

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3年度 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	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	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	齊藤 亮子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	丸山 多恵子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
研究協力者	山添 康	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	客員研究員

研究要旨

反復投与毒性は、化学物質安全性評価における主要な毒性エンドポイントである。リードアクロスの適用においては、構造類似性と生物学的類似性に基づき、評価対象物質と試験済みの類似物質をグループ化することが必要であるが、毒性機序の情報が限られている場合が多く、適用範囲の拡大は容易ではない。一方で、代謝を受けて共通あるいは極めて類似する毒性物質へ変換するケースのように、代謝の類似性に基づくグループ化は、複雑な全身毒性の予測に対して実際的なアプローチとして期待される。本研究では、反復投与毒性を対象としたリードアクロス手法の適用拡大を目指して、まず代謝予測ツールの調査を行い、続いて代謝予測の信頼性を評価する方法と代謝の類似性に基づく毒性予測を事例研究により検討した。評価対象物質の類似物質の実測代謝を予測できるかを確認することにより、対象物質について信頼性の高い代謝予測とそれに基づくグループ化およびリードアクロスが可能であることを実証した。さらなる事例の積み重ねは必要であるが、他の物質への適用は十分可能であり、規制安全性評価への実装へ向けて実用的なアプローチとなりうると考えられる。

A. 研究目的

反復投与毒性は、化学物質安全性評価における主要な毒性エンドポイントのひとつである。市場に流通する多数の未評価の化学物質について、その毒性評価を加速化させることが求められている。一方で、動物福祉は国際的に大きな流れとなっており、

段階的な動物試験の削減は不可避の情勢となっている。そこで代替アプローチの開発と、予測の不確実性を考慮した評価方法の確立およびその適用範囲の拡大が求められている。

反復投与毒性のような複雑な毒性エンドポイントの予測については、単一の QSAR

の適用は困難であり、OECD や欧米の規制行政機関では、試験と評価のための統合的アプローチ (IATA) の開発が進められている。New Approach Methodology (NAM)は、有害性評価の文脈において、toxicokinetics や toxicodynamics を包含する動物を用いない *in silico*, *in vitro* 等のアプローチを意味し、それらを統合して利用することにより、ヒト健康リスク評価の信頼性を向上させると期待されている。

我々は、上記の国際動向を見据えつつ、反復投与毒性についての予測と評価の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、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。

反復投与毒性のリードアクロスの適用においては、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、毒性メカニズムの情報が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、代謝を受けて共通あるいは極めて類似する物質へ変換するケースのように、代謝の類似性にもとづくグループ化は、特に化学物質の反復投与毒性の予測に対して実際的なアプローチであると考えられ、その適用拡大が期待される。その

ためには、信頼性の高い代謝予測と代謝の類似性評価の方法の確立が求められる。

最近では、さまざまな代謝予測モデルが開発されており、また実際の代謝物に関する実測データの蓄積が進められている。一方で、代謝予測モデルは多数の予測代謝物構造を提示し、その後の判断はユーザーに委ねられる。また、予測モデルには、予測性が高い領域と低い領域が混在していると考えられる。そこで、本研究では、代謝予測の結果の信頼性を評価する方法を検討し、その結果を海外機関で検討中のリードアクロスの標準化したワークフローに従って、毒性予測に適用する。以上の試行に基づき、代謝の類似性に基づく反復投与毒性のリードアクロス手法の確立と適用範囲の拡大を目指すことを目的とする。

さらに、本分担研究では、化学物質のヒトへの毒性影響を評価するために不足する情報を補う手段のひとつとして、ヒト代謝予測手法に着目し、その評価を検討した。毒性試験結果のヒトへの外挿において、評価対象物質のヒトにおける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 代謝に関わるヒト 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. 既存代謝予測ツールの調査

まず、本研究で使用する代謝予測ツールを探索するため、ツールの調査を行った。

予測ツールの開発や比較を行った学術文献と、予測ツールを俯瞰した総説を収集し、既存の代謝予測ツールについて、名称、製作者、概要、対象とする生物種、酵素や反応、関連文献、データセットの公開/非公開、有償/無償などの使用する上で有益な情報を整理し、表にまとめた。また、インターネット上で公開または紹介されている代謝予測ツールの情報を同様に収集し、整理した。

収集した代謝予測ツールの中から、本研究において解析や調査に用いるツールの選定を行った。

B.2. 代謝物予測に基づく毒性予測

代謝物が毒性発現に関与すると考えられる化学物質のグループにおいて、*in vivo* 毒性試験データおよび *in vivo* あるいは *in vitro* 代謝試験データを用いて、*in silico* 代謝物予測の妥当性を検証した。さらに、これらのデータが利用できないか一部が欠損している類縁物質について、代謝予測ツールを用いて予測される代謝物にもとづいて毒性の予測を行った。

In vivo 毒性データは NIHS 統合 DB の反復毒性試験結果から収集し、*in vivo* あるいは *in vitro* 代謝実験データは HESS (Hazard Evaluation Support System ver.4.2) データベースおよび QSAR Toolbox (ver.4.5) を用いて収集した。毒性が既知の物質については、その内容を精査し、化審法スクリーニング評価の有害性クラス (CSCL Hazard Class) に割り当てた。

検討した物質のグループはジクロロニト

ロベンゼン異性体である。ニトロ基が還元されてアニリンを生成すると考えられるが、一方で赤血球や肝臓での代謝の結果、グルタチオン (GSH) 枯渇を惹起し、血液毒性および肝毒性を引き起こす可能性がある。

In silico 代謝予測は、Lhasa 社の Meteor Nexus (v.3.1.0) と、MetaQSAR の代謝情報をもとに代謝物を予測する GLORYx (ver.1.0)を用いて行った。両ツールは、Phase I および Phase II 代謝物を予測する。前者は、OECD IATA Case Studies Project での毒性予測の事例研究においてよく用いられており、後者はその前身の GLORY とともに、創薬分野で近年よく使用されているとされる。

さらに、同様の代謝と毒性メカニズムを有すると考えられる未評価の物質について、化学構造と *in silico* 代謝予測データにもとづいて、適切な類似物質を選定して正当化し、リードアクロスにより毒性影響と NOAEL または LOAEL を推定し、CSCL Hazard Class を割り当てた。

B.3. ヒト P450 代謝予測モデルの性能評価

SMARTCyp (コペンハーゲン大学、バージョン情報なし)、ADMET Predictor (ver. 10.3) (SimulationsPlus)、GLORY (ウィーン大学、バージョン情報なし)の 3 つの代謝予測ツールについて、ヒト CYP3A4 を対象に、代謝予測モデルを調査した。トレーニングデータセットへのアクセスの可能性、適用範囲に関する情報、予測結果の出力形式を比較することにより特徴を整理した。予測精度は、Yamazoe (2021)に記載されている CYP3A4 の基質 (44 物質) の構造情報を用いて、SMARTCyp については、上

位 3 位の代謝予測部位を Yamazoe らの報告¹⁾に記載されている代謝部位と比較した。ADMET Predictor と GLORY は代謝部位と代謝物を表示するので、収集した代謝マップから代謝物を確認し、予測代謝物の構造と比較した。

上位 3 位までの予測代謝部位から推測される代謝物または予測代謝物に実測代謝物が含まれているかを調べることにより予測精度を評価した。

(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. 結果

C.1. 既存代謝予測ツールの調査

収集した中から、比較的良好な文献などで引用、活用されている一部を表 1 にまとめた。

代謝予測ツールは、反応部位予測と代謝物予測に大別でき、さらに、生物種や対象とする酵素や反応によって分類できた。生物種はヒトやほ乳類を対象とするものが多かったが、明示されていないものや、腸内代謝などが選択できるツールもあった。専門家による知識をベースにルールを構築したものや、代謝物や代謝部位のデータセットの学習により予測を行うものがあった。P450 やその司る Phase I の代謝反応に限定したものや、Phase I 及び Phase II の個別の酵素ごとの反応を予測するもの、関連する酵素群によって最終的に生成される代謝物を導出するものなどがあった。

ツール開発に用いられたデータセットは、ツールの適用範囲などの確認に非常に有用であるが、企業の開発したツールについて

は公開されることは稀で、研究機関の開発したものでも、具体的なデータセット自体は非公開のものも多かった。

予測ツールの性能に関しては、一般に、予測が実測とどの程度一致しているかという正確性の指標として “Precision (適合率)”、予測が実測をどの程度カバーしているかという網羅性の指標として “Recall (再現率)” で評価されていた。以下に式を示す。

$$\text{Precision} = \frac{\text{True Positive 代謝物数}}{\text{(総予測代謝物数)}}$$

$$\text{Recall} = \frac{\text{True Positive 代謝物数}}{\text{(総実測代謝物数)}}$$

予測結果は部位または物質の一覧として出力されるが、独自のスコアにより確度の高い結果を提案するツールや、モードの切り替えにより確度の高い結果に絞り込んだり、可能性のある候補を幅広く示したりできるツール、関連する実測情報を参照できるツールなどもあった。

これらの中から、知識ベースの Meteor Nexus (Meteor)、機械学習モデルの GLORYx を選定し、今後の解析に用いることとした。

なお、これまでに多数の代謝予測ツールが開発されてきているが、開発者自身の研究に活用する目的で詳細が非公開のものや、開発後のメンテナンス、アップデート、公開が継続されていないものも多く、研究開発で得られた知見の継承、発展が難しいことが懸念された。

C.2. 代謝物予測に基づく毒性予測

1,3-Dichloro-2-nitrobenzene (member 1) と 1,3-dichloro-5-nitrobenzene (member 2) を対

象に、化審法スクリーニング評価を想定して、リードアクロスにより反復投与毒性の主要な毒性影響と毒性レベルを予測し、CSCL Hazard Class の分類を行った [ステップ 1 : 課題設定]。

評価対象物質は、NIHS 統合 DB および ECHA REACH のデータベースの検索の結果、反復投与毒性試験データが利用できないことが判明したので、当該物質とその類似物質について、毒性と関連すると考えられる物理化学性状、代謝、想定機序情報を収集することとした[ステップ 2 : データギャップ分析]。

ベンゼン環に塩素原子とニトロ基をもつ物質を NIHS 統合 DB 中で検索した結果、4 個のジクロロニトロベンゼン異性体 (member 3~6) と、2 個のモノクロロニトロベンゼン異性体 (member 7, 8) が確認された (表 2) [ステップ 3 : 類似物質の同定]。

Member 3-6 は、溶血影響が LOAEL の推定根拠となる leading effect であった。Member 5 のみ溶血影響と肝毒性影響が同用量から発現した。

本カテゴリーの溶血毒性機序は、GSH 抱合の進行に伴う GSH の枯渇と酸化ストレスの誘導と、ニトロ基の還元によるアニリン類縁体への変換に至るプロセスで生成すると考えられる、反応性が高い N-水酸化体のヘモグロビンへの作用である。肝毒性機序は複雑であるが、溶血機序と類似して GSH との抱合に伴う GSH 枯渇および反応性が高い N-水酸化体の生体高分子への作用が毒性発現に至るトリガーであると考えられる。

Meteor および GLORYx の代謝予測ツ

ールの結果は、おおむねハロゲンとの GSH 抱合を予測した。しかし、ニトロ基に対してメタ位にハロゲンを持つ member 7 (1-chloro-3-nitrobenzene)の予測結果が異なっていた。この代謝予測の結果の違いは、両予測ツールに登録されている代謝ルールの違いによるものであると考えられた (図 1)。

実測の代謝データが利用できる member 3, 6, および 7 の予測代謝物と、実際に検出された代謝物を比較すると、Meteor は、パラ位またはオルト位の GSH 抱合、およびニトロ基のアミノ基への還元を正しく予測した。さらに、メタ位は GSH 抱合を受けず、ニトロ基がアミノ基に還元されることを正しく予測した。よって、このグループの代謝予測には、Meteor を活用することが妥当と考えられた。

上記の結果から、評価対象物質 member 1 は、その代謝はオルト位の GSH 抱合、およびニトロ基のアミノ基への還元が優先的に進むと予測された。代謝の類似性および毒性を過小評価しないことを考慮して member 6 (2,4-dichloro-1-nitrobenzene)を適切な類似物質として選択した [ステップ 4 : 類似物質の評価 (member 1)]。

Member 6 の主要な毒性 (溶血) および LOAEL 値をリードアクロスして LOAEL は 8 mg/kg/d と推定された。有害性評価値 (D value) は不確実性係数 6000 (LOAEL 使用、慢性への外挿、ヒトへの外挿それぞれ 10、6、100) で除して 0.00013 と算出され、CSCL Hazard Class 2 が割り当てられた [ステップ 5 : データギャップ補完 (member 1)]。

Member 1 は member 6 の位置異性体であり、GSH 抱合が進む点において類似しているとしたが、その反応速度や GSH 枯渇の

レベルの違いにどの程度違いがあるか不確実性がある。しかし、既存の代謝情報を総合すると GSH 抱合はパラ位がオルト位より優先的であることが示唆されることから、member 6 の方が GSH 抱合は進みやすく、毒性（溶血影響）は強いと考えられる。また member 6 はもっとも厳しい CSCL Hazard Class 2 であることから、member 6 からのリードアクロス予測に基づく member 1 の有害性クラス分類は過小評価していないと考えられ、上記の不確実性は許容できる [ステップ 6：不確実性評価 (member 1)]。

一方、評価対象物質 member 2 (1,3-dichloro-5-nitrobenzene) は、2 カ所のメタ位に Cl 原子が置換しており、その代謝は GSH 抱合ではなくニトロ基の還元が優先的であると予測された。そこで、同様の代謝経路を示す member 7 をリードアクロスする類似物質として選択した [ステップ 4：類似物質の評価 (member 2)]。

Member 7 の主要な毒性（溶血）をリードアクロスして、LOAEL 値は 1 mg/kg/d と予測された。D-value は 0.00017 と算出され、CSCL Hazard Class 2 が割り当てられた [ステップ 5：データギャップ補完 (member 2)]。

Member 2 は member 7 と比較すると置換している Cl 原子の数が 1 個多いため、疎水性が高く、生体内への吸収がより大きい可能性がある。したがって、member 7 から member 2 へのリードアクロスによる毒性予測は過小評価の懸念がある。しかし、member 3-7 の 4 つの dichloronitrobenzene 異性体の毒性レベルは、member 7 のそれと同等かむしろ弱い傾向にあり、Cl 原子置換数 1 個の増加は毒性レベルの増強に大きな影

響は与えないことが示唆される。また、member 7 は CSCL Hazard Class 2 であることから、member 2 の有害性クラス分類は過小評価していないと考えられ、上記の不確実性は許容できる [ステップ 6：不確実性評価 (member 2)]。

C.3. ヒト P450 代謝予測モデルの性能評価

SMARTCyp、ADMET Predictor、GLORY の 3 つのツールについて、相互比較によりその機能の相違点を整理した。SMARTCyp は、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9 の代謝部位を予測する。このツールは Meteor や Toxtree などの代謝予測ツールにも実装されている。ADMET Predictor は 9 種類の P450 分子種の代謝部位を予測し、それをベースに代謝物の予測を行う。付属の MedChem Designer を組み合わせて、代謝物生成に各 P450 分子種が寄与する割合や各代謝物の生成比率を表示できる。さらに、PBPK モデルを作成する GastroPlus と一体的に利用することも可能である。GLORY は同じくウィーン大学で開発された代謝部位予測ツールである FAME 2 の予測結果に基づいて代謝物の構造を予測する。このツールは CYP3A4 を含む 3 つの P450 分子種の代謝物構造を予測する。これらのアウトプットの様式は付録 1-3 に示した。

次いで、ヒトで最も発現レベルが高い P450 分子種である CYP3A4 について、それぞれのモデルの代謝の予測精度を調べた。Yamazoe らの報告¹⁾に記載されている CYP3A4 の基質となる 44 物質について、それぞれ上位 3 位までの予測代謝物に実測代謝物が含まれるかを解析した。いずれのモデルも比較的高い予測精度が得られたが、

反応機序により予測精度は異なっており、特に N-脱アルキル化反応は高い予測性を示した。一方、環の水酸化反応は、反応を受ける部位の予測性が高くなかった。

使用事例として、クロロアセトアニリド系の Alachlor の構造を上記 3 モデルに供したところ、いずれのモデルも O-脱アルキル化中間代謝物を介して 2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl)-acetamide (CDEPA) が生成されることが示された。

さらに US EPA の Chemical Dashboard で Alachlor のハイスループット bioactivity プロファイルを調査したところ、human CYP3A4 ADME assay に対して positive であった。以上の証拠を統合することにより、Alachlor はヒトで CYP3A4 の基質となり、CDEPA へ代謝される可能性が高いことが示唆された。

以上の代謝予測の結果は、ヒト肝ミクロソームを用いた実試験データより確認できる。Alachlor は CYP3A4 と CYP2B6 により代謝され CDEPA が生成する。本代謝物はラット肝ミクロソームでも同定されている。CDEPA はヒトおよびラットにおいてさらなる代謝を受け、ベンゾキノニンイミン体が生成する²⁾。本代謝物は、反応性が高く閾値がある遺伝毒性発がんに関与すると考えられている。このことから、ヒトとラットは、共通の発がん性代謝物を生成することが示された。しかし、CDEPA の生成に関与する初発の酸化反応の反応速度は、ヒトの方がラットより 10 倍以上遅いことが知られている。

In silico 手法では対象化合物のヒト代謝物（検出が難しい反応性代謝物を含む）の迅速な予測が可能であり、*in vitro* 手法によ

る反応速度に関する情報を得て、動物試験結果に基づく毒性のヒト外挿の信頼性を向上させることができることが示唆された。

D. 考察

本研究では、代謝予測に対して知識ベースの Meteor、機械学習統計モデルの GLORYx を選択した。予測代謝物をスコアとともに提示するが、その確からしさの検証結果はない。代謝予測モデルが提示する複数の代謝物候補をどのように取捨選択していくかについて、確立した方法はない。学習データセットが公開されていないモデルでは、モデルの適用範囲が不明であり、外部検証は難しい。さらに、予測モデルには、予測性の高い領域と低い領域があると考えられる。このような予測の不確実性を把握し、代謝予測の結果の信頼性をどのように評価するかが課題である。

ジクロロニトロベンゼンのケースでは、Meteor は、主要な毒性（溶血影響）に関連すると考えられる GSH 抱合とニトロ基のアミノ基への還元について、実測代謝を正しく予測した。予測結果の根拠を確認したところ Cl 原子の置換位置によって GSH 抱合が進むかどうかを識別するルールが収録されていた。さらに Meteor では、ニトロベンゼン類がアニリン類へ変換されることを収録した根拠文献が提示された。

評価対象物質の類似物質について、実測の代謝を予測モデルが正しく予測できているかを確認することによって、ローカルな領域に限定して代謝予測結果の信頼性を評価することができると考えられる。

そこで適切なモデルの信頼できる予測結果に基づき、代謝の類似性から評価対象物

質と試験済み類似物質をグループ化した。このようなアプローチを導入することは、リードアクロスのための類似物質の選択の正当化、不確実性の低減化に役立つと考えられる。

本アプローチを他のカテゴリー物質の反復投与毒性予測へ拡大適用することを検討中である（ハロアルカン類の肝毒性と腎毒性）。試行を重ねて、このアプローチの妥当性と留意点を整理していく予定である。

OECD QSAR Assessment Framework プロジェクトでは、化学物質の規制安全性評価のエンドポイントについて、*in silico* モデルによる予測結果の信頼性を評価する方法の原則を取りまとめているところであり、本研究ではその検討の最新動向を考慮した。また、リードアクロスのワークフローについては、欧州食品安全機関（EFSA）において、近年の研究成果に基づいた整理が専門家グループにより進められており、本ケーススタディを実施するときの参考とした。

このアプローチの実行を効率化し、適用範囲を拡大するためには、実測の代謝データベースの充実が必要である。現在、約 1000 物質の代謝情報の一元化を進めている。

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。

まず、ヒトにおける主要な P450 分子種である CYP3A4 を対象にした。使用した 3 つの代謝予測モデル SMARTCyp、ADMET Predictor、GLORY はいずれも比較的高い予測精度が得られたが、反応機序により予測精度は異なっており、例えば N-脱アルキル化反応は、高い予測性を示した。一方

で、検証に用いたデータセットはいずれも医薬品であり、予測モデル構築に使われていた可能性があることから、データセットが公開されている SMARTCyp、GLORY については、検証データセットと学習データセットの重複を精査中である。したがって、外部データセットを用いたときには同様の予測精度は期待できない可能性に留意する必要がある。各モデルの予測結果にはスコアが提示されるが、スコアと予測性の関係の解析は、今後の課題である。

Alachlor のケーススタディでは、3 つのツール SMARTCyp、ADMET Predictor、GLORY の CYP3A4 代謝予測モデルは、いずれも O-脱アルキル化体を生成する可能性が最も高い代謝物として予測した。異なる学習データセットおよび異なるアルゴリズムに基づくモデルから得られた予測結果に一貫性があることを確認することによって、代謝予測の不確実性を低減できる可能性があると考えられる。

Yamazoe らによるヒト CYP3A4 テンプレートモデル³⁾は、44 物質の代謝部位の予測精度は 100%である¹⁾が、その適用には、ユーザーが手動でコンフォーマーの作成と基質テンプレートへの当てはめを行う必要がある。迅速性に欠け、極めて高い専門性が求められる。したがって、このモデルの活用には、手法の習得の他、手間のかかる作業の一部を自動化するなどの改善が求められる。本モデルによる化学物質代謝予測の試行と課題の整理は次年度に実施する予定である。

今回は、米国の Tox21 プログラムの *in vitro* ハイスループットアッセイのうち、CYP3A4 代謝に係るデータを収集して、陽

性であることを確認し、代謝予測モデルの予測結果の不確実性の低減を行った。ケーススタディを積み重ねることにより、P450代謝予測の不確実性を低減する方法を充実させる必要がある。

一方で、いずれの代謝予測モデルの結果も代謝物の生成速度についての情報はなく、その定量データの取得のためには *in vitro* 代謝試験を実施することが必要であると考えられる。また、*in silico* モデルは、(不安定で *in vitro* 試験で検出が難しい代謝物を含めて) 予測される代謝物の構造情報を提示する。これらの情報を活用することにより、実試験における代謝物の同定に要するコストや時間の低減化を図ることが可能になり、*in vitro* 代謝試験の効率化、さらには定量的なヒト安全性予測に寄与できると考えられる。

E. 結論

本研究では、反復投与毒性を対象に、リードアクロスアプローチの適用拡大を目指して、代謝予測の信頼性を評価する方法と代謝の類似性に基づく毒性予測を事例研究により検討した。評価対象物質の類似物質の実測代謝を予測できるかを確認することにより、対象物質について信頼性の高い代謝予測とそれに基づくグループ化とリードアクロスが可能であることを実証した。さらなる事例の積み重ねは必要であるが、他の物質への適用は十分可能であり、規制安全性評価への実装へ向けて有用であると考えられる。

F. 参考文献

1. Yamazoe Y, Tohkin M. Development of

template systems for ligand interactions of CYP3A5 and CYP3A7 and their distinctions from CYP3A4 template. *Drug Metab Pharmacokinet.* 38, 100357, 2021.

2. Coleman S, Linderman R, Hodgson E, Rose R L. Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environ Health Perspect.* 108, 1151-1157, 2000.
3. Yamazoe Y, Goto T, Tohkin M. Reconstitution of CYP3A4 active site through assembly of ligand interactions as a grid-template: Solving the modes of the metabolism and inhibition. *Drug Metab Pharmacokinet.* 34, 113-125, 2019.

G. 研究発表

G.1. 論文発表

1. P.I. Petkov, H. Ivanova, M. Honma, T. Yamada, T. Morita, A. Furuhashi, S. Kotov, E. Kaloyanova, G. Dimitrova, O. Mekenyan, Differences between *in vitro* and *in vivo* genotoxicity due to metabolism: The role of kinetics. *Computat. Toxicol.* **22**, 100222, 2022.
2. Yamazoe Y, Yamada T, Hirose A, Murayama N. Deciphering Key Interactions of Ligands with CYP3A4-Template* system. *Food Safety (Tokyo)* **9**(1), 10-21, 2021.
3. 山田 隆志 : Cefic LRI/ILSI Europe Joint Workshop での Carcinogen Dose Response Database for Threshold of Toxicological Concern (TTC) の概要ならびに TTC に関する近年の国際動

- 向. イルシー 2022, in press.
4. Watanabe-Matsumoto S, Yoshida K, Meiseki Y, Ishida S, Hirose A, Yamada T. A physiologically based kinetic modeling of ethyl tert-butyl ether in humans—An illustrative application of quantitative structure-property relationship and Monte Carlo simulation. *J. Toxicol. Sci.* **47**, 77-87, 2022.
 5. Lee BM, Lee SH, Yamada T, Park S, Wang Y, Kim KB, Kwon S. Read-across approaches: Current applications and regulatory acceptance in Korea, Japan, and China. *J. Toxicol. Environ. Health. A.* **85**(5), 184-197, 2022.
 6. Yamada T, Kawamura T, Maruyama T, Kurimoto M, Yamamoto H, Katsutani N, Hirose A. Quantitative structure-activity relationship and a category approach to support algal toxicity assessment of human pharmaceuticals. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**, 195-204, 2021.
 7. Yamada T, Miura M, Kawamura T, Ushida K, Inoue K, Kuwagata M, Katsutani N, Hirose A. Constructing a developmental and reproductive toxicity database of chemicals (DART NIHS DB) for integrated approaches to testing and assessment. *J. Toxicol. Sci.* **46**, 531-538, 2021.
 8. Tanabe S, Hirose A, Yamada T. Adverse Outcome Pathway on histone deacetylase inhibition leading to testicular atrophy. *OECD Series on Adverse Outcome Pathways No. 17*.
 9. Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Yamada T, Hirose A, Matsumoto M. Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (VII). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* **139**, 71-78, 2021.
 10. Ashikaga T, Ambe K, Suzuki M, Kurimoto M, Yamada T, Tohkin M. Establishment of a threshold of toxicological concern concept for skin sensitization by *in vitro/in silico* approaches. *Journal of Japanese Cosmetic Science Society.* **45**(4), 331-335, 2021.
- G.2 学会発表
1. 山田 隆志 : Computational Toxicology の有効利用の実際と将来展望. 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021.11.11, 沖縄-Online Hybrid)
 2. 山田 隆志 : New Approach Method (NAM) の活用に基づく化学物質の統合的ヒト健康リスク評価系の構築へ向けた事例研究の開発. 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021.11.11, 沖縄-Online Hybrid)
 3. Yamada T. Development and Improvement of *in silico* approaches for accelerating regulatory chemical risk assessment. The 9th congress of AsiaToxIV (2021.10.21, Hangzhou, China-Online Hybrid)
 4. Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Ohata H, Matsumoto M, Katsutani N, Hirose A. Development of mechanism-based hematotoxicity categories for read-across assessment using an integrated toxicity database of chemical substances. 11th

World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2021.8.27, Online)

5. 山田 隆志, 栗本 雅之, 広瀬 明彦, Chihae Yang, James F Rathman : 化学物質の非発がんエンドポイントのTTCアプローチのための新しいデータベースの開発. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
6. 川村 智子, 山田 隆志, 辻井 伸治, 大畑 秀雄, 勝谷 成男, 広瀬 明彦 : リードアクロス評価のためのメカニズムに基づく血液毒性カテゴリーの開発と精緻化—統合毒性データベースを利用した事例—. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
7. 川島 明, 井上 薫, 吉崎 芳郎, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦 : ラットを用いた3-メチルペンタン、イソオクタン、イソノナンの反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
8. 井上 薫, 牛田 和夫, 甲斐 薫, 鈴木 洋, 川島 明, 松本 真理子, 山田 隆志, 広瀬 明彦 : リスク評価の優先順位付けのための発がん性定量評価における各種毒性指標の適用について. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
9. Yamada T. Improvement of QSAR and Read-across for Chemical Risk Assessment and Efforts toward Regulatory Acceptance in Japan. 2021 Korean Society of Toxicology (KSOT)/ Korean Environmental Mutagen Society (KEMS) Toxicology Workshop & Spring International Symposium (2021.5.31,

Online).

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

H.1. 特許取得
なし

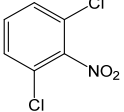
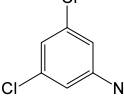
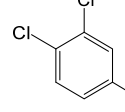
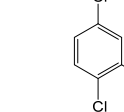
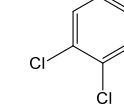
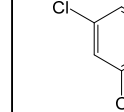
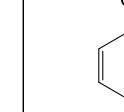
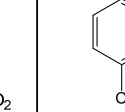
H.2. 実用新案登録
なし

H.3. その他
なし

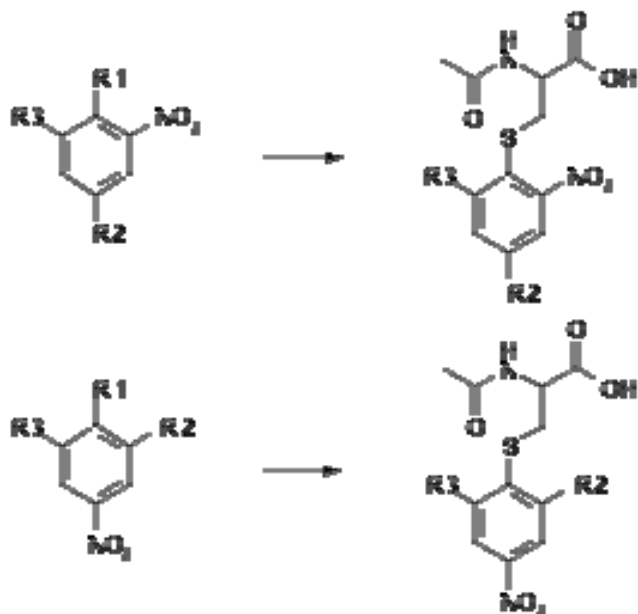
表 1 代表的な代謝予測ソフトウェアの調査結果

ソフトウェア	予測対象	予測手法	プラットフォーム	製作者	URL	生物種	酵素/反応	有償 無償	データ セット
BioTransformer	代謝物	知識ベース 機械学習	ブラウザ	The Metabolomics Innovation Centre	https://biotransformer.ca/	mammals, their gut microbiota, soil/ aquatic microbiota	EnzymeCommitted-based, CYP450, Phase 2, Human Gut Microbial and Environmental Microbial	無償	公開
ADMET predictor	代謝物 反応部位	機械学習	インストール	Simulations Plus	https://www.simulations- plus.com/software/admetpredictor/ metabolism/	不明	CYP (1A2/2A6/2B6/2C8/2C9/2C19/2D6/2E1/3A4), UGT, AOX	有償	非公開
Meteor Nexus	代謝物	知識ベース	インストール	LHASA	https://www.lhasalimited.org/produ cts/meteor-nexus.htm	不明	Phase 1 Phase 2	有償	非公開
FAME	反応部位	機械学習	ブラウザ	Univ. Hamburg University of Chemistry and Technology Prague	https://nerdd.univie.ac.at/fame3/	human	Phase 1 (CYP/3A4, 2D6, 2C9) Phase 2 (FAME3/ UGTs, GSTs, SULTs, MTs, and NATs)	無償	不明
GLORY	代謝物	機械学習	ブラウザ	Univ. Vienna	https://nerdd.univie.ac.at/glory/	human	Phase1 (CYP/3A4, 2D6, 2C9)	無償	公開 (GLORY xに内包)
GLORYx	代謝物	機械学習	ブラウザ	Univ. Vienna	https://nerdd.univie.ac.at/gloryx/	human	Phase1 (CYP/3A4, 2D6, 2C9) Phase 2 (UGTs, GSTs, SULTs, MTs, and NATs)	無償	公開
SMARTCyp	反応部位	機械学習	ブラウザ	Univ. Copenhagen	https://smartcyp.sund.ku.dk/mol_to _som	不明	Specific models: CYP (2C9, 2D6, 3A4) CYP(1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6, 2E1)に適用可能との報告あり	無償	公開
TIMES	代謝物	ヒューリス ティック	インストール	Laboratory of Mathematical Chemistry	http://oasis- lmc.org/products/software/times.as px	不明	Phase 1 (aliphatic C-oxidation, aromatic C-hydroxylation, oxidative N- and O-dealkylation, epoxidation, ester and amide hydrolysis, carbonyl group reduction, nitro and azo group reduction, N- hydroxylation, etc.) Phase 2 (glucuronidation, sulfation, glutathione conjugation, N- acetylation, etc.)	有償	公開
CypReact	反応の 有無	機械学習	インストール	Univ. Alberta	https://bitbucket.org/Leon_Ti/cypre act/src/master/	human	CYP(1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, or 3A4)	無償	公開
CyProduct	代謝物	機械学習	インストール	Univ. Alberta	https://bitbucket.org/wishartlab/cyp roduct/src/master/	human	CYP(1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, or 3A4)	無償	公開
MetaTrans	代謝物	機械学習	インストール	Rice University, USA	https://github.com/KavrakiLab/Met aTrans	human	Phase 1, Phase 2, others (CYP450 and other oxidasing enzymes for phase 1. UDP-GT, sulfotransferases for phase 2. hydrolases and enzyme not specified for other reactions.)	無償	公開

表2 ジクロロニトロベンゼンカテゴリーの反復投与毒性予測のためのデータマトリックス

		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8
Chemical info	CAS	601-88-7	618-62-2	99-54-7	89-61-2	3209-22-1	611-06-3	121-73-3	88-73-3
	Name	1,3-dichloro-2-nitrobenzene	1,3-Dichloro-5-nitrobenzene	1,2-Dichloro-4-nitrobenzene	1,4-Dichloro-2-nitrobenzene	1,2-Dichloro-3-nitrobenzene	2,4-Dichloro-1-nitrobenzene	1-Chloro-3-nitrobenzene	1-Chloro-2-nitrobenzene
	Structure								
	Molecular weight	192.0	192.0	192.0	192.0	192.0	192.0	157.6	157.6
Physico chemical property	logP (measured value)	2.2	2.2	3.1	3.1	3.1	3.1	2.5	2.2
	ACD logP (calculated value)	2.7	3.3	3.2	3.0	2.9	3.0	2.6	2.3
Toxicity information	Route/ Strain	NA	NA	Oral (Gavage)/ SD Rat	Feed/ F344 Rat	Oral (Gavage)/ SD Rat	Oral (Gavage)/ SD Rat	Gavage/ Cr:CD(SD)BR Rat	Feed/ F344 Rat
	Duration	NA	NA	42 days	92 days	44 days	45 days	28 days	91 days
	Hepatic effect	No data	No data	100 mg/kg/d	93 mg/kg/d	≥ 25 mg/kg/d	8 mg/kg/d	25 mg/kg/d	4 mg/kg/d
	Hematologic effect	No data	No data	≥ 20 mg/kg/d	106 mg/kg/d	≥ 25 mg/kg/d	8 mg/kg/d	1 mg/kg/d	4 mg/kg/d
	Integrated conclusion (eg. read-across)	R.A. from No.6, LOAEL: 8mg/kg/d	R.A. from No.7, LOAEL: 1mg/kg/d	NOAEL: 4 mg/kg/d	LOAEL:93 mg/kg/d	NOAEL: 5 mg/kg/d	LOAEL:8 mg/kg/d	LOAEL:1 mg/kg/d	LOAEL:4 mg/kg/d
	D value	0.00133	0.00017	0.00667	0.04650	0.00833	0.00133	0.00017	0.00200
	CSCL Hazard Class	Class 2	Class 2	Class 3	Class 3	Class 3	Class 2	Class 2	Class 2
Metabolism information	【Measured】	No data	No data	GSH Conjugation at p- position of Nitro group	No data	No data	GSH Conjugation at p- position of Nitro group	Nitro to Aniline	GSH Conjugation
									Nitro to Aniline
	in vivo / in vitro (species)			in vivo (rat)			in vitro (rat)	in vitro (rat)	in vitro (rat)
	【Predicted】	GSH Conjugation (1000)	Nitro to Aniline (373)	GSH Conjugation at p- position of Nitro group (1000)	GSH Conjugation at o- position of Nitro group (1000)	GSH Conjugation at o- position of Nitro group (1000)	GSH Conjugation at p- position of Nitro group (1000)	Nitro to Aniline (373)	GSH Conjugation (1000)
		Meteor Nexus: 3.1.0 (score)	Nitro to Aniline (873)		Nitro to Aniline (873)	Nitro to Aniline (872)	Nitro to Aniline (872)	Nitro to Aniline (872)	Hydroxylation of Benzene (p- position of Nitro group: 277, p- position of Chrolo: 269, o- position of Nitro group: 139)
	GLORYx (score)	GSH Conjugation (0.464)	GSH Conjugation (0.312)	GSH Conjugation at p- position of Nitro group (0.484)	GSH Conjugation at o- position of Nitro group (0.484)	Nitro to Aniline (0.412)	GSH Conjugation at o- position of Nitro group (0.464)	GSH Conjugation (0.312)	GSH Conjugation (0.484)
		Nitro to Aniline (0.436)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.292)	GSH Conjugation at m- position of Nitro group (0.376)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.412)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.412)	Nitro to Aniline (0.380)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.256)	Hydroxylation of Benzene at p- & o- position of Nitro group (0.360)
		Hydroxylation of Benzene at p- position of Nitro group (0.436)	Nitro to Aniline (0.292)	Nitro to Aniline (0.256)			Hydroxylation of Benzene at o- position of Nitro group (0.380)	Nitro to Aniline (0.256)	Nitro to Aniline (0.360)
			Hydroxylation of Benzene at o- position of Nitro group (0.256)						

• 446 Conjugation of Glutathione with Electron Deficient Aromatic Compounds



R1 = Cl, Br, I, NO, NO₂, OPO(OR₄)₂

R2, R3 = NO₂, Cl, CF₃, H

R4 = carbon (not attached to further heteroatoms and bearing at least one hydrogen atom)

図 1. Meteor におけるニトロ基とハロゲンを持つベンゼン環の代謝予測ルール

ニトロ基に対して、パラ位とオルト位にあるハロゲンに対して、GSH との反応が起こるが、メタ位に対しては起こらない (Meteor Nexus のレポートから引用)。

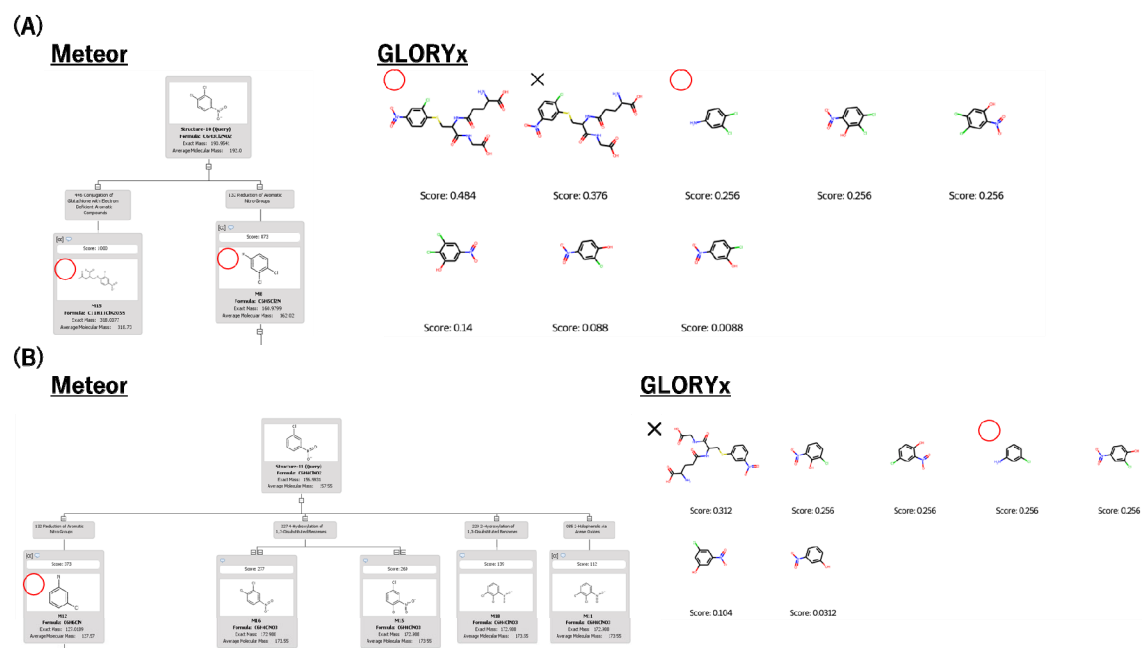


図 2. Meteor と GLORYx の予測代謝物の比較 (A) Member 7 (B) Member 12

両物質とも代謝の実試験データが利用できる。毒性発現に関連する代謝物である GSH 抱合体とアニリン類の実測代謝物と一致した予測代謝物の構造には○を、一致しなかった代謝物には×を示した。

付録 CYP3A4 代謝予測モデルのアウトプット

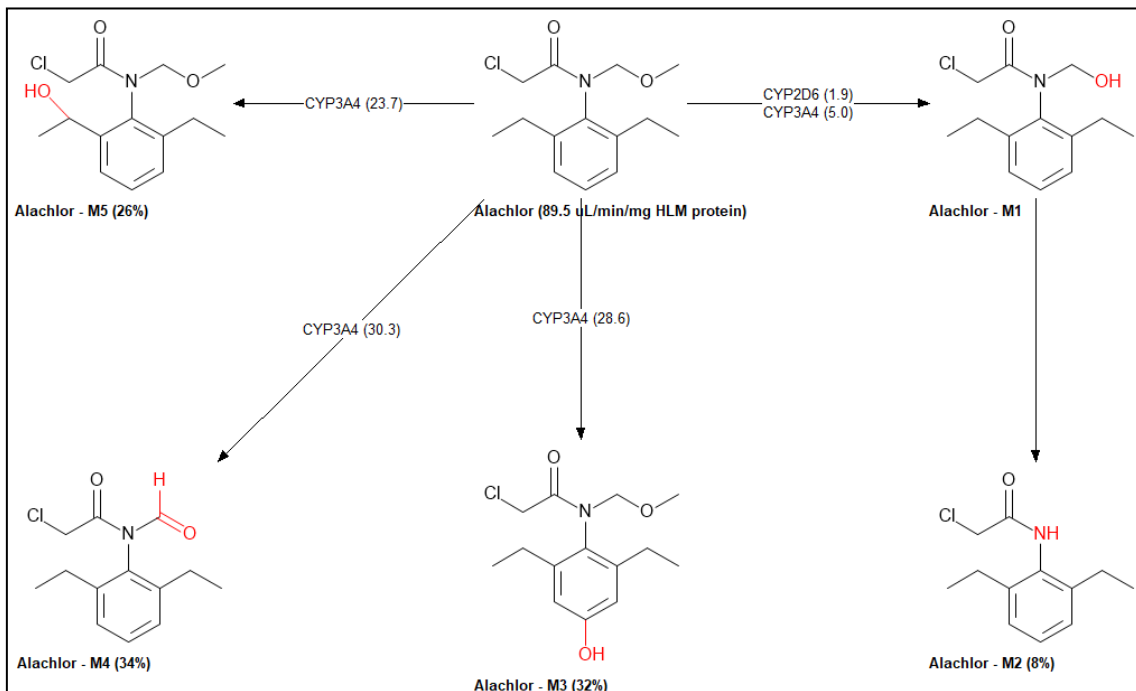
● SMARTCyp

Alachlor		3A4	2D6	2C9			
1							
3A4 Ranking	Atom	3A4 Score	Energy	2DSASA	Span2end	Relative Span	Similarity
1	C.18	51.5	62.2	67.8	0	1.0	0.7
2	C.16	55.6	62.2	22.0	2	0.7	0.4
3	C.8	58.4	66.4	28.2	1	0.9	0.7
4	C.3	68.0	75.9	26.0	1	0.9	0.4
5	C.11	77.1	86.3	30.8	0	1.0	1.0
6	C.10	78.4	86.3	26.6	1	0.9	0.7
7	C.9	79.2	89.6	60.7	0	1.0	1.0
8	N.5	85.1	89.6	-1.8	3	0.6	0.4

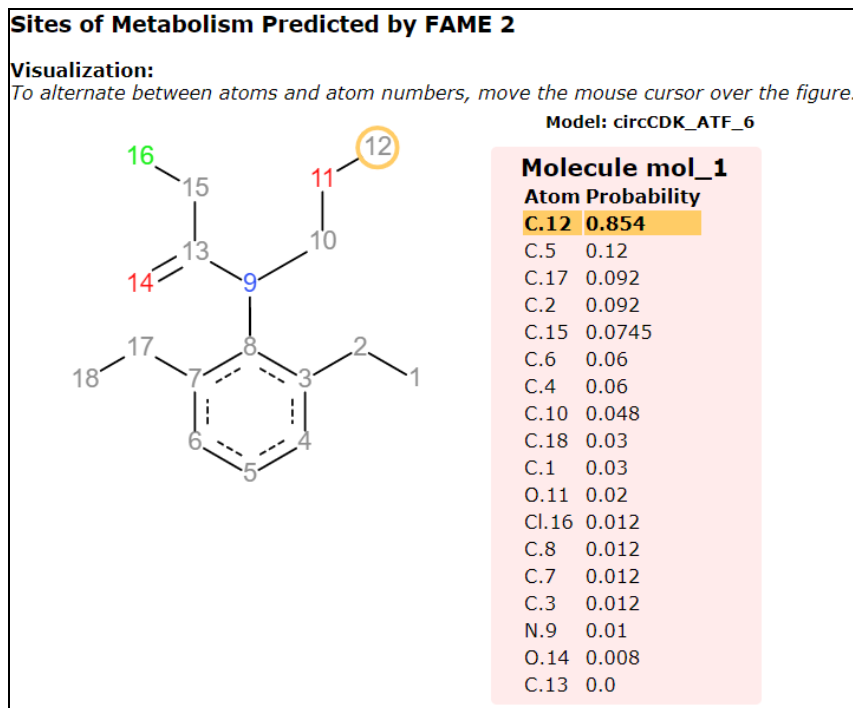
Molecule Name	Molecule Number	Atom Number	Atom Name	Atom	Span 2end	Span2end d_N_Correction	Span2end d_CO_Correction	COO-Dist	COO_Correction	N+dist	N_Correction	Relative Span	2DSASA	Reactivity	Energy	3A4 Score	2D6 Score	2C9 Score	3A4 Ranking	2D6 Ranking	2C9 Ranking	N_ox	Similarity
Alachlor	0	0	O	0.1	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	0	999	999	992.1429	1005.7	1004.9	9	9	9	0	0.666667
Alachlor	0	1	C	C.2	2	13.4	11.8	0	0	0	0	0.714286	3.975245	999	999	993.1267	1012.241	1010.641	10	10	10	0	0
Alachlor	0	2	C	C.3	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	25.98947	75.9	75.9	68.00328	81.56042	80.76042	4	4	4	0	0.4
Alachlor	0	4	N	N.5	3	20.1	17.7	0	0	0	0	0.571429	-1.83095	89.6	89.6	85.10181	109.7732	107.3732	8	8	8	0	0.4
Alachlor	0	5	C	C.6	3	20.1	17.7	0	0	0	0	0.571429	1.189	999	999	994.381	1019.052	1016.652	12	12	12	0	0
Alachlor	0	6	C	C.7	2	13.4	11.8	0	0	0	0	0.714286	1.861274	999	999	993.2113	1012.326	1010.726	11	11	11	0	0
Alachlor	0	7	C	C.8	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	28.16479	66.4	66.4	58.41627	71.97341	71.17341	3	2	2	0	0.666667
Alachlor	0	8	C	C.9	0	0	0	0	0	0	0	0	60.6685	89.6	89.6	79.17326	87.17326	87.17326	7	6	6	0	1
Alachlor	0	9	C	C.10	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	26.83781	86.3	86.3	78.37734	91.93449	91.13449	6	7	7	0	0.666667
Alachlor	0	10	C	C.11	0	0	0	0	0	0	0	0	30.75828	86.3	86.3	77.06967	85.06967	85.06967	5	5	5	0	1
Alachlor	0	11	C	C.12	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	26.63781	86.3	86.3	78.37734	91.93449	91.13449	6	7	7	0	0.666667
Alachlor	0	12	C	C.13	2	13.4	11.8	0	0	0	0	0.714286	1.861274	999	999	993.2113	1012.326	1010.726	11	11	11	0	0
Alachlor	0	13	C	C.14	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	28.16479	66.4	66.4	58.41627	71.97341	71.17341	3	2	2	0	0.666667
Alachlor	0	14	C	C.15	0	0	0	0	0	0	0	0	60.6685	89.6	89.6	79.17326	87.17326	87.17326	7	6	6	0	1
Alachlor	0	15	C	C.16	2	13.4	11.8	0	0	0	0	0.714286	21.97626	62.2	62.2	55.60666	74.72095	73.12095	2	3	3	0	0.4
Alachlor	0	16	O	O.17	1	6.7	5.9	0	0	0	0	0.857143	0	999	999	992.1429	1005.7	1004.9	9	9	9	0	0
Alachlor	0	17	C	C.18	0	0	0	0	0	0	0	0	67.76639	62.2	62.2	51.48934	59.48934	59.48934	1	1	1	0	0.666667

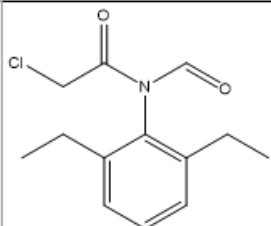
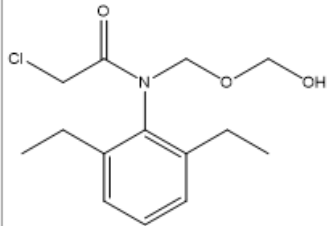
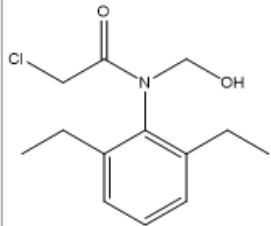
● ADMET Predictor (Map は MedChem Designer による)

Identifier	Canonical SMILES	Pair Count	Geometry	3D Quality	AP_FWeight	Met_CYP1A2	Met_CYP2C19	Met_CYP2C9	Met_CYP2D6	Met_CYP3A4	Met_Decomp_Form	Met_Encyme	Met_Level	Met_Mass_List	Met_PctYield	Met_Sum
Alachlor - M1	<chem>CC1=CC=C(C=C1)N(CCCl)C(=O)CO</chem>	0	2D		265.74626	0	0	0	1.87218128	5.01552194		1: CYP2A6; CYP2B6; CYP2D6; CYP2E1; CYP3A4	1	255.1022(75.8); 57.0992(24.2)		
Alachlor - M2	<chem>CC1=CC=C(C=C1)N(CCCl)C(=O)N</chem>	0	2D		225.71982	0	0	0	1.87218128	5.01552194	Alachlor - M1	1: CYP2A6; CYP2B6; CYP2D6; CYP2E1; CYP3A4	1	225.0917(75.8); 27.0887(24.2)	8	6.88770322
Alachlor - M3	<chem>CC1=CC=C(C=C1)N(CCCl)C(=O)CO</chem>	0	2D		265.7727	0	0	0	0	28.63906463		1: CYP3A4	1	285.1127(75.8); 87.1097(24.2)	32	28.63906463
Alachlor - M4	<chem>CC1=CC=C(C=C1)N(CCCl)C(=O)C=O</chem>	0	2D		253.73032	0	0	0	0	30.33683833		1: CYP3A4	1	253.0866(75.8); 55.0836(24.2)	34	30.33683833
Alachlor - M5	<chem>CC1=CC=C(C=C1)N(CCCl)C(=O)C(O)C</chem>	0	2D		285.7727	0	0	0	0	23.66919485		1: CYP2E1; CYP3A4	1	285.1127(75.8); 87.1097(24.2)	26	23.66919485



- GLORY (代謝部位は FAME 2 による)



Structure	Rank	Priority_score	Reaction_type
 <chem>CCC1=CC=CC(CC)=C1N(C(CCl)=O)C=O</chem>	1	4.27	oxidative ether cleavage to one alcohol and one aldehyde/ketone
 <chem>CCC1=CC=CC(CC)=C1N(C(CCl)=O)COCO</chem>	1	4.27	aliphatic hydroxylation
 <chem>CCC1=CC=CC(CC)=C1N(C(CCl)=O)CO</chem>	1	4.27	oxidative ether cleavage to one alcohol and one aldehyde/ketone