), Parma, 2023.9.27).
4. Yamada T, Katsutani N, Hirose A, Hill E, Fowkes A, Stalford S, Myden A: An Adverse Outcome Pathway for histone deacetylase inhibition leading to axial skeletal defects: Development and potential to improve decision support in

chemical safety assessment. (12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC12), Niagara Falls, August 30, 2023).

5. 山田隆志: 次世代リスク評価の信頼性構築へ向けた New Approach Methodology の活用の課題. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.19)
6. 山本 繁史, 明関 由里子, 吉田 喜久雄, 山田隆志: 生理学的薬物動力学(PBK)モデリングを用いた環境化学物質のトキシコキネティクス予測のためのデータベースの構築. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
7. 勝谷成男, 山田隆志, 広瀬明彦, Emma Hill, Adrian Fowkes, Susanne A. Stalford, Alun Myden: ヒストン脱アセチル化酵素阻害から発生毒性につながる AOP の開発. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
8. 丸山(薦田)多恵子, 山添康, 齊藤亮子, 山田隆志: 試験データベース解析に基づく肝毒性関連情報の抽出—予測精度向上を目指して. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
9. 山田隆志, 大畑秀雄, 古濱綾子, 杉山圭一, 本間正充, 瀬川勝智, 相崎健一, 広瀬明彦, 増村健一: 行政における化学物質リスク評価を支援する AI を用いた安全性予測プラットフォームの開発. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
10. Furuhashi A, Maruyama T, Yamada T, Sugiyama K, Honma M: Evaluating Ames mutagenicity predictions for 1,3,5-tris(2,3-

dibromopropyl)-1,3,5-triazinane-
2,4,6-trione under the OECD QSAR
Assessment Framework. The 20th
International Workshop on (Q)SAR
in Environmental and Health Sciences
(June 7 2023, Copenhagen, Denmark)

なし

G.3. その他
なし

F.3 シンポジウム/講習会/Work Group での 発表

1. Yamada T: Development and application of toxicity databases for improvement of *in silico* approaches for regulatory chemical safety assessment. (OECD 20th Meeting of the QSAR Toolbox Management Group, Boulogne, France, 2023.11.17).
2. 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 5 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 (2023.10.11, 東京-Online)
3. 山田隆志: In silico 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づくヒト健康リスク評価の効率化・迅速化を目指して. シンポジウム [リスク評価手法の現状と今後], 2023 年 日化協 LRI 研究報告会 (東京, 2023.8.25)

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

表 1. ベンゼンスルホン酸カテゴリ物質と同カテゴリに属さないスルホ基を有しないベンゼン誘導体の化学構造

いずれの化学構造も NIHS 反復投与毒試験統合データベースから抽出された。スルホ基を有しないベンゼン誘導体の化学構造は、スルホ基が毒性を緩和する効果があるとする仮説を説明するために用いられ、置換基の種類、数はできるだけカテゴリ物質と一致性をもつように選択された。

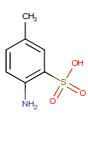
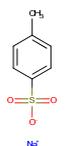
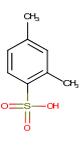
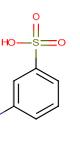
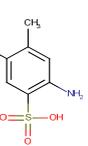
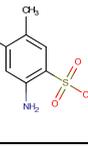
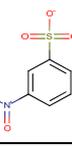
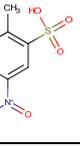
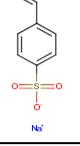
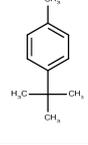
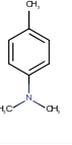
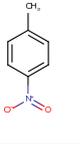
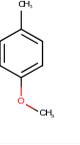
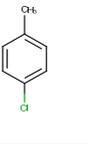
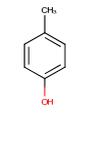
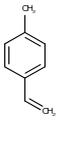
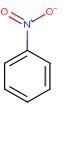
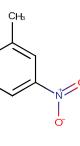
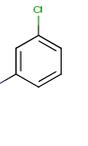
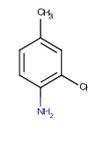
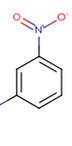
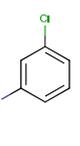
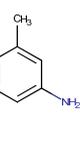
Category	in	in	in	in	in
ID	1	2	3	4	5
CAS	88448	657841	88619	121471	88539
Structure					
ID	6	7	8	9	
Category	in	in	in	in	
CAS	6627594	127684	121039	2695376	
Structure					
ID	10	11	12	13	14
Category	out	out	out	out	out
CAS	98511	99978	99990	104938	106434
Structure					
ID	15	16	17	18	19
Category	out	out	out	out	out
CAS	106445	622979	98953	99081	121733
Structure					
ID	20	21	22	23	
Category	out	out	out	out	
CAS	95681	99092	108429	108441	
Structure					

表 2. ベンゼンスルホン酸カテゴリーの構築のためのデータマトリックス

ID	Category	Repeated dose toxicity				
		duration	NOEL (mg/kg/day)	effective dose	Organ (Tissue)	Effect
1	in	28	300			
2	in	28	300			
3	in	42	100			
4	in	28	300			
5	in	28	1000			
6	in	42	300			
7	in	28	1000			
8	in	49	175	700	Stomach (Glandular stomach)	Hemorrhage, Erosin
9	in	28	100	1000	Stomach (Forestomach/Limiting ridge)	Hyperplasia/Thickening epithelium, Hyperkeratosis/Parakeratosis
10	out	28	1.5	50	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Periportal)
				50	Testis	Atrophy seminiferous, Hyperplasia leydig cell
				50	Epididymis	Germ cell ↓
11	out	91	<62.5	62.5	Bone marrow	Hematopoiesis ↑
				62.5	Kidney	Pigmentation (Other)
				125	Kidney	Nephropathy, Mineralization, Necrosis
				62.5	Liver	Necrosis hepatocyte (Other), Pigmentation (Hemosiderin)
				125	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Other)
				250	Lymph node	Other findings
				62.5	Spleen	Extramedullary hematopoiesis, Congestion, Fibrosis, Pigmentation (Other)
				250	Spleen	Atrophy
				500	Stomach (Forestomach/Limiting ridge)	Inflammation
12	out	91	<42	42	Kidney	Pigmentation (Other)
				42	Spleen	Pigmentation (Hemosiderin), Extramedullary hematopoiesis, Congestion
				342	Testis	Other findings
13	out	28	100	1000	forestomach	Hyperkeratosis, Hyperplasia
				1000	lung	Respiratory Distress
				1000	liver	Hypertrophy, Necrosis
14	out	90	<50	50	Stomach (Glandular stomach)	Erosin
				800	Adrenal	Cell hypertrophy
				800	Kidney	Basophilic change/Regeneration/Degeneration, Dilatation, Cell infiltration/Inflammation, Other findings
				800	Stomach (Glandular stomach)	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Centriobular)
				800	Stomach (Glandular stomach)	Erosin
15	out	91	<50	600	Trachea	Other findings
				600	Kidney	Nephropathy
16	out	90	50	300	Lung	Cell infiltration/Inflammation, Other findings
17	out	28	<5	25	Spleen	Congestion, Pigmentation (Other)
				125	Bone marrow	Hematopoiesis ↑
				125	Brain	Other findings
				125	Epididymis	Germ cell ↓
				125	Kidney	Pigmentation (Other)
				125	Liver	Extramedullary hematopoiesis, Pigmentation (Other)
				125	Testis	Atrophy seminiferous, Degeneration semiferous tubule
18	out	91	<48	48	Spleen	Pigmentation (Hemosiderin)
				171	Spleen	Pigmentation (Hemosiderin)
				336	Spleen	Congestion
				661	Testis	Other findings
19	out	28	<1	1	spleen	Hyperplasia, Extramedullary Haematopoiesis
				5	liver	Hypertrophy
				25	testes	Degeneration
				25	spleen	Changes in Organ Structure, Discoloration
20	out	28	<2	10	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Centriobular)
				10	Kidney	Eosinophilic body/Hyaline droplets
21	out	28	<15	15	Bone marrow	Hematopoiesis ↑
				15	Spleen	Congestion, Extramedullary hematopoiesis, Pigmentation (Hemosiderin)
				50	Epididymis	Germ cell ↓
				50	Kidney	Pigmentation (Other)
				50	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Other)
				170	Liver	Extramedullary hematopoiesis, Pigmentation (Hemosiderin)
				50	Testis	Germ cell ↓
				170	Testis	Hyperplasia leydig cell, Multinucleated giant cell
22	out	93	<10	40	Bone marrow	Hematopoiesis ↑, Other findings
				40	Kidney	Pigmentation (Hemosiderin)
				40	Liver	Pigmentation (Hemosiderin), Extramedullary hematopoiesis
				10	Spleen	Pigmentation (Hemosiderin), Extramedullary hematopoiesis, Congestion
				40	Spleen	Fibrosis, Other findings
23	out	42	<30	30	Spleen	Extramedullary hematopoiesis, Congestion, Pigmentation (Other)
				100	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Other), Extramedullary hematopoiesis, Pigmentation (Other)
				300	Kidney	Pigmentation (Other)

表 2. ベンゼンスルホン酸カテゴリーの構築のためのデータマトリックス (続き)

ID	Category	ADMET Predictor							OECD QSAR Toolbox			
		MW	S+logP	S+logD	S+Peff	Vd	HEP_hCLint	HEP_rCLint	log Pow	Acute toxicity (mg/kg)	Reproductive toxicity (mg/kg bdwt/d)	number of simulated
1	in	187.218	-1.116	-2.244	1.348	0.253	2.705	14.537	-0.67	>2000	1000	0
2	in	194.185	0.051	-1.921	2.808	0.251	5.83	25.98		≥3346	300	0
3	in	186.231	0.412	-2.061	3.06	0.255	5.982	27.417				0
4	in	173.191	-1.789	-2.041	0.464	0.275	3.094	9.084	-2.79	>5000		0
5	in	221.663	-0.182	-1.209	2.089	0.249	4.518	20.656	-0.83			0
6	in	243.645	0.098	-1.423	3.023	0.252	3.647	18.839				0
7	in	225.156	-0.223	-1.233	3.499	0.246	3.051	16.116	-2.61	>5000		1
8	in	217.201	0.078	-1.285	3.303	0.25	3.327	18.963	-0.7, -1.5	300~2000	1000	1
9	in	206.197	0.338	-1.563	2.572	0.269	6.394	31.788			700	
10	out	148.25	4.643	4.643	12	1.729	91.436	841.659	4.4		25, <200	9
11	out	135.21	2.902	2.9	9.925	2.414	44.143	242.851	1.73	1650		8
12	out	137.139	2.309	2.309	6.693	1.05	37.555	49.373	2.37	>2250		3
13	out	122.168	2.63	37.853	10.195	1.293	2.63	183.956	2.8	1920	100, ≥1000	7
14	out	126.586	3.297	133.683	11.908	2.271	3.297	147.408				9
15	out	108.141	1.918	42.841	7.873	1.882	1.917	164.014	1.94	207		4
16	out	118.18	3.309	48.801	12	2.114	3.309	320.234			500	6
17	out	123.112	1.811	1.811	6.598	0.963	37.819	35.203	1.86	588		3
18	out	137.139	2.215	2.215	6.901	1.002	28.478	31.643	2.4	1784, 2121		10
19	out	157.557	2.446	2.446	7.794	1.07	61.192	24.05	2.49			2
20	out	121.183	1.84	1.84	6.345	2.3	14.62	58.597	2.02	1259	300	9
21	out	138.127	1.458	1.458	3.035	0.873	9.344	21.845				5
22	out	127.574	1.863	1.863	5.952	2.587	15.575	33.655	1.88	256		1
23	out	107.156	1.402	1.401	5.894	2.251	12.22	41.687	1.4	922		7

表 2. ベンゼンスルホン酸カテゴリーの構築のためのデータマトリックス (続き)

ID	Category	CompTox Chemicals Dashboard							ToxCast	
		logKOW	Fup (%)	CLint (hepatic)	Vd (human, predicted)	Vd (rat, predicted)	Half life (human, predicted)	Half life (rat, predicted)	Total assays	Active calls
1	in	-	38.3	6.25	0.4423	0.4604	0.8504	0.4923	293	0
2	in	-	37.6	6.25	0.3951	0.423	0.365	0.1842	322	1
3	in	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	in	-	34.7	0	0.371	0.3875	6.918	2.462	218	0
5	in	-	28.2	6.25	0.3445	0.3578	0.8266	0.4888	218	1
6	in	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	in	-2.61	29.2	0	0.3561	0.3783	7.891	2.856	218	5
8	in	-	30.3	0	0.3946	0.4094	8.362	2.979	290	6
9	in	-	-	-	0.296	0.3134	0.3513	0.1866	218	36
10	out	5.17	-	-	-	-	-	-	320	6
11	out	2.81	-	-	-	-	-	-	548	11
12	out	2.37	26.59	19.32	1.733	1.369	2.874	1.075	553	14
13	out	2.66	-	-	-	-	-	-	218	0
14	out	3.33	-	-	-	-	-	-	546	2
15	out	1.94	32.59	39.66	1.808	1.616	1.578	0.6925	562	6
16	out	-	-	-	-	-	-	-	317	5
17	out	1.85	38.44	8.168	1.471	1.254	2.77	1.217	561	5
18	out	2.45	7.728	16.82	1.025	0.7946	3.901	1.711	555	3
19	out	2.46	9.92	21.7	1.185	0.9203	3.203	1.343	296	5
20	out	1.68	41.7	21.7	1.283	1.095	1.411	0.5975	218	1
21	out	1.37	21.4	21.7	0.7008	0.6194	1.11	0.5336	218	0
22	out	1.88	26.5	21.7	1.16	0.9617	1.653	0.7053	293	7
23	out	1.4	54.9	32.9	1.22	1.084	1.014	0.43	566	8

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5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 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 技術顧問
研究協力者 赤堀 有美 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究企画課長
研究協力者 山田 隆志 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長
研究協力者 Alun Myden ラーサ研究所 研究員
研究協力者 Victor Ude 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 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5年度は、昨年度の ECHA の REACH に登録されているデータセットを用いた調査で新たな AOP の有力候補のひとつとなったミトコンドリア毒性について AOP の可能性調査を行った。その結果、雄性生殖毒性、雌性生殖毒性および胎児毒性につながるミトコンドリア機能障害に関係する 6 つの MIE を含む AOP ネットワークの可能性が示された。また、昨年度のデータセットに含まれていた精巣毒性研究の情報について既存の DART AOP ネットワークによるスクリーニングを実施した。その結果、陽性の MIE アッセイデータが特定されたのは 126 の精巣毒性物質のうち 22 の物質で AOP ネットワーク内の 14 の MIE と 2 の KE に関連しており、DART AOP ネットワーク内の 8 つの AOP に含まれていることが示された。また、AOP ネットワークにリンクされた Derek Nexus アラートを調べた結果、25 の陽性化合物について 3 つの AOP が予測された。本研究では、アッセイデータから特定される精巣毒性物質と Derek Nexus アラートで特定される精巣毒性物質が異なる場合には、化合物を AOP ネットワークに関連付けるために補完的な方法を使用できるという利点も明らかになった。

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った。R5 年度は、前年度までの結果を受けて DART との関連性の高いミトコンドリア毒性の AOP 可能性調査を行うと共に、精巣毒性についての AOP ネットワークを用いたスクリーニングを行い、さらなる AOP 作成のための手法開発を目指している。

B. 研究方法

ミトコンドリア毒性の AOP 可能性調査

昨年度の ECHA の REACH に登録されているデータセットを用いた調査で DART の AOP ネットワーク内に含まれていない化合物が多数あることが確認されたが、その中で DART と関連する Derek アラートの探索を行い新たな AOP の有力候補のひとつとなったミトコンドリア毒性について AOP の可能性調査を行った。

精巣毒性についての AOP ネットワークを用

いたスクリーニング

昨年度のデータセットに含まれる 1499 の化合物に関する 1911 の精巣毒性研究の化合物情報について Lhasa の既存の AOP ネットワークによるスクリーニングを実施し、提供された精巣毒性データセットにある陽性化合物に関連する MIE/KE がこのネットワーク(主として催奇性または胚毒性の AOP を構成している)の中に含まれているかを確認した。さらに AOP ネットワークに関連することが明らかになった Derek Nexus アラートのキュレーションを行い、対応する KE とのリンクを行った。

(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

ミトコンドリア毒性の AOP 可能性調査

ミトコンドリアの主な機能はエネルギー産生 (ATP 産生)、さまざまな生理学的過程および代謝過程においてもミトコンドリアは重要な役割を果たす。たとえば、ミトコンドリアは細胞のシグナル伝達(カルシウムシグナル伝達など)、恒常性維持およびプログラム細胞死にとってきわめて重要である。ミトコンドリアは、卵成熟、受精、着床、胚胎発生、精子産生、精子運動性などの発生過程および生殖過程でも重要な役割を果たしている。生体内の ATP 分子の大部分は、ミトコンドリア内で酸化的リン酸化 (OXPHOS) により生成される。酸化的リン酸化過程は電子伝達系における一連の複雑な酸化還元反応に関与しており、電子伝達系は複合体 I、II、III、IV、V という 5 つのタンパク質複合体で構成される。複合体 I から複合体 IV へのこの電子の移動により、内膜の内外にプロトン勾配が生じる。これらのプロトンはアデ

ノシン三リン酸(ADP)と共役し、F1F0 ATPアーゼ(複合体 V)としても知られるミトコンドリア型アデノシン三リン酸合成酵素の存在下でATPを形成する。ミトコンドリアは多くの疾患や加齢に伴う生殖能低下に関与している。ミトコンドリア機能障害は、受精、胚の生存率、着床および胚胎児発生を含む複数の生殖発生過程と関連する[Podolak, 2022; Babayev, 2015]。酸化的リン酸化脱共役剤の一部はミトコンドリア機能およびATP産生に影響することが報告されており、妊娠げっ歯類に投与すると卵成熟異常、胎仔体重減少および同腹仔数減少を引き起こす。ペルフルオロアルキル化合物は酸化的リン酸化の脱共役剤であることが示されている[Wallace, 2013]。ヒトを対象とした研究では、ペルフルオロオクタン酸(PFOA)、ペルフルオロノナン酸(PFNA)、ペルフルオロヘプタンスルホン酸(PFHpS)などのペルフルオロアルキル化合物の血中濃度が高い女性に、受精能低下および胚胎児毒性(流産、子癩前症、胎児成長異常、出生体重減少など)がみられることが明らかになった[Wikström, 2021; Liew, 2020]。生殖発生過程ではATPが重要な必要条件となることから、酸化的リン酸化脱共役および電子伝達系複合体阻害により引き起こされるミトコンドリア機能障害が、胚胎児毒性および雄性/雌性生殖毒性の機序として妥当であることをこのAOPは示しており、そのイメージを図1に示す。

<各MIE, KEの詳細>

複合体Iに結合 → 電子伝達系阻害

ミトコンドリアの電子伝達系は、ミトコンドリア内膜において電子とプロトンを送達する5つのタンパク質複合体(複合体I、II、III、IV、V)で構成されており、アデノシン三リン酸(ATP)産生に必要なプロトン駆動力が生成

される。複合体I(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)-ユビキノン酸化還元酵素)は、電子伝達系の第1の最も大きい複合体であり、複合体Iのユビキノン(CoQ)結合部位に阻害剤が結合すると、複合体IIIへの電子伝達が遮断され、電子リークおよび活性酸素種(ROS)産生の増加につながる可能性がある[Nolfi-Donagan, 2020; Zhao, 2019]。ロテノンは、単離したラット肝のミトコンドリア[Heinz, 2017]ならびにヒトおよびアフリカツメガエルの卵母細胞[Rodríguez-Nuevo, 2022]において複合体Iの活性を阻害することが報告されている。

複合体IIに結合 → 電子伝達系阻害

複合体II(コハク酸脱水素酵素)は、電子伝達系の第2のタンパク質複合体であり、電子伝達系への第2の電子流入点である[Zhao, 2019]。フラビンアデニンジヌクレオチド(FADH₂)がコハク酸から受け取った電子は、複合体II内の硫化第一鉄(FeS)クラスターを介して電子伝達系のユビキノン(CoQ)に伝達される[Zhao, 2019]。阻害剤は複合体IIのキノン(Q)部位またはジカルボン酸部位に結合でき、複合体IIの活性を遮断する[Siebels, 2013]。たとえば、アトペニンA5(Q部位阻害剤)およびマロン酸(ジカルボン酸阻害剤)は複合体IIの活性をQ部位で遮断し、ウシ心臓から抽出したミトコンドリアにおいて活性酸素種(ROS)産生を増加させることが示されている[Miyadera, 2003; Siebels, 2013]。

複合体IIIに結合 → 電子伝達系阻害

補酵素Q-チトクロムc還元酵素としても知られる複合体IIIは、電子伝達系の第3のタンパク質複合体である。複合体IIIのユビキノン(CoQ)には、キノール酸化(Qo)部

位とキノール還元(Qi)部位という 2 つの結合部位がある[Zhao, 2019]。複合体 III 阻害剤は競合的に複合体 III の Qi 部位に結合する(複合体 III の Qo ユビセミン(部分還元型キノール)電子の放出を阻害する)または Qo 部位に結合する(Qo 部位への還元型キノール(QH₂)の結合を阻害し、それにより電子伝達系における電子伝達を妨げる)[Quinlan, 2011; Zhao, 2019]。アンチマイシン A およびミソチアゾールは、複合的 III 阻害剤である[Ramalho-Santos, 2009]。たとえば、アンチマイシン A は、ラット後肢から単離したミトコンドリア[Quinlan, 2011]およびウシ心臓垂ミトコンドリア粒子[Von Jagow, 1981]の複合体 III 活性を遮断する。

複合体 IV に結合 → 電子伝達系阻害

複合体 IV(チトクロム c 酸化酵素(COX))は、電子伝達系の第 4 のタンパク質複合体である[Zhao, 2019]。複合体 IV は、電子伝達系における酸素からの水の生成を触媒し、ATP 合成に必要なプロトン駆動力の生成に寄与する[Torres, 1995; Diaz, 2006]。哺乳類の COX タンパク質には、COX 活性にとって重要な酸化還元活性を有する 4 つの金属中心と 1 つの二核中心がある[Cooper, 2008; Zhao, 2019]。酸化還元活性のあるこれらの金属中心および二核中心は、3 通りの酸化還元状態(完全酸化、部分還元、または完全還元)で存在しうる[Mason, 2006]。阻害剤は、完全酸化状態、部分還元状態、または完全還元状態にある複合体 IV に競合的または非競合的に結合できる[Cooper, 2008]。いくつかの化合物(一酸化窒素、硫化水素、シアン化水素など)が、複合体 IV 活性を阻害し、電子伝達系によるプロトン駆動力生成を妨げる[Alonso, 2003; Mason,

2006; Torres, 1995; Sarti, 2012; Cooper, 2008]。COX サブユニットをノックアウトすると、COX の活性が阻害され、電子伝達系によるプロトン駆動力生成が阻害されることが示されている[Hüttemann, 2012; Reguera, 2020; Diaz, 2006]。たとえば、マウス皮膚線維芽細胞の COX 10(COX 合成に不可欠な会合因子)をノックアウトすると、複合体 IV の活性が阻害され、その結果複合体 V へのプロトンの伝達が妨げられ、酸化的リン酸化が阻害される[Diaz, 2006]。

複合体 V に結合 → 電子伝達系阻害

複合体 V(F₁F₀ ATP 合成酵素)は、電子伝達系の第 5 のタンパク質複合体である。F₁F₀ ATP 合成酵素は、F₁ および F₀ 機能的ドメインで構成される[Zhao, 2019,]。複合体 V は、電子伝達系で生成されたプロトン駆動力を酸化的リン酸化と共役させ、ADP から ATP を合成する[Demine, 2019]。阻害剤は F₁F₀ ATP 合成酵素の触媒的活性部位で結合すると考えられ、その結果 F₀ の立体構造が変化する[Penefsky, 1985]。F₀ に対する作用は F₁ に伝達され、F₁F₀ ATP 合成酵素への基質結合の阻害につながる[Penefsky, 1985, 82]。オリゴマイシンはよく知られた複合体 V 阻害剤である[Dreier, 2019,]。オリゴマイシンはウシ心臓ミトコンドリアの複合体 V を阻害し[Penefsky, 1985]、ヒト、マウス、およびウシの胚においてミトコンドリア膜電位と酸素消費率を低下させることが示されており、複合体 V 阻害によって電子伝達系活性が損なわれたことが示唆されている[Muller, 2019]。

電子伝達系の阻害 → ミトコンドリアの酸化的リン酸化共役の減少

ミトコンドリアの電子伝達系は 5 つのタン

パク質複合体から成り、電子とプロトンが電子伝達系に沿って移動すると、プロトン駆動力と活性酸素種(ROS)が生成される。その後、プロトン駆動力はミトコンドリアの酸化リン酸化に使用され ATP が生成され、産生された ROS は細胞恒常性に関与する [Nolfi-Donagan, 2020]。たとえば、ミトコンドリア電子伝達系の複合体のいずれかが阻害されると電子リークが生じ、その結果、プロトン駆動力の生成が不十分となり、ROS 産生が増加し、ATP 合成が減少する。これらは酸化リン酸化の脱共役に起因する [Nolfi-Donagan, 2020]。例えば、フェンブコナゾール(ゼブラフィッシュにおける複合体 II および III の阻害剤) [Qin, 2022]、オリゴマイシン(複合体 V 阻害剤)、アンチマイシン A(複合体 III 阻害剤)、レテノン(複合体 I 阻害剤) [Muller, 2019]、アスピリン(複合体 I および IV の阻害剤) [Raza, 2011]などの電子伝達系タンパク質複合体阻害剤は、電子伝達系におけるプロトンの移動を妨げることが示されており、in vitro 曝露研究において、また阻害剤を投与したラットから単離したミトコンドリアで、酸化リン酸化および ATP 産生が低下した。

酸化リン酸化脱共役剤の結合 → ミトコンドリア酸化リン酸化の共役の減少

酸化リン酸化では、電子伝達系で生成された電気化学的電位を利用して ATP の形でエネルギーが産生される [Nolfi-Donagan, 2020]。酸化リン酸化脱共役剤はプロトンフォアとして作用するか親油性イオン対を形成でき、その結果、プロトンは高度に制御されたミトコンドリア内膜を通して移動できる。このプロトン減少によりエネルギーが散逸し、酸化リン酸化の共役と ATP の合成が妨げ

られる [Demine, 2019; Garlid, 1983; Terada, 1990]。ミトコンドリアを酸化リン酸化脱共役剤に曝露したときにこのような事象が認められることが複数の研究で示唆されている [Weisova, 2012; Sibille, 1995]。たとえば、小脳顆粒神経細胞をシアン化 4-(トリフルオロメトキシ)フェニルヒドラゾン (FCCP、既知のミトコンドリア酸化リン酸化脱共役剤) で処理するとミトコンドリア膜電位および ATP 含量が低下し、FCCP を除去すると回復した [Weisova, 2012]。

ミトコンドリア酸化リン酸化共役の減少 → ミトコンドリア機能障害

酸化リン酸化は電子伝達系で生成されたプロトン駆動力の共役に関与し、これにより ADP から ATP が合成される。酸化リン酸化が障害されると、ミトコンドリアの ATP 産生低下、ミトコンドリアの複合体構造の攪乱、酸化ストレスの増加、およびミトコンドリア機能異常が生じる可能性がある [Raffa, 2017]。哺乳動物の胚または卵母細胞(雌の生殖細胞)を酸化リン酸化脱共役剤で処理するか酸化リン酸化に関連する遺伝子を欠失させると、ミトコンドリア機能障害が生じることが示されている。これはミトコンドリア膜電位(MMP)障害、ATP 産生の減少、および酸化ストレスの増大として現れる [Rubattu, 2016; Zhang, 2022; Bestman, 2015]。以下に例を示す。

- 酸化リン酸化脱共役剤 2,4-ジニトロフェノール(DNP)で処理したゼブラフィッシュの胚では、処理 72 時間後、ミトコンドリア機能に必要な遺伝子(ダイナミン関連タンパク質 1(DRP1)関連遺伝子、NADH デヒドロゲナーゼ 5(ND5)関連遺伝子、低酸素誘導因子 1(HIF1A)関連遺伝子など)、

ミトコンドリアDNA損傷修復に必要な遺伝子(8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ (OGG1) 関連遺伝子など)、および酸化ストレスからのミトコンドリアの防御に必要な遺伝子(スーパーオキシドジスムターゼ (SOD2) 関連遺伝子)のダウンレギュレーションが認められた。また、DNP によりミトコンドリア呼吸の減少、ATP 産生の減少、嫌気性呼吸の増加、活性酸素種 (ROS) 産生の減少、ミトコンドリア機能阻害が生じた[Bestman, 2015]。

- ・ トリクロサン(酸化的リン酸化脱共役剤)で処理したラット脳ミトコンドリアでは、酸素消費が増大し、酸化的リン酸化と ATP 合成が減少した[Ajao, 2015]。
- ・ ラット脳から単離したミトコンドリアを酸化的リン酸化脱共役剤であるフルオキセチンで処理すると、酸化的リン酸化と ATP 合成が減少する[Curti, 1999]。
- ・ in vitro で FCCP に曝露したマウス胚では、未処理対照と比較して MMP が用量依存的に低下し ATP 含量が減少した[Zander-Fox, 2015]。
- ・ ペルフルオロオクタン酸(PFOA)を投与したマウスの卵母細胞では、対照と比較した場合、ミトコンドリア機能障害、ROS 濃度上昇、MMP 障害および ATP 合成障害が認められた[Zhang, 2022]。単離したマウスの肝臓および脳のミトコンドリアを PFOA に曝露した場合にも、チトクロム c の増加、ミトコンドリアの膨張を含む同様の所見が報告された[Mashayekhi, 2015]。

ミトコンドリア機能障害 → 胚胎児毒性

ミトコンドリア活性および ATP 含量が最適であることは、正常な初期胚胎児発生に不可欠である [Zhao, 2012; Van Blerkom,

1995; Babayev, 2015]。2015 年のレビュー [Babayev, 2015]にあるように、ミトコンドリア機能障害は流産、卵成熟障害、受精障害および発生障害に関連している。ミトコンドリア機能異常による ATP 含量の低下は、げっ歯類の同腹仔数、出生数および新生仔体重に影響を及ぼすことが報告されている [Salimi, 2019; Takahashi, 2009]。以下に例を示す。

- ・ 受胎 7 日後から 15 日後までペルフルオロオクタン酸(PFOA)を投与したマウスでは、胎仔の一部の器官(肝臓、心臓など)でミトコンドリア機能異常が認められ、複数の器官(前肢指、肝臓、心臓、後肢指、眼など)の形成異常が誘発され、胎仔の体重および体長が減少した [Salimi, 2019]。別の研究者グループは、妊娠マウスに胎生 13 日目から妊娠終了まで PFOA を投与した後に、胎仔のミトコンドリア機能障害(ATP 産生の減少および酸化ストレス)、出生体重異常および発生毒性(胚胎仔の成長低減など)が認められた [Huang, 2022]。
- ・ 雌雄ラットに対し、交尾 14 日前から 40~47 日間、DNP を投与した。雄ラットと雌ラットの両者に器官毒性(肝臓、腎臓など)が認められ、非投与ラットと比較して出生数および出生体重が減少した [Takahashi, Environmental Toxicology, 2009, 24, 74-81]。
- ・ ゼブラフィッシュの胚を DNP で処理するとミトコンドリア機能障害が誘発され、胚の長さおよび生存率が減少し、胚の運動神経細胞軸索および眼の発生が阻害された [Bestman, 2015]。
- ・ ラット胚を FCCP で in vitro 処理し、成体

ラットに移植したところ、雌産仔の出生体重が減少した。また、FCCP で in vitro 処理したマウス胚から出生した雌産仔では、出生体重の減少およびグルコース取り込み障害(胎児毒性につながると考えられる代謝疾患とミトコンドリア機能障害を示す徴候)が認められた[Zander-Fox, 2015]。

- ・フルオキシセチンを投与した妊娠動物の新生仔に心血管形成異常が生じた[Kiryanova, 2013; Hines, 2004]。両論文では、妊娠中にフルオキシセチンを投与した雌のラットおよびマウスからの産仔において、出生後死亡、心血管形成異常、出生体重減少、同腹仔数の減少などの異常が認められた[Kiryanova, 2013; Hines, 2004]。

ミトコンドリア機能障害 → 卵成熟異常

卵母細胞は、健全な初期胚発生を維持するため、成熟中に相当量のエネルギーを(ATPの形で)を必要とすると考えられている。これらの ATP 分子の大部分は、卵母細胞ミトコンドリア内で酸化的リン酸化により産生される[Chappel, 2013; Babayev, 2015]。したがって、受精とその後の発生を支持できる高品質の卵母細胞を成熟させるには効率的なミトコンドリア機能と十分な ATP 含量が存在することが重要である[Podolak, 2022; Chappel, 2013; Roth, 2018; 2015; Van Blerkom, 1995]。いくつかの研究がこのキーイベント間の関係を裏付けている。

- ・人工授精(IVF)を受け妊娠に至った女性から採取した卵母細胞の ATP 含量(2.2 ~ 2.6 pmol)は、妊娠できなかった女性(ATP 含量 1.4 ~ 1.7 pmol)と比較して高かったことから、卵母細胞の成熟と品質な

らびに着床にとってミトコンドリアの ATP 合成が重要であることが示唆される[Van Blerkom, 1995]。

- ・卵成熟の胚胞期を FCCP および DNP に曝露したマウス卵母細胞は減数分裂期 II に進むことができず、試験培地(脱共役剤を含む)を通常の増殖培地と交換すると卵母細胞は発生を再開したが、対照と比較して十分な成熟に至るまでの時間が長かった[Van Blerkom, 1995]。
- ・ペルフルオロオクタン酸(PEOA)を投与したマウスでは、活性酸素種(ROS)の増加、ATP 産生の減少、ミトコンドリア機能および減数分裂過程の変化、ならびに卵成熟および卵胞発生の阻害が認められた[Zhang2022; Huang, 2022]。
- ・PFOA または PFOS に曝露したマウス卵母細胞では、生存率が用量依存的に減少し、ROS 形成が増加し、卵母細胞のミトコンドリア分布が変化した。この曝露はミトコンドリア機能障害および染色体異常なども引き起こした[Guo, 2021; López-Arellano, 2019; Wei, 2021]。
- ・2,6-ジイソプロピルフェノール(酸化的リン酸化脱共役剤)で処理したマウス卵母細胞に、卵成熟減数分裂期の破綻および精子進入の減少が報告された[Tatone, 1998]。
- ・マウス卵母細胞をトリクロカルバン(酸化的リン酸化脱共役剤)で処理すると、ミトコンドリア膜電位の低下、ATP 含量の減少、ミトコンドリア機能障害、および卵母細胞減数分裂障害(卵成熟と卵母細胞の品質を損なわせる)が引き起こされた[Ding, 2020]。

卵成熟異常 → 雌性生殖能の低下

生殖成績にとって卵母細胞の品質が重要であることを示すエビデンスが複数存在する[Orazov, 2019; Babayev, 2015; Santos, 2006]。卵母細胞のATP含量は卵母細胞の品質ならびに生殖能力に影響する[Babayev, 2015; Van Blerkom, 1995]。ミトコンドリア酸化的リン酸化の脱共役剤は卵母細胞のATP含量を低下させるため雌性生殖能に悪影響を及ぼすことが複数の研究で示されている[Van Blerkom, 1995; Zhou, 2022]。以下に例を示す。

- ・人工受精を受けている女性患者に関する調査から、卵母細胞および胚のATP含量およびミトコンドリア活性が十分な患者でのみ受胎と妊娠完了が可能であり、卵母細胞のATP含量が大幅に低い患者は妊娠を保持できなかつたことが示された[Van Blerkom, 1995; Zhao, 2012]。
- ・胚胞期にDNPに曝露したマウス卵母細胞の受精率は、対照卵母細胞と同等であった。しかし、胚盤胞にまで発育したのは、DNPに曝露し受精した卵母細胞では193個中46個であったのに対し、対照卵母細胞では234個中187個であった[Van Blerkom, 1995]。
- ・ミトコンドリア酸化的リン酸化の脱共役剤(PFOAなど)にマウスを曝露した場合、ミトコンドリア機能障害、卵成熟障害、受精阻害、着床および胚発生の阻害につながった[Zhang, 2022]。
- ・酸化的リン酸化に関連するミトコンドリア遺伝子(アデノシン三リン酸合成サブユニット6(ATPアーゼ6)、チトクロムcオキシダーゼIII(CO III)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド-ユビキノ酸化還元酵素サブユニット3(ND3)の関連遺伝子な

ど)の発現が減少すると、卵母細胞が受精しなかつたり胚が不活性となることが人工受精(IVE)を受けている女性で報告されている[Hsieh, 2004]。

ミトコンドリア機能障害 → 精子機能障害

ミトコンドリアの重要な役割は、精細胞に運動性を与え、受精能獲得のために先体反応を促進することである。ミトコンドリアが生成する活性酸素種(ROS)は、精子表面上のシャペロンをリン酸化し、これにより先体反応を促進する[Park, 2021]。ミトコンドリア機能障害はエネルギー産生の減少およびROSの不均衡につながり、そのため精子の機能の中でも特に精子の運動性と受精能獲得が障害されると考えられる。精子には(精子膜中に)高濃度の多価不飽和脂肪酸が含まれることから、ミトコンドリア機能障害に起因するROS不均衡による損傷に対し感受性が高いと思われる[Vertika, 2020]。さらに、ミトコンドリアは雄性生殖能を制御する他の過程、たとえば精子形成、細胞の増殖および細胞死の制御、ならびにステロイド前駆物質の合成にも関与する[Park, 2021; Vertika, 2020]。

多くの男性不妊症例はミトコンドリア機能障害に関連すると考えられており、症例の30~80%はROS関連精子損傷と関連付けられている[Park, 2021]。男性のミトコンドリアDNAの変異は不妊および精子機能障害の徴候(精子無力症など)と関連付けられている[Vertika, 2020]。電子伝達系の阻害または酸化的脱共役によりミトコンドリア機能障害を引き起こす化合物が、精子機能障害および雄性生殖能を障害するという考えは、生物学的に妥当であるが、一方で精子によるATP生成は他の多くの細胞や器官とは異

なり、酸化的リン酸化ではなく解糖を介するという点に留意する必要がある[Park, 2021]。KE 間の関係を裏付けるエビデンスには、以下の様な知見が報告されている。

- ・ ミトコンドリア DNA の変異を有する男性では精子の運動性が低下し不妊となる可能性がある[Amor, 2022; Vertika, 2020]。
- ・ 変異型ミトコンドリア DNA を有するマウスモデル(野生型および変異型ミトコンドリア DNA を有する)は不妊となり、精子の大半でミトコンドリアの障害が生じた[Nakada, 2006; Vertika, 2020]。
- ・ 成人から採取した健康な精子を解糖阻害剤または酸化的リン酸化阻害剤とインキュベートした in vitro 研究では、精子運動性に関する一貫した結果は得られなかった[Irigoyen, 2022]。別個にインキュベートした場合、FCCP は精子の運動性を有意に低下させたが、解糖阻害剤(オキサミン酸ナトリウムおよび 2-デオキシ-D-グルコース)および電子伝達系複合体 III 阻害剤(アンチマイシン A)は精子の運動性を有意に変化させなかった[Irigoyen, 2022]。しかし、アンチマイシン A を解糖阻害剤のいずれかと共にインキュベートした場合、運動性の低下が認められた。オキサミン酸ナトリウムを除き、これらの阻害剤は ATP 産生を阻害した。
- ・ 健康な精子のサンプルを複合体 I 阻害剤ロテノンで処理した in vitro 研究では、精子のミトコンドリア膜電位差が低下した。しかし、精子運動性の低下は解糖も同時に遮断した場合にのみ認められた[Barbonetti, 2010]。
- ・ シアン化物は電子伝達系の複合体 IV を阻害することでミトコンドリア機能障害を引

き起こす[Nourani, 2021]。シアン化ナトリウムを投与した雄マウスでは精子機能が障害され、精子の運動性と生存率が有意に低下した[Nourani, 2021]。また、対照群と比較して脂質過酸化が増大し(ROS 過剰の徴候)、生殖能力が低下した。ピルビン酸エチルをシアン化ナトリウムと共に投与すると、この作用が軽減された。

- ・ 1,2-ジブプロモエタンの職業曝露を 5 年間受けた人では、対照群と比較して精子の運動性、生存率および精子数が低下し、精子形態異常が認められた[Rarcliffe, 1987]。

精子機能障害 → 雄性生殖能の低下

精子機能障害の徴候には精子運動性の障害が含まれ、運動性障害はヒトの男性不妊と関連する[Schoenwolf, 2020,]。

精巢毒性についての AOP ネットワークを用いたスクリーニング

Lhasa の DART AOP ネットワークの作成は、催奇性および胎児致死性に基づく有害事象を優先して作成しているが、このネットワーク内にある MIE/KE の一部は生殖能ベースの有害事象にも関連する可能性がある。この仮説を検証するために、昨年度のデータセットに含まれる 1499 の化合物に関する 1911 の精巢毒性研究の化合物情報について既存の AOP ネットワークによるスクリーニングを以下の手順で実施した。

- データのキュレーション(陽性物質の抽出)を行う。
- 提供されたデータセットに含まれる精巢毒性物質について、AOP ネットワーク内の MIE および KE に関連する既存の陽性アッセイデータを特定

- AOP ネットワークにリンクされている Derek Nexus アラートのヒットする化合物を特定
 - 類似性検索を実施して、推測リンクを決定する。
- ・提供された精巢毒性データセットは、HESS、ToxRef、COSMOS、RepDose および FSCJ から得られたもので、1499 の化合物に関する 1911 のデータで構成されていた。データセットには 146 の陽性結果と 1765 の陰性結果が含まれる。Konstanz Information Miner (KNIME) バージョン 4.5.2 および Lhasa 社内で生成した KNIME ノードを用いて構造確認と文脈化を行った後に、保守的アプローチを用いて陽性を決定した結果、1471 の化合物 (陽性 126、陰性 1345) のデータセットとなった。これ以降はこのデータセットに含まれる 126 の精巢毒性物質を中心に解析を行った。
- ・この精巢毒性陽性であった 126 の化合物について DART AOP ネットワークによるスクリーニングを実施し、ネットワークにリンクされたアッセイデータのうちデータセットに含まれる精巢毒性物質に関するものを特定した。この検索では、類似度閾値を 100% として完全一致で行った。その結果、陽性の MIE アッセイデータが特定されたのは 126 の精巢毒性物質のうち 17 の物質であった (表 1)。この結果は、Lhasa DART AOP ネットワーク内の 14 の MIE に関連するものであった (表 1)。これらの MIE は DART AOP ネットワーク内の 8 つの AOP に渡って分布している (表 2)。最も多く予測された MIE は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害およびムスカリン性アセチルコリン受容体結合であり、次いでエストロゲン受容体結合、プレグナン X 受容体結合および甲状腺ホルモン受容体結合であった。3 つの例では、1 つの

化合物について 2 つの MIE が陽性であった。これらの MIE は、ムスカリン性アセチルコリン受容体結合とヒストン脱アセチル化酵素阻害、アンドロゲン受容体結合とグルココルチコイド受容体結合、ならびにエストロゲン受容体結合とプレグナン X 受容体結合であった。

ハーシュバーガーアッセイおよび子宮肥大アッセイは、それぞれ AOP「雄性生殖器官形成異常につながるアンドロゲン受容体 (AR) 結合」および AOP「雄性生殖器官形成異常につながるエストロゲン受容体 (ER) 結合」のキーイベント (KE) アッセイである。ハーシュバーガーアッセイおよび子宮肥大アッセイでは、それぞれ 3 つの化合物で陽性データが得られた (表 1)。これらの化合物のうち、1 つの活性化合物は子宮肥大アッセイおよび対応する MIE アッセイ (エストロゲン受容体結合アッセイ) で陽性であった (表 1)。ハーシュバーガーアッセイと子宮肥大アッセイの両者では、1 つの化合物が陽性であったことから、この化合物は「雄性生殖器官形成異常につながるアンドロゲン受容体 (AR) 結合」および「雄性生殖器官形成異常につながるエストロゲン受容体 (ER) 結合」の 2 つの AOP に関連すると考えられる。

・AOP ネットワークに関連すると特定された Derek Nexus アラートは、最近キュレーションされ、関連する KE と関連付けられています。これらのアラートは、関連するアッセイデータが不足している可能性のあるネットワークの領域を補い、DART AOP ネットワークの化学空間の範囲を強化する可能性があります。そのため、提供されたデータセットの精巢毒性物質に対してこれらのアラートがどのように実行されたかの分析が行われました。これらの化合物は、Derek Nexus (一般に公開されているマスターの知識ベースと、ステロイドに関連する受容

体と酵素に関するアラートを含む独自の知識ベースを使用して)を通じて処理されました。精巣毒性に陽性の合計 25 の化合物は、DART AOP ネットワークに関連する 14 のアラートに関連していました(表 3)。これらのアラートは、5 つの異なる KE に関連付けられていました。25 の陽性化合物のうち、22 の化合物は Derek Nexus Master 知識ベースで 12 のアラートを発し、これらはすべて「男性生殖毒性につながるグルタチオン (GSH) 減少」の AOP 内の KE に関連付けられていました。「男性生殖毒性につながるグルタチオン (GSH) 減少」は以前の共同研究で開発されている。精巣毒性に陽性の残りの 3 つの化合物は、カスタム Derek Nexus ナレッジベースで 2 つの DART 関連の警告を発した。2 つの警告は、「男性生殖器奇形につながるアンドロゲン受容体 (AR) の結合」と「男性生殖器奇形につながるエストロゲン受容体 (ER) の結合」という AOP 内の KE を予測した。Derek Nexus の警告に基づいて、グルタチオン (GSH) の減少が最も予測される KE として強調され、次いで精巣毒性であった(表 3)。グルタチオン (GSH) の減少と精巣毒性は、DART AOP ネットワークにおける雄性生殖毒性に関連する 2 つの AOP のうちの 1 つである「雄性生殖毒性につながるグルタチオン (GSH) の減少」AOP 内の KE である。強調された他の KE には、2 つの化合物で予測されたエストロゲン受容体結合と催奇形性、および 1 つの化合物で予測されたアンドロゲン受容体結合が含まれる。総合すると、AOP ネットワークにリンクされた Derek Nexus アラートは、3 つの AOP に存在する 5 つの KE を予測した。

AOP ネットワークに関連付けられたデータは、類似性方法論に基づいて、毒性の考えられる

メカニズムについて予測するために利用できることを実証した。これは、毒性物質に関する正確なデータが入手できない場合に、作用機序を特定するのに役立つ可能性がある。この特定の例では、類似性検索方法論を適用することと、提供された精巣毒性物質に関連する可能性のある MIE/KE を予測しようとするものの両方は、あまり信頼できない可能性がある。しかし、類似性方法論は、精巣毒性物質の正確なデータがすでに特定されている場合に、関連する MIE/KE のデータを特定するのに役立つ可能性がある。例えば、図 1 のアッセイに関連する類似化合物のデータは、図 1 の MIE に結合する化合物が精巣毒性を引き起こす可能性があるという主張をさらに裏付ける可能性がある。そのため、CERES 2 Tanimoto の方法論と 80%の類似性閾値を利用して、DART AOP ネットワーク内の MIE および KE に対して精巣毒性物質をスクリーニングした。表 5 に示すように、すでに特定されている各アッセイについて、さらにいくつかの化合物が特定されたが、これは MIE/KE と精巣毒性との関連性を過剰に強いものにする可能性がある。当然の結果として、これまで未確認だった他の MIE も予測された。これらは、今後の調査対象の候補となる可能性がある。

D. 考察

AOP ネットワークを開発するために用いたエビデンスは、主にヒトの垂集団研究、げっ歯類やゼブラフィッシュを用いた研究および in vitro 研究が用いられている。たとえば、DNP や FCCP などの酸化的リン酸化脱共役剤を投与した場合のラットのミトコンドリア機能異常、マウスの新生仔体重の減少。ゼブラフィッシュへの DNP の投与の結果におけるミトコ

ンドリア機能障害による新生稚魚の体重および生存率低下、器官の発生異常。ヒトにおけるペルフルオロアルキル化合物血中濃度とミトコンドリア機能障害および胎児毒性との関連事象。in vitro で PFOA に曝露したマウス胚における胎児発生時間依存的な減少および減数分裂過程の異常、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害および同腹仔数減少。PFOA による雌マウスの卵胞形成異常、卵成熟不全および卵母細胞発生中の減数分裂阻害、雄性不妊とミトコンドリア機能障害などから得られている。

しかし、ミトコンドリアの機能は多様であるため、この AOP にはいくつかの不確実な要素が存在する。この AOP ネットワークでは、ミトコンドリア機能障害および発生生殖毒性につながる複数の分子開始イベント(MIE)を考慮したが、大半の研究では、細胞内 ATP 含量に寄与する可能性がある解糖や TCA サイクルなど他の ATP 生成経路は考慮されていなかった。ミトコンドリアの機能はヒトの複数の生物学的過程に関与していることから、ミトコンドリア機能障害がこの AOP ネットワークで特定された他のストレス要因によって発生毒性を誘発する可能性がある。たとえば、芳香族ニトロ化合物はグルタチオンと直接反応し、グルタチオンの減少および酸化ストレスをもたらす可能性がある [Kovacic, 2014]。ペルフルオロアルキル化合物はいくつかの重要な生物学的経路(ペルオキシソーム増殖剤受容体 α (PPAR α) 経路、構成的アンドロスタン受容体(CAR)経路、プレグナン X 受容体(PXR)経路など)と相互作用することが示されている [Karatekin, 2022]。したがって、観察された DART にはミトコンドリア毒性以外の生物学

的経路が寄与している可能性がある。

一方、DART AOP ネットワーク内の KE とデータセットに含まれる精巣毒性物質との間に関連があることが示された。最終的には、精巣毒性物質の AOP ネットワークに関連する陽性データから、22 の精巣毒性陽性化合物と関連する 14 の MIE、2 つの KE および 8 の AOP が特定された。また、AOP ネットワークにリンクされた Derek Nexus アラートを調べた結果、25 の陽性化合物について 3 つの AOP が予測された。その中には、以前の共同研究で開発した「雄性生殖毒性につながるグルタチオン減少」という AOP との関連性が示され、過去の研究が DART AOP ネットワークの性能を改善していたことを確認できた。さらに類似性検索法および類似度閾値 80%によるスクリーニングにより拡大された関係の多くは正確なデータに基づくものではないため、相関の信頼性は低くなるが、特定された経路は今後の開発につながる可能性がある。

今年度の研究では、アッセイデータから特定される精巣毒性物質と Derek Nexus アラートで特定される精巣毒性物質が異なる場合には、化合物を AOP ネットワークに関連付けるために補完的な方法を使用できるという利点も明らかになった。さらに調査を進め、AOP ネットワーク内に関連の他の MIE と「精巣毒性」という有害事象とのリンクを作成することも可能であると考えられる。さらに、それらの標的の調査を進め、各標的に基づいて十分な裏付けがある AOP を開発することも考えられる。

<参考文献>

Ajao, Toxicology Reports, 2015, 2, 624-637.

- Alonso, *Pharmacology and Toxicology*, 2003, 93, 142–146.
- Amor, *Genes (Basel)*, 2022, 13, 1182; Vertika, *Mitochondria*, 2020, 54, 26-40.
- Babayev, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 2015, 27, 175-181.
- Barbonetti, *Endocrinology*, 2010, 151, 5882-5892.
- Bestman, *Differentiation*, 2015, 89, 51-69.
- Chappel, *Obstetrics and Gynecology International*, 2013, 2013, 183024.
- Cooper, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2008, 40, 533-539.
- Curti, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1999, 199, 103-109.
- Demine, *Cells* 2019, 8, 795.
- Ding, *Environmental Pollution*, 2020, 262, 114271.
- Dreier, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2019, 38, 1625-1634.
- Garlid, *The Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258, 7974-7980.
- Guo, *Birth Defects Research*, 2021, 113, 1074–1083;
- Heinz, *Scientific Reports*, 2017, 7, 45465.
- Hines, *Birth Defects Research (Part B)*, 2004, 71, 193-280.
- Hsieh, *Fertility and Sterility*, 2004, 81 (S1), 912-918.
- Huang, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236, 113467.
- Irigoyen, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10, 1-18.
- Kiryanova, *Developmental Neuroscience*, 2013, 35, 437-449.
- López-Arellano, *Environmental Toxicology*, 2019, 24, 92-98.
- Mashayekhi, *Human and Experimental Toxicology*, 2015, 34, 985-996.
- Mason, *PNAS*, 2006, 103, 708-713
- Miyadera, *PNAS*, 2003, 100, 2, 473-477.
- Muller, *Scientific Reports*, 2019, 9, 16778.
- Nakada, *PNAS*, 2006, 103, 15148-15153.
- Nolfi-Donagan, *Redox Biology*, 2020, 37, 101674.
- Nourani, *Archives of Rezi Institute*, 2021, 76, 323-333.
- Orazov, *Gynecological Endocrinology*, 2019, 35(S1), 24-26.
- Park, *Antioxidants*, 2021, 10, 98 .
- Penefsky, *PNAS*, 1985, 82, 1589-1593.
- Podolak, *Cells*, 2022, 11, 797.
- Qin, *Toxicology*, 2022, 470, 153137.
- Quinlan, *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286, 31361-31372.
- Ramalho-Santos, *Human Reproduction Update*, 2009, 15, 553-572.
- Rarcliffe, *British Journal of Industrial Medicine*, 1987, 44, 317-326.
- Raza, *European Journal of Pharmacology*, 2011, 668, 15-24.
- Rodríguez-Nuevo, *Nature*, 2022, 607, 756-561.
- Roth, *Journal of Dairy Science*, 2018, 101, 3642-3654.
- Salimi, *Environmental Toxicology*, 2019, 34, 878-885,
- Santos, *Fertility and sterility*, 2006, 85, 584-591.
- Sarti, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1817, 610-619.
- Schoenwolf, *Larsen's Human Embryology*, 2020, sixth edition, 13-40.
- Sibille, *European Journal of Biochemistry*, 1995, 231, 498-502.
- Siebels, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2013, 1827, 1156-1164.
- Takahashi, *Environmental Toxicology*, 2009, 24, 74-81.
- Tatone, *Human Reproduction Reported*, 1998, 13, 430-435.
- Terada, *Environmental Health Perspectives*, 1990, 87, 213-218.
- Torres, *Biochemical Journal*, 1995, 312, 169-173.
- Van Blerkom, *Human Reproduction*, 1995, 10(2), 415-424.
- Vertika, *Mitochondria*, 2020, 54, 26-40.
- Von Jagow, *FEBS Letters*, 1981, 136, 19-24.
- Wallace, *Toxicol Lett*, 2013, 222, 257–264.
- Wei, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 225, 112807.
- Weisova, *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 2012, 1817, 744-753.
- Wikström, *Scientific Reports*, 2021, 11, 3568.

Liew, *Environmental Health Perspectives*, 2020, 128, 47007.
Zander-Fox, *Biology of Reproduction*, 2015, 92, 124.
Zhang, *Environmental Toxicology*, 2022, 37, 2965-2976.
Zhao, *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 44, 3-15.
Zhao, *The Journal of International Medical Research*, 2012, 40, 734-739.
Zhou, *Environment International*, 2022, 167, 107413.

E. 結論

令和 5 年度は、昨年度の ECHA の REACH に登録されているデータセットを用いた調査で新たな AOP の有力候補のひとつとなったミトコンドリア毒性について AOP の可能性調査を行った。その結果、雄性生殖毒性、雌性生殖毒性および胚胎児毒性につながるミトコンドリア機能障害に関係する 6 つの MIE を含む AOP ネットワークの可能性が示された。また、昨年度のデータセットに含まれていた精巣毒性研究の情報について既存の DART AOP ネットワークによるスクリーニングを実施した。その結果、陽性の MIE アッセイデータが特定されたのは 126 の精巣毒性物質のうち 22 の物質で AOP ネットワーク内の 14 の MIE と 2 の KE に関連しており、DART AOP ネットワーク内の 8 つの AOP に含まれていることが示された。また、AOP ネットワークにリンクされた Derek Nexus アラートを調べた結果、25 の陽性化合物について 3 つの AOP が予測された。本研究では、アッセイデータから特定される精巣毒性物質と Derek Nexus アラートで特定される精巣毒性物質が異なる場合には、化合物を AOP ネットワークに関連付けるために補完的な方法を使用できるという利点も明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Myden A, Stalford SA, Fowkes A, White E, Hirose A, Yamada T. Enhancing developmental and reproductive toxicity knowledge: A new AOP stemming from glutathione depletion. *Curr Res Toxicol*. 2023 Sep 15;5:100124. doi: 10.1016/j.crttox.2023.100124.

Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Shigeta Y, Iso T, Umamo T, Hirose A. Derivation of subacute guidance values for chemical contaminants of drinking water quality standard in Japan. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2023 Jun;141:105401. doi: 10.1016/j.yrtph.2023.105401.

Murata Y, Natsume M, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M. In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes Environ*. 2023 Apr 11;45(1):12. doi: 10.1186/s41021-023-00270-9.

2. 学会発表

広瀬明彦：ペル及びポリフルオロ化合物 (PFAS) の環境曝露によるリスク評価の現状と課題、第 50 回日本毒理学学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

広瀬明彦：Extractables と Leachables の毒性評価の考え方、第 50 回日本毒理学学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

村田康允、重田善之、磯貴子、馬野高昭、広瀬望、長谷川彩由香、堀端克

良、杉山圭一、広瀬明彦、増村健一、松本真理子：トランスジェニックマウスを用いた tert-ブチルヒドロペルオキシドの遺伝子突然変異試験、第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

Yamada T, Ohata H, Furuhashi A, Sugiyama K, Honma M, Segawa K, Saito Y, Aisaki K, Kitajima S, Hirose A, Masumura K : Development of an Artificial Intelligence (AI)-based Safety Prediction Platform to Support Regulatory Chemical Risk Assessment, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

Iso T, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Shigeta Y, Hasegawa S, Horibata K, Mutsuga M, Sugiyama K, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M. ; Evaluation of the in vivo mutagenicity of azodicarbonamide, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

Akahori Y., Ishida K., Ohno F., Hirose A.: Possibility for Liver Toxicity Evaluation by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using Key Event-Specific Gene Sets Applying Gene Expression Data Obtained in Rat Primary Hepatocytes, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

Hayashi T, Kotaki A, Fukushima A, Kawamura T, Katsutani N, Yamada T, Hirose A.: Development of modifying factor for exposure route extrapolation from oral TTC to parenteral TTC, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

Murata Y, Matsumoto M, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Horibata K, Sugiyama K, Inoue K, Hirose A, Masumura K : *In vivo* mutagenicity assessment and derivation of oral and inhalation hazard assessment values of styrene, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Hirose A : Derivation of a target value of acrylic acid in drinking water, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

Hirose A, Shigeta Y., Kawamura T., Inoue K., Matsumoto M : Comparison of BMDL calculation performance by the recently developed Bayesian BMD calculation tools using quantal datasets of animal toxicity studies, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

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

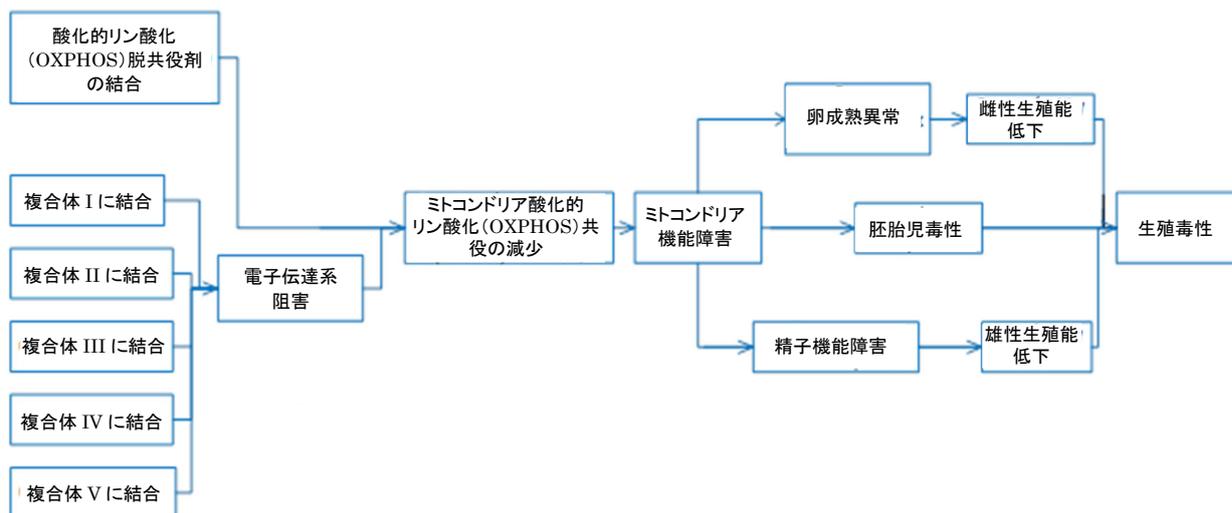
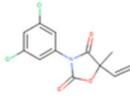
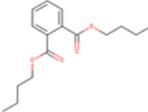
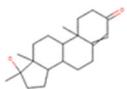
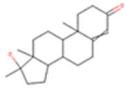
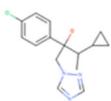
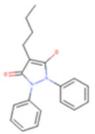
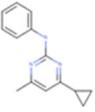
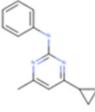
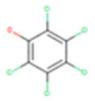


図 1. ミトコンドリア毒性による生殖毒性 AOP ネットワークのイメージ図

表 1 精巣毒性物質に関連する、DART AOP ネットワーク内に含まれる陽性アッセイデータの概要。

AOPs	MIE	Key Events	Structure
1 Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations		Hershberger assay (antagonist mode)	
2 Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations	Oestrogen receptor (ER) binding assay	Uterotrophic assay	
3 Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations		Hershberger assay (antagonist mode)	
4 Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations		Uterotrophic assay	
5 Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations		Hershberger assay (antagonist mode)	

6	Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations		Uterotrophic assay	
7	Thyroid hormone signalling disruption leading to neuro-developmental toxicity	Thyroid hormone receptor (TR) binding assay		
8	Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations	Androgen receptor (AR) binding assay		
9	Glucocorticoid receptor (GR) binding leading to cleft palate	Glucocorticoid receptor (GR) binding assay		
10	Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Muscarinic acetylcholine receptor binding assay		
11	Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Muscarinic acetylcholine receptor binding assay		
12	Thyroid hormone signalling disruption leading to neurodevelopmental toxicity	Pregnane X receptor (PXR) binding assay		
13	Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Muscarinic acetylcholine receptor binding assay		
14	Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	Histone Deacetylase (HDAC) inhibition assay		
15	Carbonic anhydrase (CA) inhibition leading to teratogenicity	Carbonic anhydrase (CA) inhibition assay		
16	Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding leading to developmental toxicity	Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding assay		

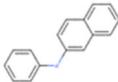
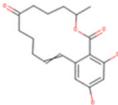
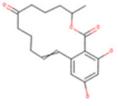
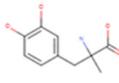
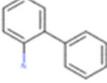
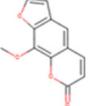
17	Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	Histone Deacetylase (HDAC) inhibition assay	
18	Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations	Oestrogen receptor (ER) binding assay	
19	Thyroid hormone signalling disruption leading to neuro-developmental toxicity	Pregnane X receptor (PXR) binding assay	
20	Thyroid hormone signalling disruption leading to neuro-developmental toxicity	Thyroid hormone receptor (TR) binding assay	
21	Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	Histone Deacetylase (HDAC) inhibition assay	
22	Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Acetylcholinesterase (ACHE) inhibition assay	

表 2. 精巢毒性物質に関連する MIE/KE データが陽性である、DART AOP ネットワーク内の AOP。

AOP	Number of positive compounds
Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	4
Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations	4
Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding leading to developmental toxicity	1
Carbonic anhydrase (CA) inhibition leading to teratogenicity	1
Glucocorticoid receptor (GR) binding leading to cleft palate	1
Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	3
Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations	4
Thyroid hormone signalling disruption leading to neurodevelopmental toxicity	4

表 3. データセットの精巢毒性物質によって活性化された Derek Nexus アラートの概要。

Derek Alert Name	Derek Alert ID	Key Event Name	Number of Compounds	AOP
2-Aminopyrimidine	821	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
2-Halopyridine	802	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
4-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)benzotrile or analogue	847	Androgen receptor (AR) binding	1	Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations
Arsenic compound	559	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
Ethylene- or propylene-urea	Rapid Prototype 163	Testicular toxicity	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
Halobenzene	557	Glutathione (GSH) decrease	4	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
Monothioglycol or glycol monoalkyl ether, alkoxy- or alkylthio-carboxylic acid or precursors	067	Testicular toxicity	4	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
Oestradiol or analogue	767	Oestrogen receptor (ER) binding, Teratogenicity	2	Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations
Organic peroxide	649	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
Phenoxyacetic acid or derivative	690	Glutathione (GSH) decrease	4	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
Phenylethylamine or derivative	684	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
Phthalate mono- or di-ester	637	Testicular toxicity	4	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
para-Alkylphenol or derivative	666	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
para-Aminophenol or derivative	619	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity

表 4. AOP ネットワーク内の KE に関連する Derek アラートを持つ精巢毒性物質の数。

AOP	Number of positive compounds
Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	4
Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations	4
Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding leading to developmental toxicity	1
Carbonic anhydrase (CA) inhibition leading to teratogenicity	1
Glucocorticoid receptor (GR) binding leading to cleft palate	1
Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	3

表 5. DART AOP ネットワークにリンクされた MIE データ陽性物質に類似した化合物の数。

AOP	Key Event Name	Number of Compounds
Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Acetylcholinesterase (ACHE) inhibition assay	3
Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations	Androgen receptor (AR) binding assay	6
Aromatase (CYP19) inhibition leading to teratogenicity	Aromatase (CYP19) inhibition assay	4
Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding leading to developmental toxicity	Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding assay	3
Carbonic anhydrase (CA) inhibition leading to teratogenicity	Carbonic anhydrase (CA) inhibition assay	5
Glucocorticoid receptor (GR) binding leading to cleft palate	Glucocorticoid receptor (GR) binding assay	3
Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	Histone Deacetylase (HDAC) inhibition assay	10
Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Muscarinic acetylcholine receptor binding assay	5
Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations	Oestrogen receptor (ER) binding assay	5
Opioid receptor (OPR) binding leading to developmental toxicity	Opioid receptor binding assay	1
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) binding leading to male reproductive organ malformations	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) binding assay	1
Thyroid hormone signalling disruption leading to neurodevelopmental toxicity	Pregnane X receptor (PXR) binding assay	4

Retinoic acid signalling modulation leading to teratogenicity	Retinoic acid receptor (RAR) binding assay	1
Serotonin transporter inhibition leading to embryo-foetal toxicity	Serotonin transporter (SERT) inhibition assay	1
Thyroid hormone signalling disruption leading to neurodevelopmental toxicity	Thyroid hormone receptor (TR) binding assay	3

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5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	室長
研究協力者	吉田喜久雄	国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部	
研究協力者	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、経口摂取後の化学物質のトキシコキネティクスを推定する汎用的なマウス PBK モデルを構築し、既報の実験データとの比較で検証を行った。並行して、腸管吸収と代謝クリアランスに係るモデル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およびマウス肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験を実施し、試験の妥当性を評価した。さらに、*in vitro* および *in silico* 手法で決定したモデルパラメータ値を用いて、4- α -Cumylphenol (4-CP) について *in vitro* アッセイ濃度から *in vivo* 経口等価用量 (OED) への換算係数を構築したモデルで求め、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 値を OED に外挿した。算出した OED 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。以上を踏まえて本年度は、構築した汎用マウス PBK について汎用性の拡大を図ることとし、既存研究に関する調査結果に基づいて、対象生物種をラットおよびヒトに拡大し、構築したそれぞれの種のモデルを既報の実験データとの比較で検証した。並行して、昨年度に検討できなかった物質についてモデルパラメータ取得のため、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および肝臓 S9 画分を用いた *in vitro* 代謝安定性試験を継続した。さらに、*in vitro* 代謝安定性試験を実施した 6 物質の中の 4-CP, 4-Hydroxybiphenyl (HB), 2-Cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester (CE2), 1,1,1-tris(4-hydroxyphenyl)-ethane (THE) の 4 物質を対象に、既報の ER アゴニスト経路に関連する 14 の *in vitro* アッセイ結果から IVIVE でマウスの OED 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が可能な物質について比較を行い、内分泌かく乱影響評価への IVIVE の適用性を検討した。その結果、子宮肥大試験のエストロゲン様作用陽性物質 (4-CP, THE) および 陰性物質 (CE2) の OED と子宮肥大試験の NOAEL は概ね一致していた。しかし、陰性物質である 4-HB については OED が陽性判定に相当する数値を示した。

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、トキシコキネティクス (TK) やトキシコダイナミクス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、PBKモデルによる*in vitro*アッセイ試験液中遊離態濃度と等価な*in vivo*血中濃度および投与量の関係の推定、さらに経口等価用量(OED)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、IVIVEに適用する汎用的なマウスPBKモデルを構築し、既報の実験データとの比較で検証を行った。さらに、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、これらの試験や*in silico*手法で得たパラメータ値を用いて、ERアゴニスト活性に関する4-*alpha*-cumylphenol *in vitro*アッセイの濃度を等価な*in vivo*経口用量に外挿するための換算係数を構築したマウスモデルで算出した。この係数を用いて、等価な経口用量を算出し、マウスの子宮肥大試験結果と比較し、*in vitro*アッセイデータのIVIVEは有用であることを確認した。そして、本年度は、1) 昨年度に構築したマウスPBKモデルの汎用性向上に関する検討、2) 昨年度に未検討の

物質のモデルパラメータ取得のための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および肝臓S9画分を用いた*in vitro*代謝安定性試験の継続、3) 複数物質に対するERアゴニスト経路に関連する14の*in vitro*アッセイでの影響濃度からマウスOEDへの外挿とマウスの子宮肥大試験結果との比較に基づく内分泌かく乱影響評価へのIVIVEの適用性の検討の各項目を実施した。

B. 研究方法

本年度は、昨年度に引き続きIVIVE関連の既存研究について調査を行い、その結果を参考にして、昨年度に構築・検証したマウスPBKモデルをIVIVEにおいてより汎用性があるモデルにするための検討を行った。また、Caco-2細胞を用いた細胞膜透過性試験および肝臓S9画分を用いた*in vitro*代謝安定性試験も引き続き実施し、昨年度に検討できなかった物質についてCaco-2膜透過係数(Papp)およびS9蛋白質ベースの*in vitro*クリアランスの値を得た。さらに、4物質について、*in vitro*代謝安定性試験や既報値、*in silico*法で得られたパラメータ値を用いてPBKモデルでERアゴニスト経路に関連する14の*in vitro*アッセイのACC(有意な影響が見られる最小濃度)およびAC₅₀(50%影響濃度)値を*in vivo*のマウスOEDに外挿し、可能な場合はマウスの子宮肥大試験結果と比較し、内分泌かく乱影響評価へのIVIVEの適用性を評価した。

B.1. マウスPBKモデルの汎用性向上

IVIVEに関する既存研究を調査し、IVIVEで使用される汎用的なPBKモデルについて、モデルの基本構造(構成コンパー

トメント, 考慮するADMEプロセス), 対象生物種, モデルへの入力パラメータ, 結果の出力, そしてプログラミング言語の面から特徴を解析した。

得られた解析結果を参考に昨年度構築したマウスPBKモデル(血液, 脂肪, 高血流組織, 低血流組織, 腎臓, 肝臓の6コンパートメントで構成; 消化管からの吸収, 組織への分配, 肝クリアランスおよび腎クリアランスによる代謝・排泄を考慮; R言語で構築)の汎用性向上について検討した。その際, マウスモデルの基本構造は保持し, 汎用性拡大に必要な数式およびパラメータ値をモデル内に追加で組み込むこととした。さらに, 上記の検討により新たに構築したモデルについて, 既報の実験データを用いて, 検証を行った。

B.2. *in vitro*試験によるPBKモデルパラメータ値の整備

昨年度に引き続き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, 昨年度対象とした12物質(表1)のうち昨年検討できた4- α -Cumylphenol (4-CP)を除く11物質(ERアゴニスト活性に関する既報の*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, *In vitro*アッセイとしてERレポータージェンアッセイのアゴニスト活性評価系に相当するTox21_ERa_BLA_Agonist_ratio およ

びTox21_ERa_LUC_VM7_Agonist)とした。

- 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7物質(Daidzein (D), Dicumyl peroxide (DP), 4-hydroxybiphenyl (4-HB), phenolphthalein (PP), 2-cyano-3,3'-diphenylacrylic acid ethyl ester (CE2), nordihydroguaiaretic acid (Nor), 1,1,1-tris(4-hydroxyphenyl)-ethane (THE)およ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: antipyrine (AP) (CAS 60-80-0), 透過性中: furosemide (F) (CAS 54-31-9), 透過性低: chlorothiazide (C) (CAS 58-94-6))の計10物質とした。

Caco-2単層膜は理化学研究所BioResource Research Center細胞材料開発室より購入した細胞(RCB0988)を用いて作成した。単細胞膜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300 Ω 以上のチャンバーを実験に用いた。細胞膜透過性試験に先立ち, LC/MS測定およびHPLC測定のための測定条件プロトコル作成, 難水溶性のため前年度10 μ M溶液が作成できなかった物質について, 既存の論文で良好な結果の得られているTween80等の界面活性剤の使用を検討し, 5% Tween80で10 μ M溶液を作成が可能との結果が得られた。しかし, 単細胞膜の健全性の指標であるTEERが300 Ω を下回る例が多くみられたため界面活性剤の使用は不適と判断した。次に溶液調整方法を検討し急激にDMSO濃度を低下させず, DMSO最終濃度を従来の0.1%から1%とすることで10 μ M溶液を作成可能となった。細胞膜透過性試験は, 10物質(指標物質3物質, 被検物質7物質)について実施した。このうち, サンプル中に当該物質が認められなかったDPおよびCE2, 添加

サンプル中および apical 側サンプルには当該物質が認められたが basal 側サンプル中に認められなかった Nor を除く 7 物質について化合物濃度を LC/MS/MS 装置あるいは HPLC 装置にて測定して透過係数 (Papp) (cm/sec) を算出した。

・マウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験

被験物質 5 物質 (4-HB, PP, CE2, Nor, THE) については、前年度に確定した評価実施用プロトコルを用いてマウス肝臓 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。被験物質の残存量は LC/MS/MS 装置を用いて測定した。なお、陽性対照物質 7EC は昨年度の測定データを用いた。

消失速度定数 (ke)、*in vitro* 代謝クリアランス CL_{int} ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ -蛋白質)、 $t_{1/2}$ 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} とは、下記の式により算出した。

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

$$t_{1/2} = 0.693/ke$$

B.3. IVIVE の試行

B.2. に記した *in vitro* 代謝安定性試験を実施した 5 物質の中の 4-HB, CE2, THE および昨年度にデータの得られた 4-CP の 4 物質を対象に ER アゴニスト経路に関連する既報の 14 の *in vitro* アッセイの結果からマウス PBK モデルを用いた IVIVE で OED

を推定し、国衛研保有のマウスの子宮肥大試験結果との比較が可能な物質について比較を行い、内分泌かく乱影響評価への IVIVE 適用性を評価した。

化学物質に特異的な 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、肝臓の各組織/血液分配係数はオクタノール/水分配係数 ($\log Kow$) を基に DeJongh et al., (1997) の式で推定し、消化管からの化学物質の吸収速度定数は、Papp から算出した。その際、4-CP と 4-HB については、Kamiya et al., (2020) による文献値を、CE2 と THE については、PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) から得たトポロジカル極性表面積を基に Punt et al., (2021) に従って Papp を計算し、使用した。肝クリアランスは、B.2. に記した *in vitro* で測定した S9 蛋白質でのクリアランスから算出した。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。

各物質に特異的なこれらの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 3 日間連続投与時の血漿中非結合態のピーク濃度を推計し、OED への外挿に用いる換算係数を求めた。

IVIVE の対象とするエストロゲン受容体 (ER) アゴニスト経路に関連する *in vitro* アッセイデータは、米国 National Toxicology Program (NTP) の Integrated Chemical Environment (ICE) (<https://ice.ntp.niehs.nih.gov/>) から、以下の 14 の ER 経路アッセイのデータを選択した。

- ① NVS_NR_bER
- ② NVS_NR_hER

- ③ NVS_NR_mERa
- ④ OT_ER_ERaERa_0480
- ⑤ OT_ER_ERaERa_1440
- ⑥ OT_ER_ERaERb_0480
- ⑦ OT_ER_ERaERb_1440
- ⑧ OT_ER_ERbERb_0480
- ⑨ OT_ER_ERbERb_1440
- ⑩ OT_ERa_EREGFP_0120
- ⑪ OT_ERa_EREGFP_0480
- ⑫ ATG_ERE_CIS_up
- ⑬ ATG_ERa_TRANS_up
- ⑭ TOX21_ERa_BLA_Agonist_ratio

上記のER経路アッセイの①～③はER結合アッセイ、④～⑨はER二量体の形成等を測定する蛋白質相補性アッセイ、⑩と⑪は転写因子とDNAの相互作用を測定するアッセイ、⑫と⑬はRNA転写レベルを測定するレポーター遺伝子アッセイ、そして⑭はレポーター蛋白質レベルを測定するアッセイである。これらのアッセイでACC (μM) およびAC₅₀ (μM) 値が報告されている場合、換算係数を用いてマウスのOED(mg/kg/日)を算出し、さらに、可能な場合、マウスでの子宮肥大試験の結果と比較し、IVIVEの適用性を評価した。

(倫理面への配慮) 本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C.1. マウスPBKモデルの汎用性向上

既存研究の調査から、IVIVEは、1) 外挿されたOEDとヒト曝露量の比(生物活性/曝露比, BER) から追加試験が必要な物質をリスクベースで優先順位付けをする「Nontargeted IVIVE」と2) 特定の有害影響を生じる*in vivo*用量の定量的な予測のため

同じAOPのMolecular initiating event (MIE) やKey event (KE) に対応した*in vitro*アッセイを対象とする「targeted IVIVE」に大別され、前者の目的のPBKツールとしては、米国NTPの汎用WebツールであるIntegrated Chemical Environment (ICE) (<https://ice.ntp.niehs.nih.gov/>) の「PBPK」と「IVIVE」ツールが、そして後者の目的のPBKツールとしては、汎用Webツールボックス「PBK workflow」(www.qivivetools.wur.nl) が該当すると考えられた。入力項目やモデルの詳細度が異なるこれらのツールの特徴を解析した結果、1) パラメータ値のデータベースや推計法を搭載する、2) ヒト、ラット、マウスを対象とする、3) 計算結果を多彩にグラフすることがマウスPBKモデルの汎用性向上に重要と判断された。昨年度に構築したマウスPBKモデルはR言語でコード化されており、データや推計式の追加は比較的容易であり、またグラフ出力の多様化にも対応可能と考えられることから、本年度は、マウスPBKモデルと同じ基本構造のラットとヒトのPBKモデルを構築し、マウスとラットのモデルは統合した。

ラットとヒトの生理学的パラメータ(体重、心拍出量、組織血流量割合および組織容積割合)の値は、マウスと同様にNoorlander, et al., (2022) の種固有の値を採用した。また、化学物質に特異的なパラメータである組織/血液分配係数、消化管からの吸収速度定数、肝代謝クリアランスについても、基本的にlog Kow, Pappおよび*in vitro*クリアランスから生物種別の計算ができるように数式をコード化した。新たに構築したラットモデルについては、Clewell et al., (2001) に報告されているイソプロピルアルコールを330および3056 mg/kgでラッ

トに単回経口投与した試験のデータと比較し、既報のパラメータ値を用いてラットの血中濃度の時間変化をほぼ推定できることを確認した。また、ヒトモデルについては、医薬品インタビューフォームに記載されたアセトアミノフェン（投与量：300 mg）とイルベサルタン（投与量：200 mg）をヒトに単回投与した試験のデータと比較し、既報のパラメータ値を用いてヒトの血中濃度の時間変化をほぼ推定できることを確認した。以上により、ヒト、ラット、マウスは同一の基本構造のPBKモデルでTKの推定が可能になった。

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 3 物質及び被験物質 7 物質について Caco-2 透過係数 (Papp) 算出を実施した。その結果、指標化合物 3 物質 (AP, F, C) および被験物質は 7 物質中 4 物質 (D, 4-HB, PP, THE) について表 2 のように算出された。他の 3 物質 (CE2, DP, Nor) 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。指標化合物の 3 物質のうち高透過クラスの AP と中等度透過性クラスの F の Papp (AP : $33.03/25.27 \times 10^{-6}$ cm/sec ; F : 1.40×10^{-6} cm/sec) は文献値 35.7×10^{-6} cm/sec, 1.3×10^{-6} cm/sec (Li et al., 2007) と同等であったが低透過性クラスの C (1.47×10^{-6} cm/sec) については文献値 0.19×10^{-6} cm/sec (Flaten et al., 2006) より高く、また中等度透過性クラスと逆転していた。

表 2 Papp ($\times 10^{-6}$ cm/sec)

Substance	Mean \pm SD
指標物質	

AP	高膜透過性	33.03 \pm 9.73 25.27 \pm 20.36 ^H
F	中等度膜透過性	1.40 \pm 0.89 ^H
C	低膜透過性	(1.47 \pm 0.66)
被験物質		
D		26.25 \pm 6.18
4-HB		68.90 \pm 46.43 ^H
PP		8.83 \pm 2.88
THE		4.10 \pm 2.07
CE2		N.D.
DP		N.D.
Nor		N.D.

H: HPLCで測定, N.D.: 検出限界以下のため算出できず, (): 5% Tween80 存在下でのデータ

・マウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験

被験物質 5 物質 (4-HB, PP, CE2, Nor, THE) についてそれぞれの *ke* および *CLint* を算出した。また、陽性対照基質 7EC は昨年度の測定データをもとに再計算を行った。何れの場合も、実施諸条件（濃度、反応時間）は残存率と時間の回帰式の線形性を十分に確保していた（全被験物質について、 $R^2 > 0.9$ であった）。

① 7EC の *ke* は 0.554, *t*(1/2) および *CLint* はそれぞれ 1.25 min と 554 μ L/min/mg S9 protein であった。② 4-HB の *ke* は 0.099, *t*(1/2) および *CLint* はそれぞれ 7.0 min と 99.0 μ L/min/mg S9 protein であった。③ PP の *ke* は 0.005, *t*(1/2) および *CLint* はそれぞれ 137.7 min と 5.0 μ L/min/mg S9 protein であった。④ CE2 の *ke* は 0.659, *t*(1/2) および *CLint* はそれぞれ 1.05 min と 659.3 μ L/min/mg S9 protein であった。また、安定性確認用反応液 B（熱変性 S9）（60 min）と NADPH 再生系ナシ反応液の残存率（10 min）

はそれぞれ 106.2%と 0.02%であった。NADPH 再生系非存在下でも著しい残存率の減少が認められたことから、CE2 は P450 以外の酵素によって速やかに代謝を受けることが示唆された。さらに残存率は反応時間 5 分で 7.7%, 反応時間 10 分で 0.1% であったことから、より短い反応時間 (0, 1, 2, 5, 10, 15 min) での再解析を実施した。その結果, k_e は 0.602, それから求められた $t(1/2)$ および CL_{int} はそれぞれ 1.15 min と 601.9 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein であった。⑤ Nor の k_e は 0.047, $t(1/2)$ および CL_{int} はそれぞれ 14.8 min と 46.8 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein であった。なお、フィルター濾過後の 50 μM 溶液に含まれる Nor 濃度を測定した結果, 約 23.5 μM であった。従って、反応液中に含まれる Nor の終濃度は約 2.4 μM 程度と考えられた。⑥ THE の k_e は 0.055, $t(1/2)$ および CL_{int} はそれぞれ 12.57 min と 55.1 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ S9 protein であった。

C.3. IVIVEの試行

OED を算出した 4 物質の log Kow は, 3.20 (4-HB) ~4.07 (4-CP) の範囲にあり, 推定された組織/血液分配係数には最大でも 1.8 倍の差異しかなく, また, 血漿蛋白質非結合割合も最小の CE2 と最大の 4-CP の差異は 3.3 倍であった。一方, Papp から算出した消化管からの吸収の 1 次速度定数には最小の THE と最大の 4-HB で 12 倍の差異があり, S9 クリアランス測定値から計算した肝クリアランスにも最小の THE と最大の CE2 にも 12 倍の差異があった。これらのパラメータの変動に伴いピーク濃度に基づくマウスでの換算係数にも 34.6 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}/\mu\text{M}$ (4-HB) ~3350 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}/\mu\text{M}$ (CE2) と 100 倍近い差異が生じた。

これらの換算係数を基に ACC から外挿

した 4 物質のマウス OED の算術平均と範囲は, 4-CP で 125 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (10~598 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 14), 4-HB で 276 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (26~921 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 13), CE2 で 80800 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (有効アッセイ数: 1), そして THE で 311 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (29~805 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 13) であった。また, AC_{50} からの OED の算術平均と範囲は, 4-CP で 484 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (22~1240 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 14), 4-HB で 677 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (56~1410 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 13), CE2 で 41300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (有効アッセイ数: 1), そして THE で 981 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ (25~3000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, 有効アッセイ数: 13) であった。

これら OED を算出した物質のうち, 4-CP および CE2 は 3 日間経口投与によるマウス子宮肥大試験, THE および 4-HB は 7 日間経口投与によるマウス子宮肥大試験を実施しており, 4-CP および THE はエストロゲン様作用陽性を示し, 4-CP の LOAEL は 1000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, NOAEL は 300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, THE の LOAEL は 300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, NOAEL は 100 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ であった。CE2 および 4-HB エストロゲン様作用陰性を示し, 最大用量の 1000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ においても影響は認められず NOAEL は >1000 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ であった。エストロゲン様作用陽性を示した 2 物質 (4-CP および THE) の OED (4-CP : ACC = 125 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, AC_{50} = 484 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$; THE : ACC = 311 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, AC_{50} = 981 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) と子宮肥大試験の NOAEL は, 投与期間を考慮すると概ね一致していた。エストロゲン様作用陰性を示した 2 物質のうち CE2 について, OED (ACC = 80800 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$, AC_{50} = 41300 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$,) と子宮肥大試験の NOAEL に大きな差はないもの

と考えられた。一方,4-HB については OED (ACC = 276 mg/kg/day, AC50 = 677 mg/kg/day) と子宮肥大試験における NOAEL との間に差がみられた。なお,4-HB は7日間皮下投与の子宮肥大試験においては陽性を示し,エストロゲン様作用自体は有している。

D. 考察

理想的な IVIVE はヒト由来の細胞等を用いた *in vitro* アッセイの活性濃度からヒト PBK モデルを用いて,ヒトでの OED に外挿し,有害性評価の Point of Departure (POD) を得て,ヒト健康リスクを定量的に判定できるようにすることであり,これによりリスク判定時の種間外挿に伴う不確実性も考慮不要になると考えられる。このような外挿を行うには,様々な化学物質に適用できる汎用的なヒト PBK モデルが必要となる。一方,*in vitro* アッセイからの IVIVE が妥当であることを示すには,ラットやマウスを用いた動物試験での NOAEL や LOAEL のデータとの比較による傍証が必要と考えられ,このためにはラットやマウスの汎用的な PBK モデルが必要となる。以上のことから,ラット,マウスおよびヒトでの TK を推定できる汎用 PBK モデルを構築することは重要であるが,現時点では,ラットモデルはイソプロピルアルコール,マウスモデルはビスフェノール A,そしてヒトモデルはアセトアミノフェンおよびイルベサルタンと検証事例が十分ではないため,モデルの汎用性の拡大とともに,今後も検証事例を増やし,モデルの信頼性を高める必要があると考えられる。

PBK モデルパラメータ値の整備のための Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験については,信頼性のあるデータを得るた

めに更なる試験条件等の検討が必要と考える。具体的には,膜透過性の指標化合物の透過性の結果に透過性クラスに応じた Papp が明確には得られていない。指標化合物の透過性には文献により差がみられ,例えば,Kus et al., (2023) の Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験を標準化する目的で種々の文献中の試験条件をレビューした報告では,高透過性物質 AP の Papp は 76.71×10^{-6} cm/sec,中等度透過性物質 F の Papp は 1.29×10^{-6} cm/sec 低透過性物質 C の Papp は 0.71×10^{-6} cm/sec とある。本研究で参考とした Papp の文献値は,中等度透過性物質は本研究で引用しているものと同じデータであるが,高透過性物質 AP は 35.7×10^{-6} cm/sec,低透過性物質 C は 0.19×10^{-6} cm/sec である。測定値には文献によって差があることから,指標化合物による試験系の保証は,測定値が文献値に近いことよりも透過性クラスに応じた差が確実に示されることにより得られると思われる。また,経口投与による子宮肥大試験において陽性結果が認められている被験物質 D については検出限界以下のため Papp が算出されていない。少なくとも経口投与での子宮肥大試験において陽性結果の得られる物質について測定値が得られる必要があると考える。また,難水溶性物質に対する検証もさらに必要と考えられる。マウス肝臓 S9 画分を用いた *In vitro* 代謝安定性試験については,子宮肥大試験において陽性結果が得られた物質が2物質と少ないことから陽性物質のデータを増やす必要があると考える。IVIVE の実用性の検討の精度を高めるためには,これら *in vitro* アッセイの精度の向上が必要と考える。

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。しかし、経口投与で陰性・皮下投与で陽性物質である 4-HB について OED が陽性判定に相当する数値を示していたことから、経口経路における毒性を予測するために、更に検討すべき観点があることが示された。しかし、ヒト健康リスク評価で活用されるであろう OED を定量的に示すことが出来たことに一定の意義があると考えられる。

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

Clewell, III, H.J., Gentry, R., Gearhart, J.M., Covington, T.R., Banton, M.I., and Andersen, M.E. (2001). Development of a physiologically based pharmacokinetic model of isopropanol and its metabolite acetone. *Toxicol. Sci.* 63, 160–172.

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.

Flaten GE, Dhanikula AB, Luthman K, Brandl M. (2007). Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: a novel approach for studying passive diffusion. *Eur J Pharm Sci.* 27, 80-90.

Kamiya, Y., Takaku, H., Yamada, R., Akase, C., Abe, Y., Sekiguchi, Y., Murayama, N., Shimizu, M., Kitajima, M., Shono, F., Funatsu, K., and Yamazaki, H. (2020). Determination and prediction of permeability across intestinal epithelial cell monolayer of a diverse range of industrial chemicals/drugs for estimation of oral absorption as a putative marker of hepatotoxicity. *Toxicol. Reports* 7, 149–154.

Kus M, Ibragimow I, Piotrowska-Kempisty H. (2023). Caco-2 Cell Line Standardization with Pharmaceutical Requirements and In Vitro Model Suitability for Permeability Assays. *Pharmaceutics.* 15, 2523

Li C, Liu T, Cui X, Uss AS, Cheng KC. (2007). Development of *in vitro* pharmacokinetic screens using Caco-2, human hepatocyte, and Caco-2/human hepatocyte hybrid systems for the prediction of oral

bioavailability in humans. *J Biomol Screen.* 12, 1084-1091.

Noorlander, A., Zhang, M., van Ravenzwaay, B., and Rietjens, I.M.C.M. (2022). Use of physiologically based kinetic modeling-facilitated reverse dosimetry to predict in vivo acute toxicity of tetrodotoxin in rodents. *Toxicol. Sci.* 187, 127–138.

Punt, A., Pinckaers, N., Peijnenburg, A., and Louisse, J. (2021). Development of a web-based toolbox to support quantitative in-vitro-to-in-vivo extrapolations (QIVIVE) within nonanimal testing strategies. *Chem. Res. Toxicol.* 34, 460–472.

表1 被験物質

化学物質	CAS	子宮肥大試験 NOAEL/LOAEL	TOX21_E Ra_BLA_ Agonist_ra tio	TOX21_E Ra_LUC_ VM7_Ago nist
4-alpha-Cumylphenol*	599-64-4	300/1000 (30/100)	○	○
Daidzein	486-66-8	200/600 (ND)	○	○
Dicumyl peroxide	80-43-3	100/300 (300/1000)	○	○
4-Hydroxybiphenyl	92-69-3	>1000/- (300/1000)	○	○
Phenolphthalein	77-09-8	>1000/- (1000/-)	ND	○
2-Cyano-3,3'- diphenylacrylic acid ethyl ester	5232-99-5	>1000/- (>1000/-)	○	○
Nordihydroguaiaretic acid	500-38-9	>1000/- (>1000/-)	○	○
1,1,1-tris(4- Hydroxyphenyl)-ethane	27955-94-8	100/300 (100/300)	ND	○
4,4'-Thiodianiline	139-65-1	25/80 (25/80)	○	ND
p-Phenylenediamine, N,N- diphenyl	74-31-7	>1000/- (300/1000)	ND	○
Cinnamic acid, phenethyl ester	103-53-7	>1000/- (>1000/-)	ND	○
Triphenyl phosphate	115-86-6	>1000/- (>1000/-)	ND	○

*：令和4年度測定、-：最大用量でエストロゲン様作用なし、○：データあり、ND：データなし

NOAEL/LOAEL：経口投与（皮下投与）

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5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 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 徳永 朱莉

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*モデル開発における課題を検討した。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ガイド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記載されている。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

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*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や適用領域を設定した。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。本モデルを用いて、2023年に公表されたOECDのQSAR Assessment Frameworkに関するガイダンスを基に、(Q)SARモデル評価項目について検討した。

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

さらに、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本モデルによる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を構築した。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値情報が得られた154物質を用いて、XGBoost 1.7.3 (python 3.8.13)による回帰モデルを構築し、層化5分割交差検証による内部検証を実施した。モデルの適用領域判定は、説明変数を使用したk近傍法 (図1) からデータ密度の高い領域を設定する方法と、皮膚感作性に関する*in vitro*試験法 (DPRA, KeratinoSensTM, h-CLAT) の実験結果を用いて設定する方法を組み合わせた。Hoffmann

(2022)の72物質を用いて外部検証も実施した。内部検証では決定係数R²値が0.67であった。また、GHS区分による3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、適用領域内物質における一致率は0.79だった。外部検証の適用領域内物質におけるGHS区分の一致率は0.50であった。

本モデルの規制評価での使用にむけた課題について、OECDのQSAR Assessment Frameworkに関するガイダンスを基に、*in silico*予測モデル評価について報告書式 (QSAR model reporting format) に従って検討した。公表されている信頼性の高い学習データや算出方法が明確な説明変数、予測モデルの透明性については概ね問題ないことが確認された。一方で、適用領域や外部検証の妥当性については、ガイダンス自体の基準も解釈が難しく、引き続き検討する必要がある。

C.2 *In vitro* 実験の予測モデル構築

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

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、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0.85、特異度0.65、ROC-AUC 0.88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・透明性を有している。一方で、本モデルを使用した外部検証の実施や適用領域を設定したが、これらの妥当性については明確な基準の整備が十分ではないため、さらなる検討が必要であることが明らかとなった。

*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。本モデルに対し、OECD QSAR Assessment Frameworkガイダンスに基づいた(Q)SARモデル評価項目について検討し、適用領域や外部検証の妥当性については課題点が多いことが確認された。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。

本課題における皮膚感作性を対象とした*in silico*予測モデルの開発やリスク評価への活用に関する課題検討の結果は、他の毒性

エンドポイントに対して*in silico*アプローチを適用する場合においても共通する検討事項として参考となることが期待される。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. 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.
2. 安部賀央里. 皮膚感作性強度の予測に向けた機械学習による *in silico* アプローチ. *フレグランスジャーナル*, **7**, 16-20, 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.
4. 安部賀央里. 【第V編 香粧品業界】第4章 皮膚感作性 *in silico* 予測モデル (動物実験代替法と New Approach Methods の開発・利用動向. 監修: 小島肇夫. 発行日: 2023.9.29, シーエムシー出版)

F.2 学会発表

1. Linfeng Liu, Mayu Onishi, Yuka Yoshii, Kaori Ambe, Toshiaki Makino, Masahiro Tohkin: Efficacy and safety of new class disease-modifying anti-rheumatic drugs: Bayesian and frequentist network meta-analysis. 日本薬学会第144年会 (2024.3.28 – 3.31, 横浜)
2. 安部賀央里, 木下 啓, 山田 隆志, 足利 太可雄, 頭金 正博: 皮膚感作性評

- 価における *in silico* 予測モデルの開発. 第 10 回 CBI 学会個別化医療研究会 (2024.2.27, 岐阜)
3. 青木 優佳, 安部 賀央里, 頭金 正博, 村島 美穂, 濱野 高行, 和知野 千春, 木村 和哲, 日比 陽子, 近藤 勝弘: 電子カルテ情報と機械学習を活用したシスプラチン誘発性急性腎障害の予測モデルの構築. 第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 (2023.12.14 - 12.16, 神戸)
 4. Linfeng Liu, Mayu Ohnishi, Yuka Yoshii, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Comparison of the efficacy and safety of various anti-rheumatic drugs for rheumatoid arthritis: Network Meta-Analysis. 第 44 回日本臨床薬理学会学術総会 (2023.12.14 - 12.16, 神戸)
 5. 徳永 朱莉, 安部 賀央里, 山田 隆志, 足利 太可雄, 頭金 正博: 過小評価の回避を指向した皮膚感作性強度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 36 回大会 (2023.11.27 - 11.29, 千葉)
 6. 青木 優佳, 安部 賀央里, 頭金 正博, 村島 美穂, 濱野 高行: 悪性腫瘍患者における化学療法中の低 Na 血症を予測する機械学習モデルの構築およびリスク因子の検討. 第 33 回日本医療薬学会年会 (2023.11.3 - 11.5, 仙台)
 7. 大西 真由, 劉 臨風, 吉井 優花, 安部 賀央里, 頭金 正博: ネットワークメタアナリシスによる新規抗リウマチ薬の有効性と安全性の比較検討. 第 33 回日本医療薬学会年会 (2023.11.3 - 11.5, 仙台)
 8. 木下啓, 安部 賀央里, 山田 隆志, 足利 太可雄, 頭金 正博: Establishment of *in silico* prediction model for skin sensitization aiming for practical application. CBI 学会 2024 年大会 (2024.10.23 - 10.26, 東京)
 9. Tamana Enami, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Development of a model for predicting a chemical-induced CYP inhibitory activity using images data showing chemical structure information. 2023 年 ICCP450/JSSX 国際合同大会 (2023.9.25 - 9.29, 静岡)
 10. 出来 佑都, 安部 賀央里, 頭金 正博, 和知野 千春, 木村 和哲, 日比 陽子, 近藤 勝弘, 村島 美穂, 濱野 高行: 電子カルテ情報と機械学習を用いたバンコマイシン誘発性急性腎障害の予測手法開発. 第 9 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 (2023.9.16, 東京)
 11. 濱上 敦史, 土井 更良, 安部 賀央里, 頭金 正博: 副作用報告データベースとトランスポーター阻害活性情報を用いた機械学習による胆汁うっ滞型薬物性肝障害の予測モデルの開発. 第 69 回日本薬学会東海支部大会 (2023.7.8, 名古屋)
 12. 足利 太可雄, 波多野 浩太, 岩佐 帆乃夏, 木下 啓, 中村 伸昭, 安部 賀央里, 頭金 正博: Next Generation Risk Assessment 事例研究: ヘアカラー製剤に存在するバンドロフスキーベースの定量的皮膚感作性リスク評価. 第 48 回日本化粧品学会 (2023.6.23 - 6.24, 東京-Online Hybrid)
 13. 安部 賀央里: データベースと機械学習を活用した毒性予測へのアプローチ～有機化学から視野を広げて～ シン

- ポジウム29 トキシコロジストのキャリア形成支援プログラム：デジタル時代の人材育成と教育. 第50回日本毒性学会学術年会（2023.6.19-6.21, 横浜）
14. 木下 啓, 安部 賀央里, 山田 隆志, 足利 太可雄, 頭金 正博: 機械学習を用いた皮膚感作性強度予測モデルの開発と実用化に向けた検討. 第50回日本毒性学会学術年会（2023.6.19-6.21, 横浜）
15. Linfeng Liu, Mayu Ohnishi, Yuka Yoshii, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin: Efficacy and Safety of Anti-rheumatic Drugs in Patients with Rheumatoid Arthritis: Bayesian Network Meta-Analysis. 第50回日本毒性学会学術年会（2023.6.19-6.21, 横浜）
16. 大西 真由, 劉 臨風, 吉井 優花, 安部 賀央里, 頭金 正博: 新規抗リウマチ薬の有効性と安全性に関する研究—ネットワークメタ解析手法を用いた検討—. 第7回日本臨床薬理学会東海北陸地方会（2023.6.4, オンライン）

G. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

K近傍法:

近傍k個のデータを用いてデータ密度を推定する方法

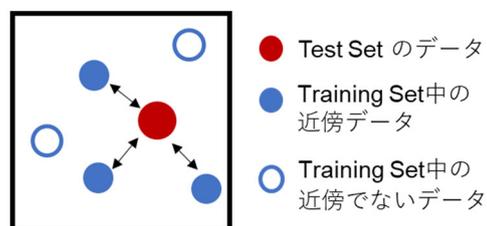


図1 適用領域の設定方法（k近傍法）

別添 5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

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
<u>Furuham</u> <u>A,</u> <u>Kasamatsu</u> <u>T,</u> <u>Sugiyama</u> <u>K, Honma</u>	Curation of more than 10,000 Ames Test Data Used in the Ames/QSAR International Challenge Projects	Huixiao Hong	QSAR in Safety Evaluation and Risk Assessment	(Elsevier) Academic Press.		2023	365-372
山田隆志	Next Generation Risk Assessmentの現状と行政利用へ向けた課題	監修：小島肇夫	動物実験代替法とNew Approach Methodsの開発・利用動向	シーエムシー出版	東京	2023	7-13
安部賀央里	【第V編 化粧品業界】第4章 皮膚感作性 <i>in silico</i> 予測モデル	監修：小島肇夫	動物実験代替法とNew Approach Methodologiesの開発・利用動向	シーエムシー出版	日本	2023	193-200

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
<u>Furuham</u> <u>A, ...,</u> <u>Sugiyama K, Honma</u> <u>M.</u>	Evaluation of QSAR models for predicting mutagenicity: outcome of the Second Ames/QSAR international challenge project	<i>SAR QSAR Environ. Res</i>	34 巻 12 号	983-1001	2023
山田隆志, 丸山 (薦田) 多恵子.	化学物質のヒト健康影響評価に資するリードアクロス-行政リスク評価への適用を目指して-	<i>CICSJ Bulletin</i>	Vol.41, No.1	6-10	2023
Myden A, Stalford SA, Fowkes A, White E, Hirose A, Yamada T.	Enhancing developmental and reproductive toxicity knowledge: A new AOP stemming from glutathione depletion.	<i>Curr Res Toxicol.</i>	Vol.5	100124	2023

Yamazoe Y, Murayama N, Kawamura T, <u>Yamada T.</u>	Application of fused-grid-based CYP-Template systems for genotoxic substances to understand the metabolisms.	<i>Genes Environ.</i>	45(1)	22	2023
<u>Matsumoto M</u> , Murata Y, Hirose N, Shigeta Y, Iso T, Umano T, <u>Hirose A.</u>	Derivation of subacute guidance values for chemical contaminants of drinking water quality standard in Japan.	<i>Regul Toxicol Pharmacol.</i>	141	105401	2023
Murata Y, Natsume M, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Umano T, Horibata K, <u>Sugiyama KI</u> , Masumura K, <u>Hirose A</u> , <u>Matsumoto M.</u>	In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung.	<i>Genes Environ.</i>	45(1)	12	2023
Hirose N, Umano T, Murata Y, Iso T, Hasegawa S, Inoue K, <u>Yamada T</u> , Masumura K, <u>Matsumoto M.</u>	Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (IX).	<i>Bull. Natl Inst. Health Sci.</i>	141	61-68	2023
Murata Y, Suzuki K, Shigeta Y, Iso T, Hirose N, Umano T, Horibata K, <u>Sugiyama K</u> , <u>Hirose A</u> , Masumura K, <u>Matsumoto M.</u>	In vivo mutagenicity assessment of orally treated tert-butyl hydroperoxide in the liver and glandular stomach of MutaMouse.	<i>Genes Environ.</i>	45(1)	29	2023
<u>安部賀央里.</u>	皮膚感作性強度の予測に向けた機械学習による <i>in silico</i> アプローチ.	フレグランスジャーナル	7	16-20	2023
<u>安部賀央里.</u>	機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発	コスメティックスステージ	2月号	60-65	2023
Ashikaga T, Narita K, Kobayashi M, Tachibana S, Murasaki W, Suzuki M, <u>Ambe K</u> , Tohkin M.	Skin sensitization potency prediction of ingredients in hair colorants using in silico models of machine learning.	<i>Journal of Japanese Cosmetic Science Society.</i>	47(1)	1-5	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 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

2. 研究課題名 *In silico* 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性予測評価部 ・ 第四室長
(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 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性生物試験研究センター変異遺伝部 ・ 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 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 変異遺伝部 ・ 部長

(氏名・フリガナ) 杉山 圭一 ・ スギヤマ ケイチ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和5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) 所長
(氏名・フリガナ) 本間 正充 ・ ホンマ マサミツ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 一般財団法人化学物質評価研究機構

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 今田中 伸哉

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 研究課題名 In silico 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性評価技術研究所・技術顧問
(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 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業

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

3. 研究者名 (所属部署・職名) 安全性予測評価部 ・ 第三室長

(氏名・フリガナ) 松本 真理子 ・ マツモト マリコ

4. 倫理審査の状況

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

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 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5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) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「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。