

令和2年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

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

分担研究報告書

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

研究分担者	杉山 圭一	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部	部長
研究協力者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所	副所長	
研究協力者	古濱 彩子	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部	主任研究官
研究協力者	笠松 俊夫	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部	
研究協力者	Petko Petkov	ブルガス大学	数理化学研究所	研究員
研究協力者	Hristiana Ivanova	ブルガス大学	数理化学研究所	研究員
研究協力者	Elena Kaloyanova	ブルガス大学	数理化学研究所	研究員
研究協力者	Ovanes Mekenyan	ブルガス大学	数理化学研究所	教授

研究要旨

In silico による *in vivo* 遺伝毒性予測技術の高度化・実用化を図ることを目的として、Ames 試験と *in vivo* げっ歯類トランスジェニック動物突然変異試験、あるいは *in vitro* 染色体異常試験と *in vivo* 小核試験のように、基本的には同等のエンドポイントを指標としながら *in vitro* と *in vivo* で遺伝毒性試験結果が異なる物質に着目し、その差異となる要因を解析して、それらの知見を反映した遺伝毒性予測モデルを構築した。

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

A. 研究目的

近年、*in vitro* 遺伝毒性試験、特にAmes試験結果に対する*in silico* 予測モデルの開発が進み、ICH（医薬品規制調和国際会議）のM7ガイドラインでは、遺伝毒性の判定に*in silico* 手法を用いることが許容されるなど、高い精度で遺伝毒性を予測することが可能になってきている。

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

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

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

B. 研究方法

前年度までに、既存の各種データベース

における*in vitro* Ames試験 (Ames) 陰性で*in vivo* げっ歯類トランスジェニック突然変異試験 (TGR) 陽性となっている物質、及び*in vitro* 染色体異常試験 (CA) 陰性で*in vivo* 小核試験 (MN) 陽性と報告されている物質について、原著論文等の精査により当該試験結果の妥当性を評価し、それぞれ4物質 (表1)、12物質 (表2) 抽出した。これら物質の代謝情報を収集し、代謝マップを作成、*In vitro/in vivo* の代謝の差異をもたらす要因を検証した結果、1) 代謝酵素の発現、2) 遺伝毒性試験の曝露時間が主要因となった。

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

TIMESはトキシコキネテックスとトキシコダイナミクスとを組み合わせる単一のモデリングプラットフォームとしたソフトウェアであり、トキシコキネテックス部分では代謝情報に基づく代謝物の予測が行われ、トキシコダイナミクス部分である毒性メカニズムに基づく警告構造 (アラート) と照合される。その結果、親化合物、親化合物と代謝物、または代謝物のみが遺伝毒性を示す (あるいは示さない) と判定される。これまでのTIMESでは代謝物の予測に速度論的な概念が含まれていない。

B.1. *In vivo*モデルに対するアラートの設定

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

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

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

まず、代謝情報やクリアランス(*Cl*)の実測値を収集し、起こり得る酵素的反応と非酵素的反応をリスト化した。各反応に対して、文献情報や専門家知識また実験データを再現できるように*Cl*を再計算し、発生確率 P_i を代謝変換の確率を時間 t の関数 (式1) とし最適化した。

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

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

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

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

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

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

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

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

B.3. *in vivo*代謝シミュレータの最適化

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

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

B.4. 閾値の設定

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

閾値を設定する原理は図1の通りである。付加体推定量が閾値を超えている場合は陽性（Positive）となり、超えない場合は陰性（Negative）とした。

（倫理面への配慮）本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C.1. 非速度論的*in vivo*モデルの新アラート

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

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

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

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

C.2. 速度論的*in vitro* Ames変異原性モデル

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

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

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

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

C.3. 速度論的*in vitro* CAモデル

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

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

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

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

C.4. 速度論的*in vivo* TGRモデル

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

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

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

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

C.5. 速度論的*in vivo* MNモデル

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

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

アラートに閾値を設定すると、表13に示す通りとなった。

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

D. 考察

*In vitro*陰性・*in vivo*陽性の差異を説明できる代謝情報を収集して解析した結果、1) 代謝酵素の発現と、2) 遺伝毒性試験の曝露時間の相違が浮かび上がった。*In vitro*の代謝活性化（げっ歯類肝ミクロソームS9）系に、代謝酵素、特に第2相代謝酵素の発現が不足、あるいは欠如していることが知られていたが、*in vitro*陰性・*in vivo*陽性の原因となることを改めて確認した。TIMESのモデルでは、このような知見を基に、複数の臓器が関与することによって生じる新たな*in vivo*アラートの設定が可能なことを示した。

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

*In vivo*モデルでは、速度論的な扱いを行う上で実験クリアランスの設定が容易ではなく、クリアランスに基づく直接的な試験時間の寄与の考慮は容易ではない。また、プロトコール上の曝露時間の違いによって陽性・陰性が分かれるのは、本来、本質的な問題ではないのかもしれない。しかしながら、この課題をきっかけに速度論的な考えを取り込んだ精緻なシミュレーションができれば、将来ヒト健康リスクを評価する際、対象物質への曝露形態や期間に合わせて臨機応変な予測をする際に応用が期待できる。

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

となった。

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

E. 結論

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

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 *In vitro* Ames/*in vivo* TGR の試験結果差異の検証・TIMES 予測結果*

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

*Negative:陰性、Positive:陽性

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

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

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

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

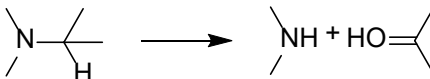
No.	構造	肝代謝の受けやすさの評価(TIMES 開発者共同研究者の専門的知見)
i.	芳香族炭化水素	通常は最初にエポキシ化による代謝を受ける。多環式芳香族炭化水素(PAH)の場合、二重結合性の高い C-C 結合が通常、最もアクセスしやすい。その後は様々な経路がある。PAH の場合、例えば、加水分解によってエポキシ化環がシクロヘキサジエン-ジオール (他の環と融合しうる) に変換され、さらに水を失ってフェノールとなることもあれば、キノンへの酸化、PAH の場合はさらにエポキシ化を受けてジオール-エポキシドとなることがある。PAH (ここでは芳香環が 4 つ以上のもの) を VE(Very Easy: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

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

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

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

表5 *in vivo* 代謝における化学物質の安定性評価の原則*

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

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

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

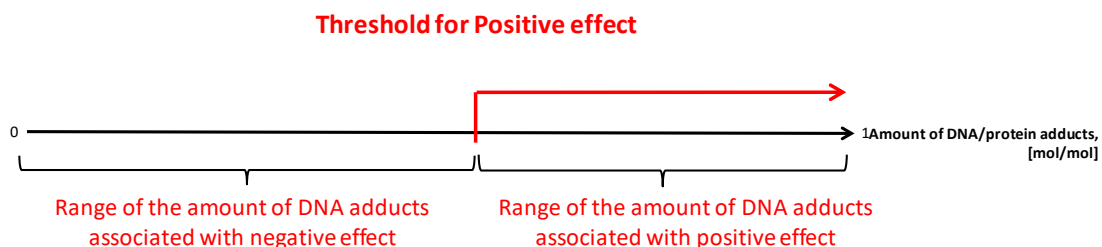


図1 閾値量を設定する際の原則

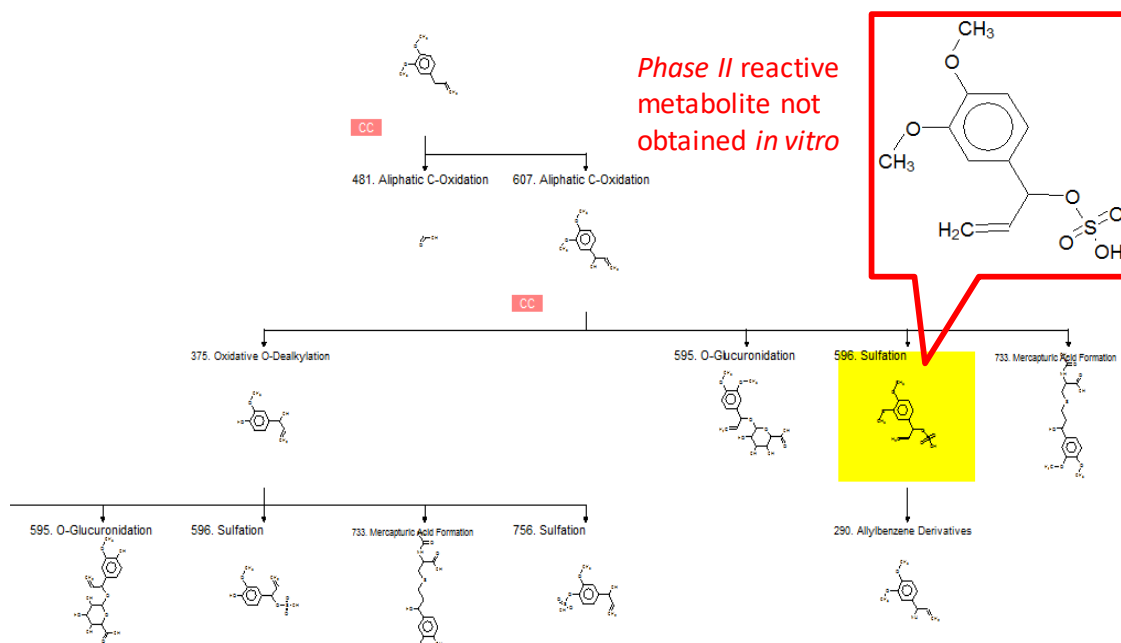


図2. メチルオイゲノール (CAS: 93-15-2) の *in vivo* 代謝シミュレーションマップ

表6 DNA付加体量に対して閾値を設定した Ames モデルの性能

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

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

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

表8 DNA/タンパク質付加体量に対して閾値を設定した CA モデル性能

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

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

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

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

表10 DNA 付加体量に対して閾値を設定した TGR モデル性能

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

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

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

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

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

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

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

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

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