

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戦略の開発
(H30-化学-指定-005)

総括研究報告書

研究代表者 山田隆志 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長

研究要旨

本研究では、化学物質のヒト健康リスクを効率的に評価するための*in silico*手法の高度化と実用化に資するデータベース、毒性発現経路（AOP）、予測モデルの評価と改良を遂行した。

本事業で構築した安衛法 Ames 試験結果の詳細データベースを用いて新規 Ames 試験予測 QSAR モデルの向上を目指した Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトを始動した。1589 物質の予測に挑戦する本プロジェクトに 10 か国 19 チームが参加している。更に、安衛法 Ames 試験結果の詳細データベース更新を進めた。そのデータベース情報から被験溶媒や構造に関する解析と Ames 試験を実施し、QSAR 予測に資する知見の充実を図った。

次いで、*in vitro/in vivo* の遺伝毒性試験結果の相違を、代謝の観点から検討した遺伝毒性予測モデルを構築した。*In vitro* モデルでは、実験的な速度論的データを付与した。更に *in vitro/in vivo* 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た。本モデルでは閾値に基づく判定の導入で偽陽性が減少し、*in vitro* 陰性、*in vivo* 陽性といった矛盾する遺伝毒性試験結果について合理的な解釈ができる可能性を示せた。

反復投与毒性については、カテゴリーアプローチの適用範囲の拡大・高度化を図るため、国内外の信頼性が高い反復投与毒性試験データを統合し、大規模データベースを構築した。統合データベースの利用として、神経毒性を対象に毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となる部分構造と体内動態に寄与する物理化学的・生物薬学的パラメータ領域を検討し、一貫性のある神経毒性の評価に資する精度の高い情報の提供を可能とした。

さらに、令和元年度に生殖発生毒性に関するリードアクロスの精度向上を目指して行った毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして新規の AOP を開発するという手法により特定された標的のうちゴナドトロピン放出ホルモン受容体（GnRHR）とヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）に関連した文献調査を行った結果、GnRHR 結合阻害による妊娠損失と、HDAC 阻害による発生毒性の AOP を開発した。

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、令和元年度にデータベース化した化学物質をカテゴリーごとに分類し、分配係数および代謝パラメータ値と物質の特性との相関性を解析し、これらのパラメータ値の推定法を得た。次いで、生理学的薬物動態（PBPK）モデルで化学物質の体内動態を推定し、その妥当性を確認するとともにパラメータ推定値の不確実性等についても定量的に解析し、体内動態推定結果の信頼性を評価した。

研究分担者

本間 正充

国立医薬品食品衛生研究所

副所長

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

杉山 圭一

国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部

部長

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

広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所・安全性予測評価部

部長

石田 誠一

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

客員研究員

A. 研究目的

試験データのない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。さらに、動物福祉の観点から動物実験の削減の流れも着実に進んでいる。こうした動向に対応するため、現状の*in silico*評価の技術レベルの向上、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、AOPに基づいて*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）のコンセプトが整理されつつある。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

ヒトへの毒性を高精度で予測する*in silico*評価技術を確認し、IATAに基づいてヒト健康リスク評価のストラテジーを進化させる動きが加速すると考えられる。

本研究では、有害性評価の長年の経験を有する専門家が選別した信頼性が高い試験データセットを用いて、QSAR並びにカテゴリーアプローチ手法の精度を向上させ、得られた成果を基に、国際的な調和の動向を取り入れた*in silico*予測評価ストラテジーを開発する。

Ames変異原性については、これまで我が国で行われた安衛法Ames試験データを収集し、大規模データベースを構築した。その数は約13000物質になる。データベースを精査すると共に、このデータをベンチマークデータセットとして、世界中のQSARベンダーに提供し、全てのQSARツールの予測率の向上を目指した第2回国際チャレンジプロジェクトを始動する。また、データベースを解析し、基本構造は同一でAmes試験結果（陽性・陰性）が異なる互変異性体物質について被験溶媒や構造に注目した解析を実施し、要因解明を図り、Ames実試験による検証を行う。更に既存データベースの充実を目的としたAmes試験も実施する。（本間・古濱）

*In vitro*試験の代謝系（肝S9画分）と*in vivo*試験（生体）間の代謝の違いは、異なる遺伝毒性試験結果を引き起こす可能性がある。これらの代謝の相違に関する知見を考慮した遺伝毒性予測モデルを構築することにより、精緻な*in vivo*遺伝毒性予測の可能性を探る。（杉山）

反復投与毒性については、化学構造から効果的に毒性を予測する手法の実用化に向けて、国内外の公開データベースを統合し、

化学物質に関する既知毒性情報を網羅的に検索・解析可能なデータベース（NIHS統合DB）を構築する。さらに、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する。それらを有効に活用し、さらに体内動態・代謝・毒性機序等に関する情報を体系的に整理・集約して、カテゴリーアプローチにより毒性を評価する手法の高度化を目指す。（山田）

さらに、AOP キーイベントに基づくリードアクロスモデルの精度向上に関しては、毒性エンドポイントに関連するキーイベント情報とそれらから構成される AOP に基づいた毒性予測性の向上をめざしており、令和 2 年度は生殖発生毒性の予測性を向上させるための新たな AOP 開発の開発を行うことを目的とする。（広瀬）

化学物質の体内動態予測システムの基盤整備では、昨年度に作成したデータベースのヒトの分配係数と代謝パラメータの値に基づく *in silico* 手法を用いてパラメータ推定し、それらを用い PBPK モデルでヒト体内動態を推定する。体内動態の測定データ等との比較により、推定に伴う不確実性等を定量的に解析し、有害性情報の補完における *in silico*-PBPK モデルの有用性を検証する。さらに、OECD で整備を進めるガイダンスのケーススタディに採用された *in silico* 体内動態推定モデルとの比較検証を行う。（石田）

B. 研究方法

B.1. 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（本間・古濱）

前年度に続けて安衛法試験結果のデータベース精密化を続けると同時に、詳細デー

タベースを用いた Ames/QSAR ツールの予測性の向上を目指す新たな国際チャレンジプロジェクトを開始した。また、既存の CGX、ハンセンデータベースと共に試験結果を再評価した。評価が困難な物質に関しては実際に Ames 試験を実施し、結果を検証した。これら作業により信頼性の高いデータのみからなるベンチマークデータセットの構築を目指す。更に、基本構造は同一で安衛法 Ames 試験結果（陽性・陰性）が異なる互変異性体の類似化合物の DMSO 溶媒とアセトン溶媒・水溶媒での Ames 試験を実施した。

B.2. 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（杉山）

In vitro/in vivo 遺伝毒性試験結果の相違の要因を代謝活性化の観点から比較検討した結果、主要因として代謝酵素の発現と遺伝毒性試験の曝露時間が挙げられた。現行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には、これらの違いが反映される仕組みではない。前者への対応として、*in vivo* 特異的な構造的特徴によるアラートを導入した。後者への対応として、*in vitro* モデルでは、実験的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。更に、*in vivo/in vitro* 両モデルで、従来はアラートに基づき学習データとの適合性を向上させる補正因子を組合せて遺伝毒性の有無を判定していたが、付加体の生成量に対し陽性となる閾値を設定、遺伝毒性の有無を決定した。改変した速度論的モデルの性能を従来の非速度論的モデルと検証した。

B.3. 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 (山田)

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統合データセットについて、データキュレーションを行った。化審法の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。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。

NIHS統合DBを利用したカテゴリーアプローチの高度化では、神経毒性影響が懸念される物質について、想定機序を考慮して神経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)を特定した。続いて、ADMET Predictorを利用して物質の体内動態に寄与する物理化学的及び生物薬学的 (Physico-Chemical Properties: PCP/Bio-Chemical Properties: BCP) パラメータを算出し、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。

B.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリードアクロスモデルの精度向上に関する研究 (広瀬)

昨年度は、毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連性、データセットに含まれる物質の数から、GnRHRと生殖毒性の間のシグナルについてのAOPの作成を試みたが、その中

に多く含まれるニトロベンゼン類の調査ではグルタチオンの枯渇による酸化ストレスによる精巣毒性のAOP作成に焦点を当てた。今年度はGnRHRによる本来の生物学的影響の蓋然性に基づき、様々な生殖発生毒性のエンドポイントとGnRHR変調の間の因果関係について文献調査を実施し、GnRHR阻害によるAOPの作成を試みた。また、昨年度のデータセットとToxCast試験結果との相関マイニングによって、発生生殖毒性が潜在すると特定されたHDAC阻害と発生毒性に関連したAOPの作成を試みた。

B.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備とIATAへの適用に関する研究 (石田)

データベース化した200超の物質を分子間相互作用 (van der Waals力、双極子-双極子相互作用、水素結合、イオン-イオン相互作用) の観点から4カテゴリーに分類し、検討対象物質として選択したエチルtert-ブチルエーテル (ETBE) と同一のカテゴリーの物質について、血液/空気および組織/血液分配係数と物性との相関性を解析した。代謝パラメータ (V_{max} 、 K_m) は、van der Waals力および双極子-双極子相互作用が主に作用する物質を対象に、構造フラグメントの出現数との相関性を解析した。並行して、PBPKモデルを作成し、吸入および経口摂取に伴う化学物質のヒト血中濃度を推定し、既報値と比較し、再現性を検証した。このPBPKモデルにMonte Carlo法を組み込み、回帰式で推定したパラメータ値を用いて、ETBEの吸入曝露に伴うヒト体内動態を不確実性ととともに推定し、WHO文書に従って、各パラメータがモデル推定結果に及ぼす感度と不確実性を定量的に解析し、推定結果の信頼性を評価した。また、OECDのガイド

ンスに示された医薬品等10物質の内分泌かく乱影響の*in vitro-in vivo*外挿 (IVIVE) に関するケーススタディにラットPBPKモデルを適用して同様のIVIVEを実施し、推定結果を比較した。

(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. 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 (本間・古濱)

詳細データベースについて、令和2年度は陰性データ約6000件の更新を行った。

QSARツールの予測性の向上を目指す第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトを始動した。開始当初の2020年3月末では8か国13チームの参加であったが、2021年3月末には10か国19チームの参加となった。これらのチームは国立医薬品食品衛生研究所で精査した12134物質を学習データとして提供を受け、2020年12月末を期限に1589物質の予測に挑戦した。2021年3月時点で全チームから回答が得られた。計算化学ソフトウェアMOEを用いて予測結果を解析中であり、モデル情報の解析も進めていく。また、Ames試験陽性ではあるが試験報告が古く、信頼性に欠け、さらにQSARでは陰性を示す化合物、またはその逆の挙動を示す化合物について平成30年からAmes試験を実施し、結果の検証を行っている。平成30年度は6化合物を試験し、1化合物(4'-(chloroacetyl) acetanilide) が間違っ陽性とデータベース化されていることを明らかにした。平成31年度は2化合物について試験を実施しデータベースの結果の間違いが

無いことが確認できた。令和2年度は3化合物 (*p*-nitrotoluene と 1-chlorobutane と 2,5,8,11-tetraoxadodecane) の試験を実施し、陽性の報告であった1化合物は陰性の間違いと確認できた。更に、基本構造は同一で安衛法Ames試験結果(陽性・陰性)が異なる物質の類似化合物である1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione についてはDMSO溶媒とアセトン溶媒、Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate について水溶媒でのAmes試験を実施し、溶媒や構造に関する検討を行い、すべて陰性の結果が得られた。安衛法で試験された物質では置換基がAmes判定に影響を及ぼしたことが考えられることから、置換基効果を考慮した更なる検討と解析が必要である。

量子化学計算プログラムMOPAC2016のPM7ハミルトニアン計算により試験対象物質の互変異性体のイオン化構造のしやすさやなどの解析を試みたが、解析は容易ではなく、更なる考察と検討も必要であることがわかった。

C.2. 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 (杉山)

これまでの解析結果から、*in vitro* Ames陰性・*in vivo* げっ歯類トランスジェニック突然変異試験(TGR)陽性4物質の内3物質、*in vitro* 染色体異常試験(CA)陰性・*in vivo*小核試験(MN)陽性12物質の内8物質は、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、残りの物質は遺伝毒性試験の曝露時間が要因と説明付けられていた。

*In vivo*で活性化を受けるTGR3物質およびMN8物質は、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*モデルに*in vivo*特異的アラートを設定し、TGR3物質およびMN8物質の陽性予測が可能になった。

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)と比較してFP率(120物質)が低くなった。一方、偽陰性率は、速度論的Amesモデル(244物質)と非速度論的Amesモデル(247物質)との間に差がなかった。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)に比べて速度論的CAモデルのFP率(48物質)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。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ことで初めて達せられた。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)は、非速度論的MNモデルにおける陽性適中数(181物質)より少なかった。速度論的MNモデルの感度が低いことは、アラートに対する補正因子および解毒経路の排除によって生じるFPの解消を目的として、効力閾値を高く設定しているため妥当な結果であった。

C.3. 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(山田)

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。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。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。化学構造情報から毒性情報を検索するだけでなく、毒性所見から化学構造を検索することが可能となり、カテゴリーアプローチの開発に有用なデータベースを完成させた。

統合データベースを利用して神経毒性が懸念される物質について詳細に解析し、更に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KFG14種類を特定した。続いて、KFGを有し神経毒性を発現する物質について、神経系への移行性が毒性発現と関連がある可能性を考慮し、物質の体内動態に寄与するPCP/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。定義されたカテゴリー領域内に入るものの、神経毒性を発現しないと判定されていたデータセット化合物について、毒性情報を再度詳細に調査したところ、別試験で神経毒性を発現することが明らかになった事例を複数示すことができ、今回検討したアプローチの妥当性と有効性を示唆する結果が得られた。

C.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリ

ドアクロスモデルの精度向上に関する研究 (広瀬)

GnRHRに関するAOPの開発については、GnRHRへの結合阻害が、特に着床と胎盤の発生および機能の妨害を通して妊娠損失の増加を引き起こす可能性があるというエビデンスで裏付けられた。動物におけるエビデンスとしては、ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) アゴニストおよびアンタゴニストの両方を用いた前臨床 *in vivo* 毒性試験では、これらのタイプの化合物の投与により胚・胎児毒性が生じる可能性があることが示されている。また、GnRHにより調節されるシグナル伝達分子の遺伝子 (ERK1 および ERK2) を胎盤で選択的にノックアウト (KO) したマウスの試験では、妊娠期間延長、胎盤構造の異常、産仔数減少および新生児死亡率増加が認められた。一方ヒトへの適用可能性については、ヒト胎盤細胞を用いた *in vitro* 試験で、GnRH デカペプチドと GnRHR-I はヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の発現を調節することが示されており、妊娠初期における黄体の維持などの機能を介して、流産など妊娠損失に関連することが想定される。また、GnRH は哺乳類において着床を調節する重要な因子として特定されている。以上の知見を総合して、[GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化 => 着床障害 => 妊娠損失の増加] 及び [GnRHR 結合 => GnRHR 不活性化 => 胎盤の構造および機能障害 => 妊娠損失の増加] という2系統のAOPを開発した。

HDAC 阻害薬に分類されるいくつかの化合物は、実験動物に催奇形性反応を示し、心欠陥、骨格奇形および神経管閉鎖障害などがある。神経管欠陥は、ヒトとマウスのモデルのみで認められた。HDAC は遺伝子

発現の調節に関与し、HDAC によって促進されるヒストンの脱アセチル化によって遺伝子発現の抑制が生じる。正常な胎芽・胎児発生のためには遺伝子発現の慎重な調節が必要であり、不規則な遺伝子発現による HDAC 機能障害は心奇形や骨発生障害などの多くの発生異常を示す。文献調査の結果、阻害から中軸骨格欠損に至る3系統のAOP (HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => レチノイン酸依存性遺伝子転写の増加=>原腸形成障害 => 中軸骨格欠損; HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => Runt 関連因子2シグナル伝達変調 => 骨形成障害 => 軟骨内骨化障害 => 中軸骨格欠損; HDAC 阻害 => 過剰アセチル化 => 軟骨形成障害 => 軟骨内骨化障害 => 中軸骨格欠損) を開発した。

C.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備とIATAへの適用に関する研究(石田)

空気/血液分配係数は、ヘンリー則定数との相関を、肝臓、脂肪、高血流組織および低血流組織と血液間の分配係数は、オクタノール/水分配係数との相関を解析し、線型回帰式を得た。代謝パラメータの解析では Free-Wilson法により12の構造フラグメントとのVmaxおよびKmの線型重回帰式を得た。並行して、トルエン等の吸入曝露およびイソプロパノール等の経口摂取時のヒト体内動態をPBPKモデルで推定し、推定血中濃度を既報測定値と比較した。推定値は、測定値をほぼ再現しており、作成したPBPKモデルの体内動態予測能の妥当性が確認された。さらに、回帰式で推定されたパラメータ値を用いてこのPBPKモデルで推定された吸入ETBEのヒト血中濃度の中央値は、測定値を2倍ほど過大に推定した。感度および不確

実性の解析の結果、内部用量指標のETBEの血中最大濃度および濃度曲線下面積(AUC)には空気/血液分配係数が大きく影響し、体内動態推定の信頼度は中程度と判定された。また、医薬品等10物質の血中濃度を計算し、OECDのケーススタディで報告された値と比較した結果、良い一致が見られ、*in vitro*の内分泌かく乱関連影響の最低影響濃度からIVIVEで外挿された各物質の経口用量も、ケーススタディの値とほぼ一致した。

D. 考察

D.1. 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(本間・古濱)

QSARの予測精度の向上にはモデルに使用するデータベースの量と質に依存する。安衛法 Ames 試験報告書は世界最大規模のAmes試験データソースであり、極めて高精度のQSARモデルの開発に有用と考えられるが、有効に利用するためにはデータベースの構築と、試験結果の信頼性の確保が重要である。詳細データベースを提供した第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトの実施によりQSARツールのボトムアップが見込まれ、予測率はさらに向上することが期待できる。専門家による再評価でも結果の判定が困難である場合は、実際にAmes試験を実施し、結果の確認を行うことが重要である。データベース情報を活用した考察と量子化学計算を含む構造の解析も含め、検証作業を繰り返すことにより、QSARの予測能向上が期待できる。

D.2. 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(杉山)

*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。

TIMESの*in vivo*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*遺伝毒性予測モデルには、速度論的視点に加えて、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困難である。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るようになれば、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。

今回提案したTIMESによる速度論的モデルを用いることで、*in vitro* Ames陰性・*in vivo* TGR陽性4物質および*in vitro* CA陰性・*in vivo* MN陽性12物質の正しい予測(*in vitro*は陰性、*in vivo*は陽性)が可能となった。

閾値は偽陽性を減らす効果がある反面、速度論的MNモデルに見られるように、感度を下げってしまう懸念もある。陽性物質を含む外部バリデーションによる検証の実施も今後の課題である。

D.3. 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(山田)

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・更改された。しかしな

がら、それらが別々に存在したままでは、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アプローチの適用範囲拡大は難しい。そこで本研究では、国内外の公開データベースの統合化を遂行した。物質・試験数の拡充、ケミカルスペースの拡大を達成するとともに、共通した部分構造をもつ物質の検索および類似した毒性影響をもつ物質の検索が容易になった。本研究では、肝毒性、血液毒性、神経毒性を対象としたカテゴリアプローチを検討してきたが、今後は内分泌器官や生殖器等の他臓器毒性に対する統合的アプローチにも利用できる有用なデータソースになると期待される。

NIHS統合DBの有用性を証明する一環として、KFGに基づくグルーピング化による神経毒性に対する予測系構築に取り組んだ。神経毒性発現が未判定若しくは当初負の判定の化合物について、毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となる部分構造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複数挙げる事ができた。有害性の評価の現場では、毒性試験の投与量設定に依存して神経毒性影響が明瞭でないケースがあり、しばしば評価が困難となっている。神経毒性と関連性が懸念される構造を抽出して、そのグループの特徴や領域を現在可能な範囲で明確にできたことにより、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。

D.4. 反復投与毒性のAOPキーイベントリー ドアクロスモデルの精度向上に関する研究 (広瀬)

昨年度の毒性学的懸念領域と生殖毒性の関連性に関するデータセットに含まれる標的の中から、GnRHRと生殖毒性の間のシグナルについてのAOPの作成を試み、そのデータセットに多く含まれるニトロベンゼン類を対象として調査では、結果的にグルタチオンの枯渇による酸化ストレスが引き起こす精巣毒性という初期の想定とは異なるAOPが見いだされることとなった、今年度はGnRHRによる生物学的影響の蓋然性にに基づき、さらなる文献調査を実施した結果、裏付けとなるエビデンスのレビューおよびこれらを整理することにより、標的に関連した発生毒性の原因が存在し、有害性発現に至る妥当な機序の説明が可能であると考えられたため、GnRHR結合を介した妊娠損失の増加に関するAOPを構築することができた。しかし、複数の動物種から得られたエビデンスは、妊娠維持におけるGnRHRの重要性を裏付けているものの、hCGを介した系はヒトおよび一部の高等霊長類でしか観察されていないなどの不確実性が示された。

一方、HDAC阻害AOPについては、HDACの阻害から生じ得るいくつかの有害転帰を記述している。個々のHDACアイソフォームの固有の機能はマウスの遺伝子KO) 試験によって解明されているが、機能の冗長性は全てのアイソフォームに存在し、HDAC阻害薬が多数のアイソフォームをターゲットにする可能性があるため、特定の有害転帰が特定のアイソフォームの攪乱に起因する確実性は低いことや、多数のHDAC阻害薬は動物モデルで催奇形性であり、有害転帰の中でもとりわけ中軸骨格欠損を生じることが明らかにされているが、バルプロ酸および他のHDAC阻害薬については、HDAC

に対する影響に起因する可能性ではないことも示唆されていることなどの、不確実性が残っている。

本研究では、生殖発生毒性を引き起こす GnRHR 結合や HDAC 阻害についての AOP が合成できる可能性があることが明らかとなった。これらの経路の開発は、Lhasa の AOP DART ネットワークにおける既存の知識（エストロゲンシグナル伝達知識と重複）を活用し、データベースにおける経路の知識を拡大する可能性がある。提示した事例研究では、単一の AOP の観点からデータを評価することに焦点を当てた。これらの AOP ネットワークを利用して未解明の部分に新たな毒性機序に関する仮説を立て、AOP 内の各イベントを各種 (*in vitro*) 試験法等に関連付けることで検証を行いながら、新たな試験戦略を構築できる可能性も広がると考えられた。

D.5. 化学物質の体内動態予測システムの基盤整備と IATA への適用に関する研究(石田)

本年度の結果は、吸入曝露濃度や経口摂取量からヒトや実験動物での内部用量指標（最高濃度、AUC、代謝物生成量等）を推定する”forward dosimetry”のみならず、*in vitro*試験液中濃度を *in vivo*投与量に等価な量に変換する”reverse dosimetry”にも PBPK モデルが適用可能なことを示唆していると考えられる。これにより、量-反応評価での種間、曝露経路間の外挿に加えて、IVIVE への適用も可能となり、PBPK モデルは今後ますます一般化学物質の有害性情報の補完においても重要になると考えられる。また、PBPK モデルに Monte Carlo シミュレーション技法を組み合わせることで、生理学的あるいは物質特異的なパラメータに付随す

る不確実性が体内動態推定結果の信頼性に及ぼす影響の程度を定量化でき、補完される有害性情報の信頼性評価を容易にすると考えられる。

E. 結論

遺伝毒性については、これまでの成果を用いて Ames 試験予測 QSAR モデルの向上を目指した第2回国際チャレンジプロジェクトを始動した。その上で、さらなる予測性の向上を目指す Ames 試験や詳細データを活用した解析を進めた。

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ー 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。

反復投与毒性については、国内外の公開反復投与毒性試験データを統合したデータベースを完成させた。化審法新規化学物質の毒性データも統合化を完了した。さらに、統合データベースの利用として、神経毒性を対象に毒性の発現に寄与すると考えられる鍵となる部分構造と体内動態に寄与する物理化学的・生物薬学的パラメータ領域を検討し、一貫性のある神経毒性の評価に資する精度の高い情報の提供を可能とした。

さらに、生殖毒性試験結果と既知の発生毒性に関する情報を元にして新規の AOP を開発するという手法に基づき特定された標的のうち、GnRHR 結合阻害による妊娠損失

と、HDAC阻害による発生毒性のAOPを開発した。

体内動態予測システムの基盤整備では、PBPKモデルは”forward dosimetry”および”reverse dosimetry”に有用であることが示された。さらに、PBPKモデルにMonte Carloシミュレーションを導入することにより、*in silico*-PBPK法による体内動態推定の信頼性評価が可能であることが示唆された。このような定量的な信頼性評価は、IVIVEにおけるPBPKモデルによる”reverse dosimetry”の妥当性を容易にすると考えられる。

F. その他 - OECD他の海外動向と調和活動 -

本研究班は前研究班（平成27-29年度）に引き続き、OECDと連携してそ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た。前研究班の分担研究の継続としてエチレングリコールメチルエーテル誘導体を化審法化学物質インベントリからスクリーニングし、その精巢毒性をカテゴリーアプローチにより予測評価するケーススタディを2018年にIATA Case Studies Projectに提出し、専門家レビュー後の2019年に正式に承認された。各国で高懸念物質としてリスト化されるEGMEの類似物質を機序に基づいて主要な毒性を予測した事例として高く評価された。その後、OECDの推薦により同ケーススタディをEU-ToxRiskの2019年のワークショップで紹介し、毒性予測の信頼性向上のためのNew Approach Methodologyの利用に関する助言文書作成（2020年）に貢献した。さらに米国 ICCVAM Read-Across Work Groupでも同ケーススタディを2019年に紹

介し、その後のリードアクロス適用のための基本原則の確立のための議論に継続して参加している。また、欧州食品安全庁EFSAでは、2020年よりリードアクロスのガイダンス作成のための議論を開始した。毒性エンドポイント毎（遺伝毒性、次いで反復投与毒性）にガイダンスをまとめていくことが予定されており、本専門家グループの議論に参加している。ここでも毒性発現につながるキーイベントデータの活用が主要なテーマのひとつとなっている。OECDを軸にして海外諸機関と同手法の国際的なガイダンス作成に継続的に貢献してきた。

2019年のOECD QSAR Toolbox Management Group会議では、本分担研究で作成した生殖発生毒性のデータベースをQSAR Toolboxに提供することを表明し、質の高いデータ提供を歓迎された。すでにQSAR Toolboxに実装されている他の生殖発生毒性データと合わせて、カテゴリー解析やグルーピング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。同データベースは完成し、QSAR Toolbox事務局と相談の上、2021年1月にOECDに提供した。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るQSAR Toolbox ver.4.5（2021年前半公開予定）に実装される。

化学物質の体内動態推計は定量的な毒性予測において必須の要素となりつつある。現在OECDの専門家グループによりPBPKモデル検証のガイダンスを取りまとめ中であることから、本分担研究ではこの最新動向を参考にして、体内動態予測の事例研究を実施した。

以上、本研究はOECDを軸とした国際動向に対応しつつ、それら活動の国際的な調和にも貢献した。

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Honma M. An assessment of mutagenicity of chemical substances by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 2020; 42:23. doi: 10.1186/s41021-020-00163-1. PMID: 32626544.
- 2) Van Bossuyt M, Raitano G, Honma M., Van Hoeck E, Vanhaecke T, Rogiers V, Mertens B, Benfenati E. New QSAR models to predict chromosome damaging potential based on the *in vivo* micronucleus test. *Toxicol Lett.* 2020; **329**: 80-84. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.016. PMID: 32360788.
- 3) Honma M., Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 2020; 42:32. doi: 10.1186/s41021-020-00171-1. PMID: 3329276
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Yamazoe Y, Yamada T., Hirose A., Murayama N. Deciphering key

- interactions of ligands with CYP3A4-Template system. *Food Saf (Tokyo)*. 2021, **9**, 10-21.
- 11) 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.
- 12) Igarashi T, Suzuki H, Ushida K, Matsumoto M, Inoue K, Kanno T, Miwa Y, Ishii T, Nagase T, Katsumata Y, Hirose A. Initial hazard assessment of 1,4-dichlorobutane: Genotoxicity tests, 28-day repeated-dose toxicity test, and reproductive/developmental toxicity screening test in rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2020 Apr; 112:104610. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104610. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32032664.
- 13) 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. 学会発表**
- 1) Regulatory Science and Emerging Technology in Japan. Honma M. Global Summit Regulatory Science 2020 (2020年9月 Online, USA)
- 2) 化学物質の変異原性 *in silico* 評価の精緻化：第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 第6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 (2020年11月 Online, 島根)
- 3) Assessment and Control of Mutagenic Impurities in Pharmaceuticals, Honma M, The 5th International Webinar Conference on Pharmaceutical Quality Regulatory Sciences (2020年11月 Online, Korea)
- 4) 医薬品中に存在する変異原性不純物の評価と管理手法の最新動向, 本間正充, 第22回 インターフェックス ジャパン セミナー (2020年11月 幕張)
- 5) 異性体に対する Ames 予測の試みと 2nd Ames/QSAR International Challenge Project の状況, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 日本環境変異原学会第49回大会 (2020年11月 沼津)
- 6) 生活環境で極低レベルで摂取する遺伝毒性発がん物質の安全性評価と管理, 本間正充, 日本環境変異原学会第49回大会基調講演 (2020年11月 沼津)
- 7) ICH-M7 ガイドラインの基本的事項、Q&A の解説及び最近のトピック, 本間正充, 令和2年度関西医薬品協会技術研究委員会研修講演会 (2020年12月 Online, 大阪)
- 8) 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)
- 9) 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)

- 10) 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—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)
- 11) 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—ノナン—1—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)
- 12) 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)
- 13) 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).
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) Development of initial environmental risk assessment methods for pharmaceuticals by using Eco-QSAR system. Hirose A, Kobayashi N, Kurimoto M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Yamada T. SETAC Europe 30th Annual Meeting (May 2020, Online)
- 17) OECD における Wnt/beta-catenin シグナルがん悪性化に関連する Adverse Outcome Pathway (AOP)の開発, 田邊 思帆里, 青柳 一彦, Sabina QUADER, Horacio CABRAL, 小野 竜一, 広瀬 明彦, 横崎 宏, 佐々木 博己, 第 47 回日本毒性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 18) 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)
- 19) 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—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

彦, 第 47 回日本毒性学会学術大会
(2020 年 6 月 Online)

- 20) 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)
- 21) 食品用器具・容器包装のポジティブリス
トに記載されているナノ物質も含
む無機化学物の遺伝毒性評価, 磯 貴
子, 松本 真理子, 鈴木 洋, 杉山 圭一,
本間 正充, 広瀬 明彦, 第 47 回日本毒
性学会学術大会 (2020 年 6 月 Online)
- 22) 短期的緊急時における人の健康を守
るための水道水中汚染物質濃度の提
案, 松本 真理子, 重田善之, 川村 智
子, 井上 薫, 山田 隆志, 広瀬 明彦
, 日本毒性学会 (2020 年 6 月 Web 開
催)
- 23) Derivation of Subacute Guidance Values
of Inorganic Metal Contaminants
Controlled by the Drinking Water Quality
Standards in Japan. Matsumoto M,
Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Iso T,
Hirose A. 2021 SOT Annual Meeting and
ToxExpo (March. 2021, Online)
- 24) 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)

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし