

令和2年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

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

分担研究報告書

反復投与毒性のカテゴリーアプローチモデルの高度化に関する研究

研究分担者	山田 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	室長
研究協力者	辻井 伸治	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	川村 智子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	大畑 秀雄	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	三浦 稔	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	栗本 雅之	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員

研究要旨

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

A. 研究目的

現在、国内外の化学物質管理行政においては、試験データを必要とする膨大な数の化学物質の安全性評価が大きな課題となっている。また、動物愛護の観点から、動物実験削減の流れも着実に進んでいる。このような世界の動向に対応するため、現状の *in silico* 評価技術レベルの向上、適用範囲の拡大、安全性評価での実運用が強く求められている。近年 OECD では、AOP（毒性発現経路）の開発が精力的に進められており、QSAR の適用が困難と考えられる複雑な毒性エンドポイントについては、AOP に基づき *in silico*、*in vitro*、*in vivo* の情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する統合的アプローチ（IATA）の活用が提案・推奨されている。従って、今後は動物実験への依存度を軽減しつつ、化学物質が発現しうるヒトへの毒性を高い精度で予測する *in silico* の評価技術を確認し、IATA に基づいたヒト健康リスクの評価手法を進化させる動きが加速すると考えられる。

本研究では、上記の国際動向を見据えつつ、反復投与毒性についての新たな評価スキームの開発と実用化を目指している。まず、化学物質の毒性情報について、網羅的かつ容易に検索し解析することができるデータベースを構築するため、国内外で公開されている毒性試験データを、可能な限り統合し、更に未公開の化学物質審査規制法（化審法）新規化学物質の毒性試験結果をデータベース化し、NIHS 統合 DB を完成させる。

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

ることを目的に、神経毒性リスクを課題に、問題解決に取り組むこととする。神経毒性は、有害性評価における重要なエンドポイントの一つである。化学物質審査規制法の有害性評価では、その重篤性を考慮して有害性評価値を算出する際に不確実係数が追加される。しかし、詳細な神経毒性試験が実施されることは限られており、神経毒性は反復投与毒性試験の結果に基づいて評価されることが多い。したがって、その限られた測定項目から神経毒性影響を評価するのはしばしば困難である。

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

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

B. 研究方法

B.1. 反復投与毒性 NIHS 統合 DB の構築

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

B.2. 神経毒性物質の化学構造情報の収集とカテゴリ領域の精緻化

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

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

（倫理面への配慮）本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 結果

C.1. 反復投与毒性の NIHS 統合 DB の概要

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C.2. 神経毒性発現の鍵となる部分化学構造 KFG の抽出

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

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

C.3. KFG に起因すると考えられる神経毒性及び想定される発現機序

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KFG 3 [Acrylamide/Acrylate/Acrylo-nitrile]

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

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

KFG 4 [Aromatic amine: aniline: 4a]

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

KFG 5 [Aromatic alcohol: phenol: 4a]

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

KFG 6 [Aliphatic alcohol]

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

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

KFG 7 [Benzyl alcohol/aldehyde]

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

ことが報告されている (Tabatabaie et al., 1996)。

KFG 9 [Carbamate]

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

KFG 10 [Guanidine]

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

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

KFG 14 [Organochlorine]

KFG 15 [Organohalide]

KFG 16 [Organophosphorus]

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

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

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

KFG 17 [Organosilane]

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

明らかにされていない。

KFG 18 [Organotin]

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

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

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

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

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

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

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

- 分子量他: MW; AMW(平均分子量);

No of Halogen

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

C.5. KFG と BCP/PCP を利用した神経毒性予測性の評価

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

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

率 (NT/Hit) が 28.2%から 87.5%に改善した。

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

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

KFG 2 [Dicarbonyl: Diketone]

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

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

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

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

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

KFG 3 [Acrylamide/Acrylate/Acrylo-nitrile]

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

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

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

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

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

KFG 9 [Carbamate]

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

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

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

KFG 10 [Guanidine]

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

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

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

KFG 16 [Organophosphorus]

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

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

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

KFG 18 [Organotin]

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

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

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

を発現物質となり、その判定確率が 100%に改善された (図 12)。

D. 考察

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

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

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

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

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

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

反復投与毒性試験の限られた測定項目から神経毒性影響を評価するのは困難である場合が多い。今回の解析では、病理組織学的に神経系 (中枢又は末梢) に何らかの異常が見られている物質に加えて、安全サイドに立って、神経系に対する影響の可能性があると考えられる一般状態の変化を有する物質を広く抽出した。

より厳密には、死亡例あるいは死亡用量でのみ変化の見られているものや、流涎、自発運動低下など他の要因でも生じる不明瞭な変化しか発現していないもの、神経組織の色素沈着や空胞化など軽度な組織変化が

記載されているにもかかわらず一般状態に変化の見られていないものを対象から外すなど、神経毒性の判定は慎重に行うべきである。しかし、有害性の評価の現場では、毒性試験の投与量設定が低い故に神経毒性影響が明瞭に認められないケースがしばしばあり、評価を困難にしている。神経毒性と関連性が懸念される構造を広く抽出して、そのカテゴリーの特徴を現在可能な範囲で明確化しておくことは、**Weight of Evidence** に基づく神経毒性の一貫性のある評価に有用であると期待される。

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

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

つつグループ化を行った。

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

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

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

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

E. 結論

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

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

F. 参考文献

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

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

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

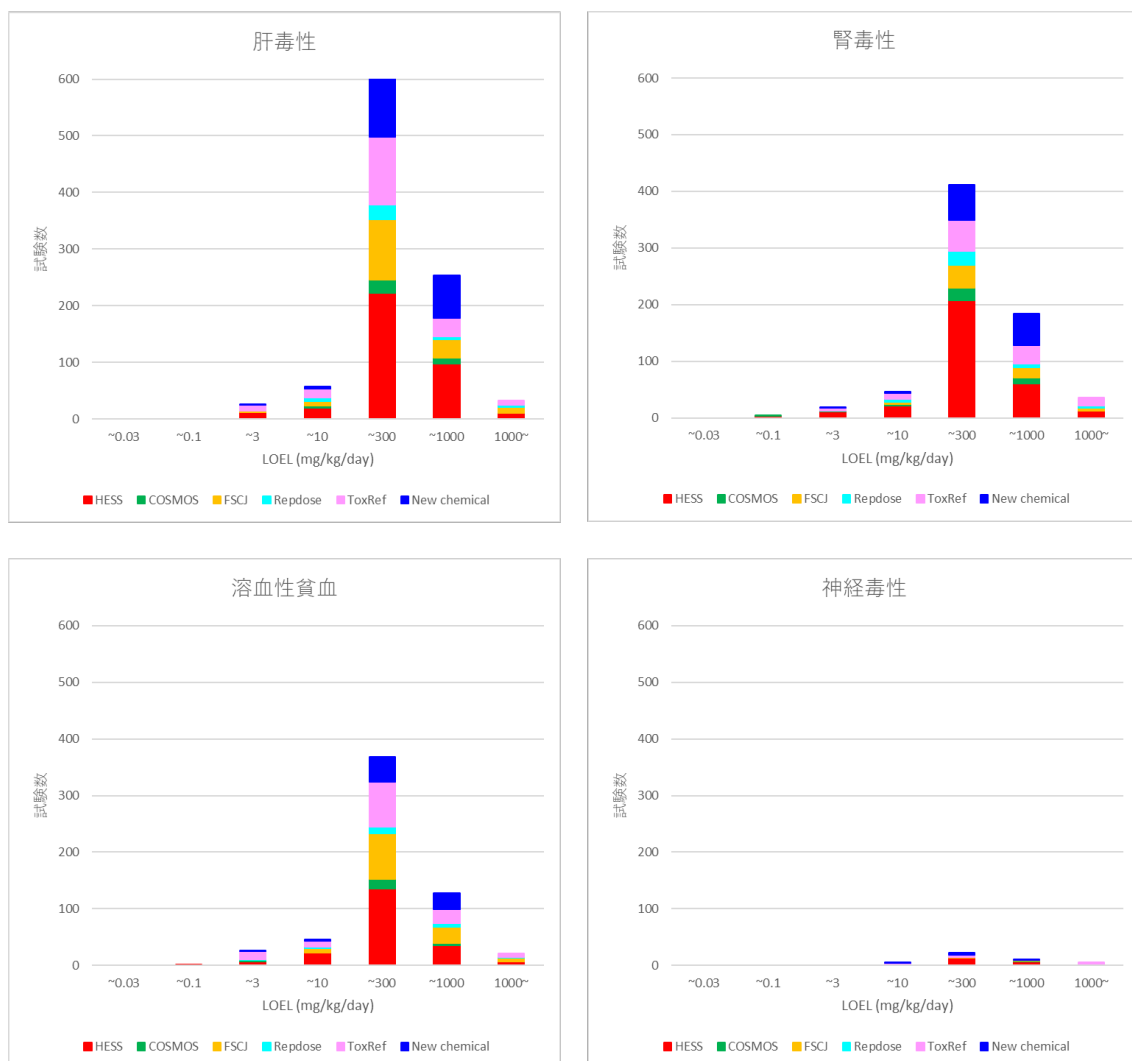


図2 反復投与毒性データベースの活用：亜急性試験を対象とした標的臓器ごとに病理組織学的影響を及ぼす化学物質のLO(A)ELと試験数

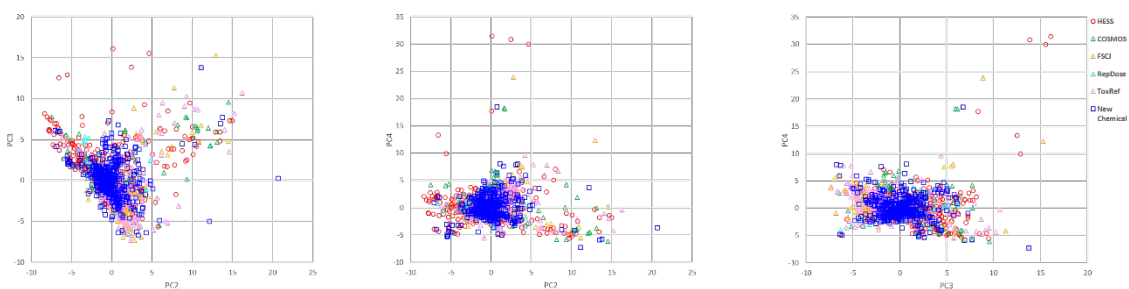


図3 NIHS 統合 DB のデータセット化合物のケミカルスペースの比較

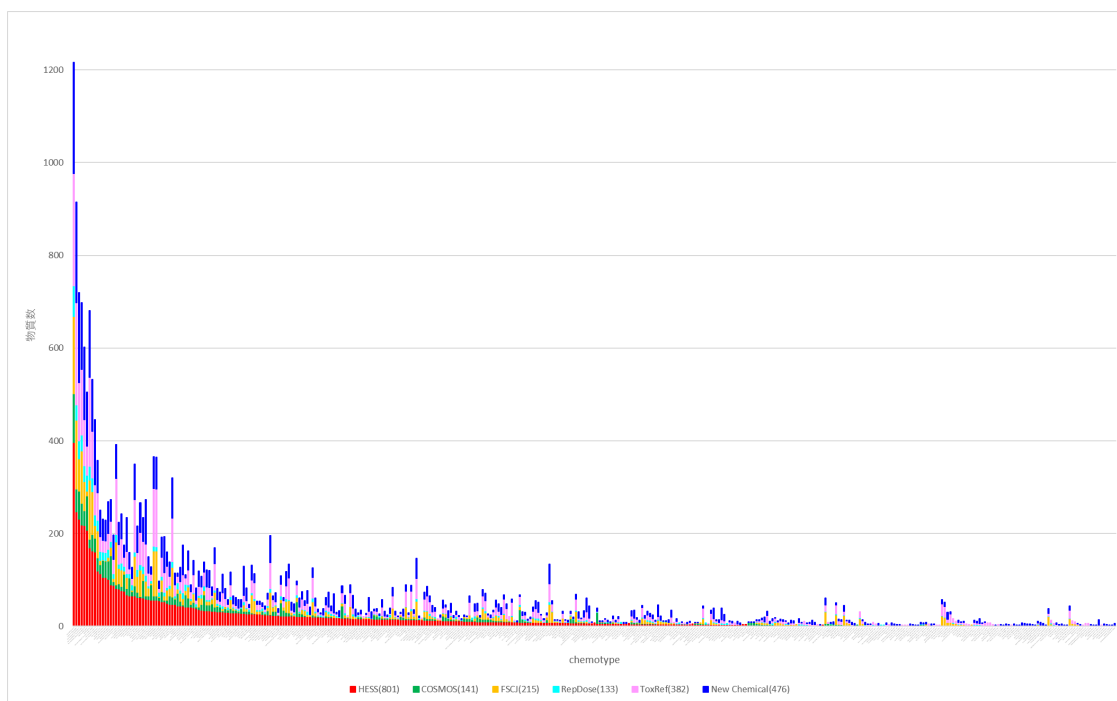


図4 NIHS 統合 DB データセット化合物の ToxPrint ケモタイプ分類の比較

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

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

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

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

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

*NT: neurotoxic; nonNT: not neurotoxic

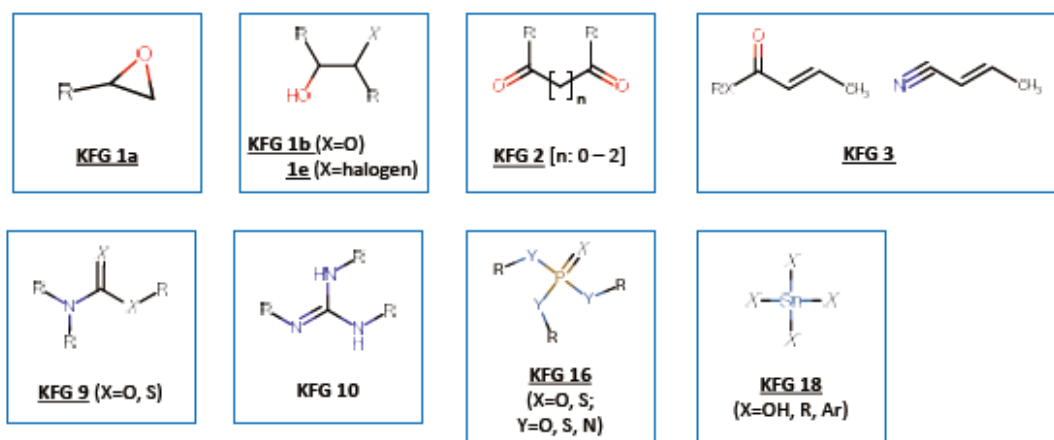


図5 本研究で PCP/BCP の領域を検討した Key Functional Group (KFG)の構造

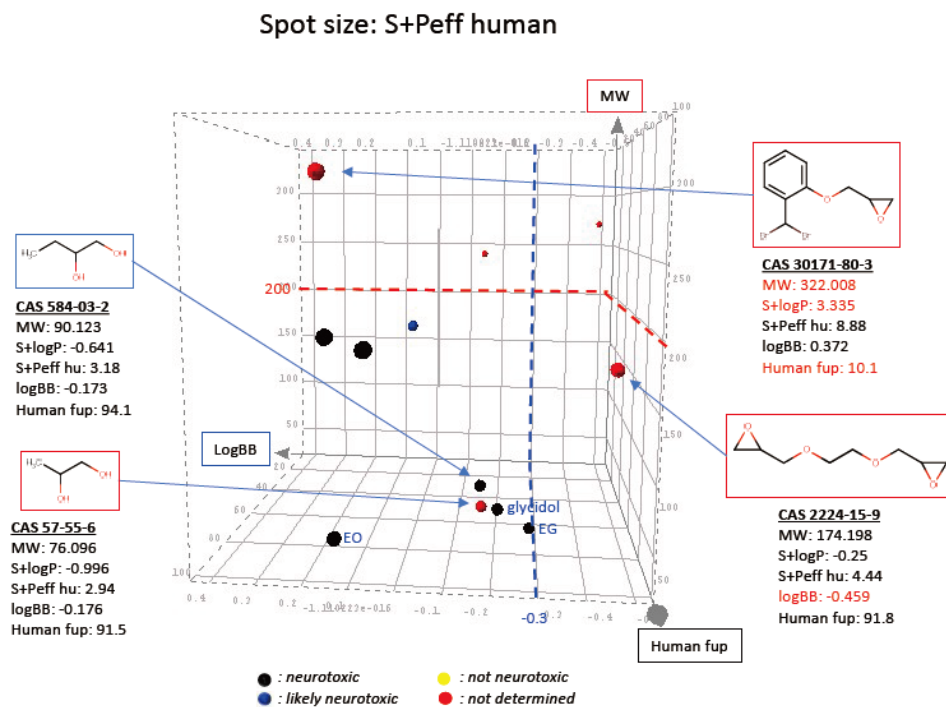
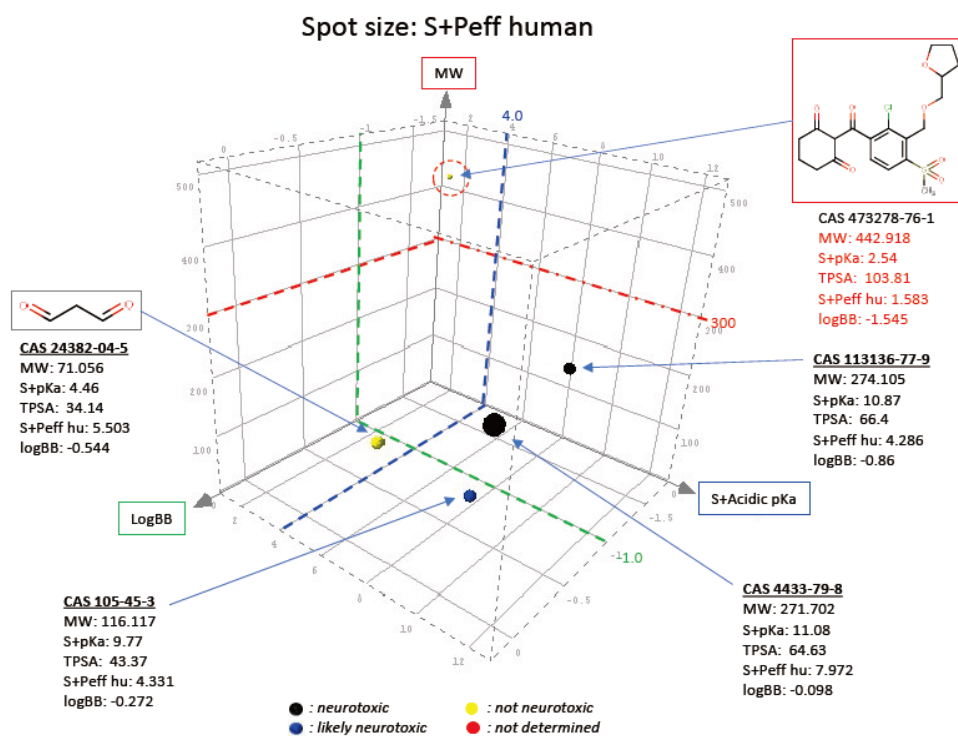


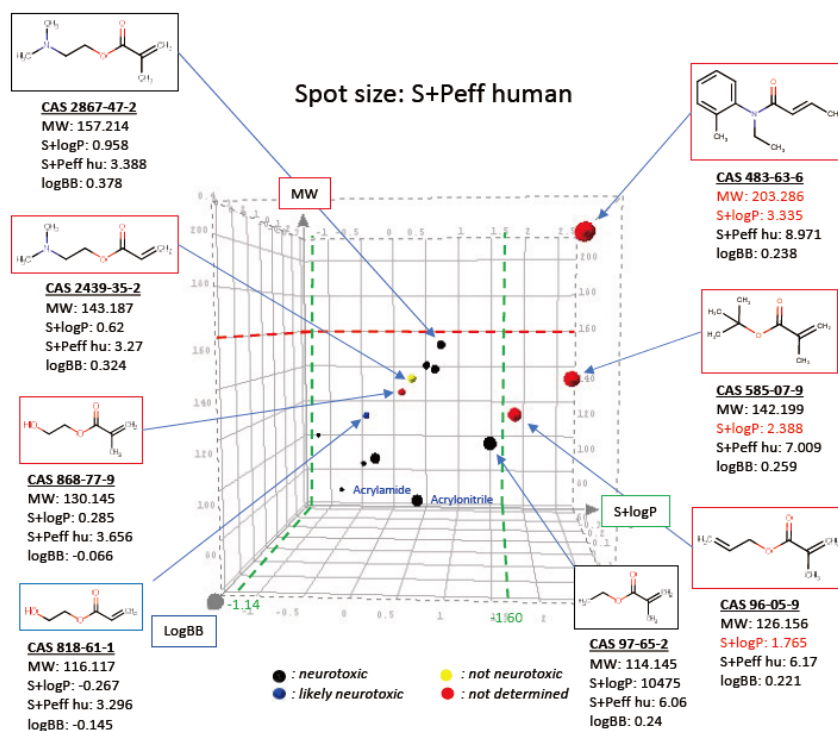
図6 Selection Criteria for KFG 1

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



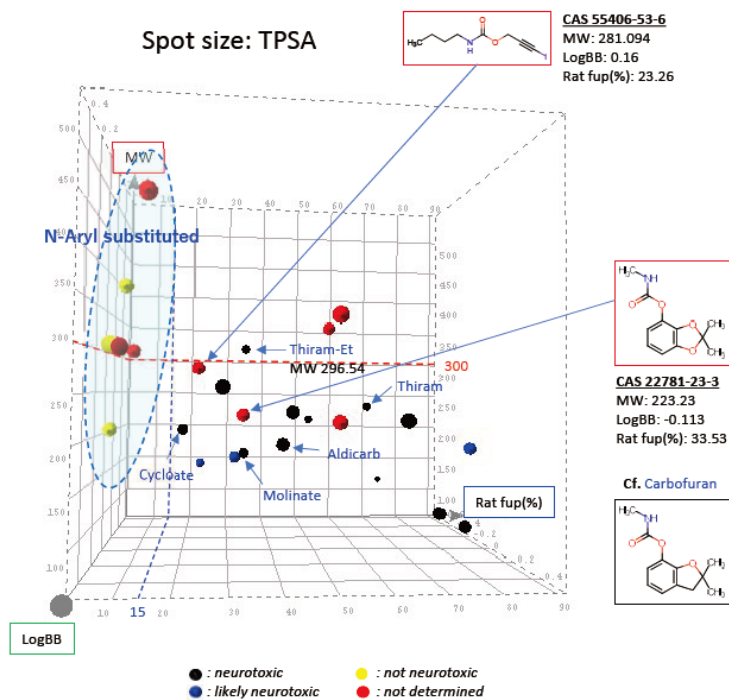
☒ 7 Selection Criteria for KFG 2

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



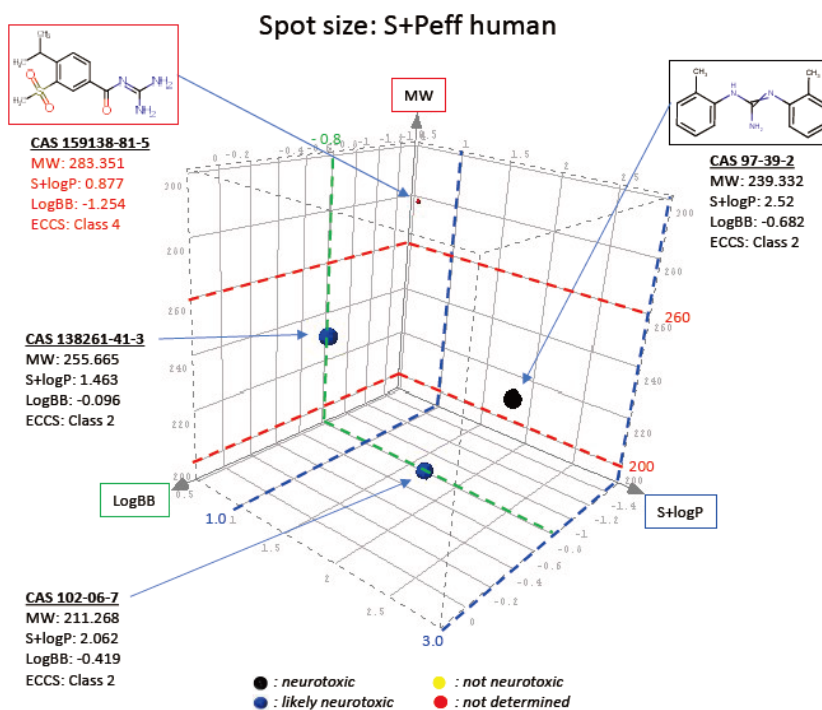
☒ 8 Selection Criteria for KFG 3

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



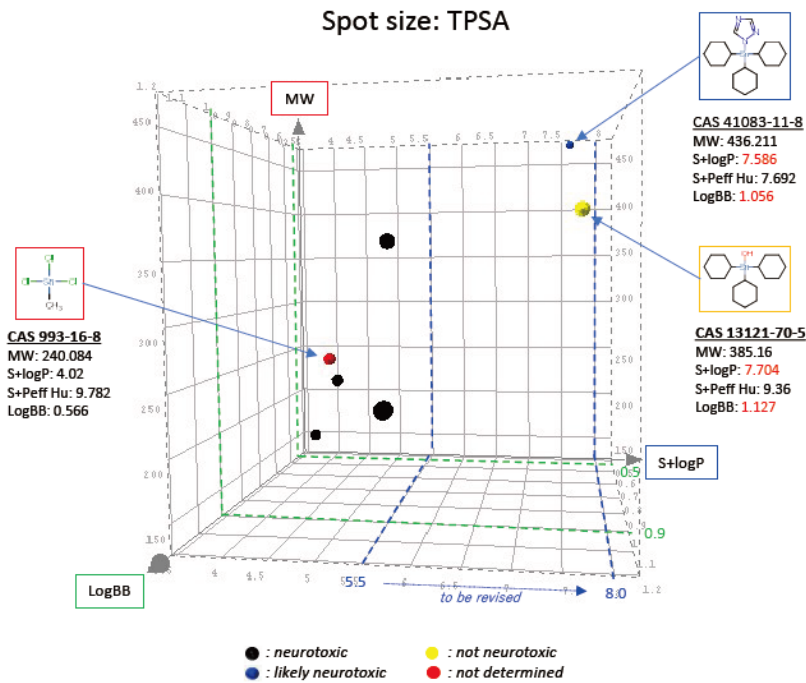
☒ 9 Selection Criteria for KFG 9

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



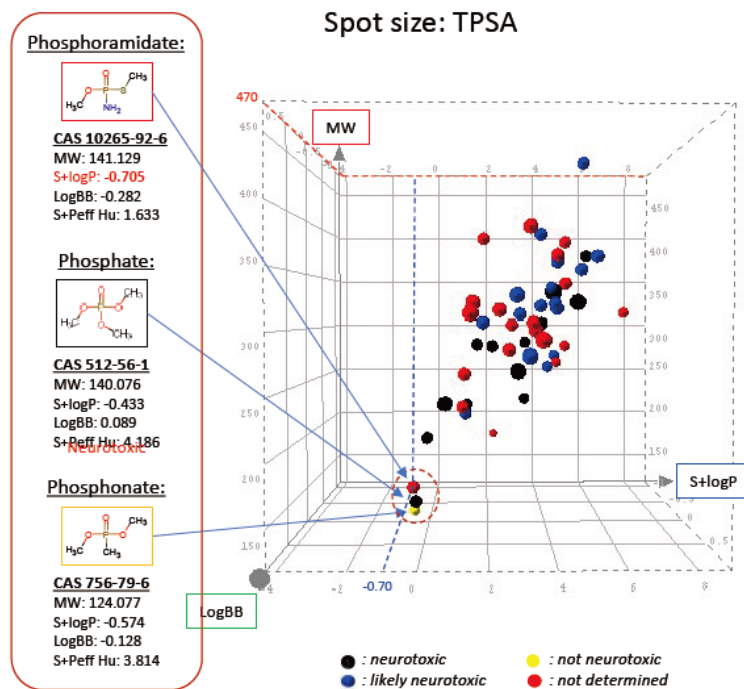
☒ 10 Selection Criteria for KFG10

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



☒ 11 Selection Criteria for KFG16

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



☒ 12 Selection Criteria for KFG 18

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