

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

AOPに基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究

研究分担者	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	部長
研究協力者	山田 隆志	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	室長
研究協力者	重田 善之	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	Susanne Stalford	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Adrian Fowkes	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Alun Myden	ラーサ研究所		研究員
研究協力者	Emma Hill	hhiro ラーサ研究所		研究員

研究要旨

これまでの研究では、反復投与毒性、生殖発生毒性への *in silico* 手法の適用に関して、機序に基づくリードアクロスの適用を目指して、データベースの構築、カテゴリーの構築、有害性発現経路（AOP）の開発を行ってきたが、本研究では機序に基づくリードアクロスの信頼性の向上へ向けて、AOP キーイベント等のデータを評価目的に適合するよう選択し、リスク評価に適用する場合のケーススタディを実施し、AOPアプローチの優位性を検証することを目的とした。令和4年5月20日3年度は、AOPに基づく生殖発生毒性の予測系構築に関して、既存化学物質点検結果あるいは文献情報等による生殖発生毒性エンドポイントを基にしたヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）結合阻害のAOPを用いてケーススタディを行い、具体例を基にリスク予測におけるAOPに基づくアプローチの有用性と課題を検証した。その結果、アッセイ結果を経路に関連付けることができるデータモデルでAOPの枠組みを拡張し、さらなるデータおよび知識をレビューすることにより、AOPを安全性評価の改善に使用できる3つのシナリオを検証し

A. 研究目的

現在、数多くの化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、それら化学物質のリスク管理は世界的な課題となっている。化学物質の規制に関わる国際機関や諸外国の規制当局は、リスク評価の迅速化・効率化のために、*in silico* 予測手法の利用促進

を図っており、医薬品不純物の遺伝毒性評価における行政利用として、ICH M7 ガイドラインの中で定量的構造活性相関（QSAR）が利用されるようになった。しかし現状では、遺伝毒性以外の毒性予測におけるリスク管理へのQSARの利用は極め

て限定的であると言わざるを得ない。これまでの研究では、反復投与毒性、生殖発生毒性への *in silico* 手法の適用に関して、機序に基づくリードアクロスの適用を目指して、大規模毒性データベースの構築、カテゴリーの構築、有害性発現経路（AOP）の開発を行ってきた。そこで令和4年5月20日3年度は、機序に基づくリードアクロスの信頼性の向上へ向けて、AOP キーイベント等のデータを評価目的に適合するよう選択し、組合せによりリスク評価に適用する場合のケーススタディを実施することにより、AOP アプローチの優位性を検証することを目的とした。

B. 研究方法

化学物質安全性評価における行政的意思決定支援に AOP が使用される例はほとんどないことから、先行研究で開発した発達毒性に関連するヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）結合阻害の AOP を用いて、いくつかの事例研究を実施し、生殖発生毒性（DART）エンドポイントに対する AOP が意思決定をどのように強化できるかを検証した。用いた事例は以下の通りである。

Case 1：特定の化合物の評価に妥当なデータのレビュー

Case 2：機序に関する仮説を裏付ける試験系の優先順位付け

Case 3：新規物質などを含む類似化合物のレビューデータの活用

これらの実証を可能にするために、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）経路に関連し得るアッセイを特定し、適切な KE に関連付けた。各アッセイについて、被験化合物の生物活性データを整理した。構造お

よび生物活性データは標準化を行った。

（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

データの整理

Derek Nexus および文献調査から得られた知識を用いて、AOP に関連する 6つのアッセイと 1つの Derek アラートが特定された。関連するアッセイ測定を通して、アッセイとキーイベント（KE）を関連付けた（図 1）。アッセイにより複数の KE が測定される可能性があるため、1つのアッセイから複数の KE のデータが得られる場合がある。得られた唯一の非有害データは、分子開始イベント（MIE）を測定するアッセイのものであった。中軸骨格異常の有害性発現を催奇形性、発生毒性および DART の親エンドポイントと関連づけることで、*in vivo* 胚・胎児発生（EFD：traditional embryofetal development studies）試験、*in vivo* スクリーニング試験（OECD TG421 および TG422）、および生物学的複雑性が異なる 4 種類の代替発生毒性試験（マイクロマス、全胚培養、胚性幹細胞およびゼブラフィッシュ）を含む追加アッセイを関連づけることが可能となった。さらに、*in silico* Derek Nexus アラート A060「短鎖カルボン酸または前駆体」は催奇形性の KE に関連付けた。

表 1 に、整理したデータセットの構成を示す。各データセットが関連付けられた KE、および各データセットに使用されている分類方法は以下のように行った。

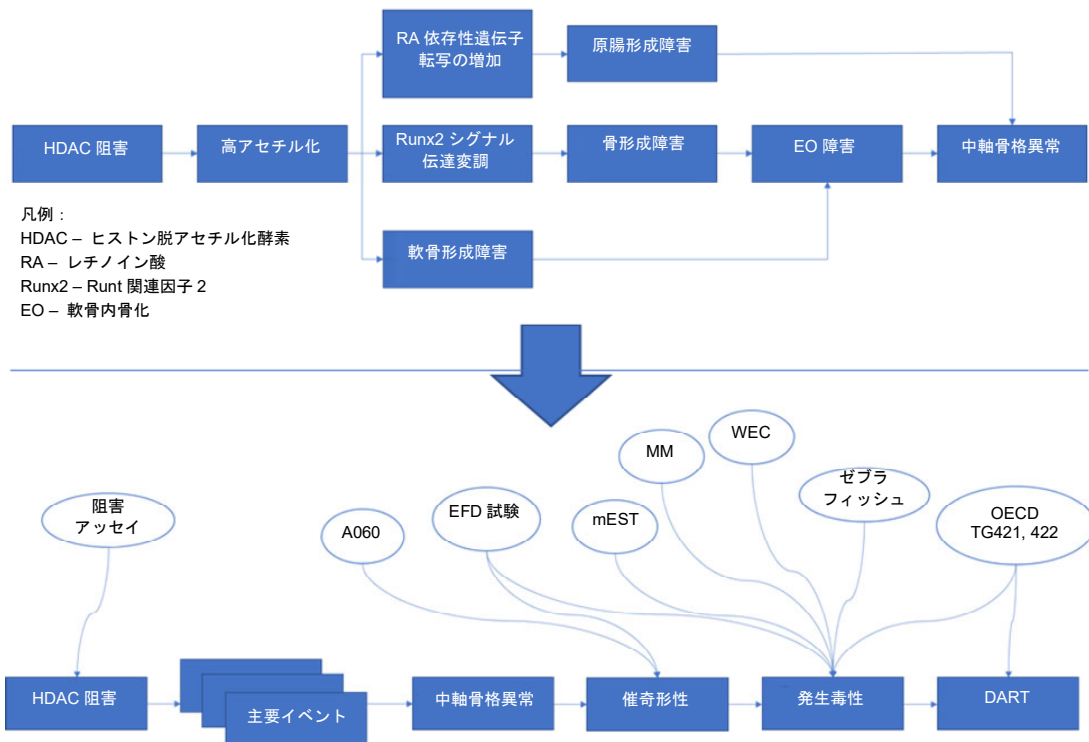


図 1：アッセイを HDAC 経路における関連 KE と関連付けるプロセス阻害アッセイ：

HDAC 阻害アッセイ、A060：Derek Nexus アラート「短鎖カルボン酸または前駆体」、EFD：従来の胚・胎児発生試験、mEST：マウス胚性幹細胞アッセイ、MM：マイクロマスアッセイ、WEC：全胚培養アッセイ、ゼブラフィッシュ：ゼブラフィッシュアッセイ、OECD TG421 および 422：OECD TG421 および 422 ガイドラインアッセイ。

表 1：AOP と関連付けられたアッセイデータセット

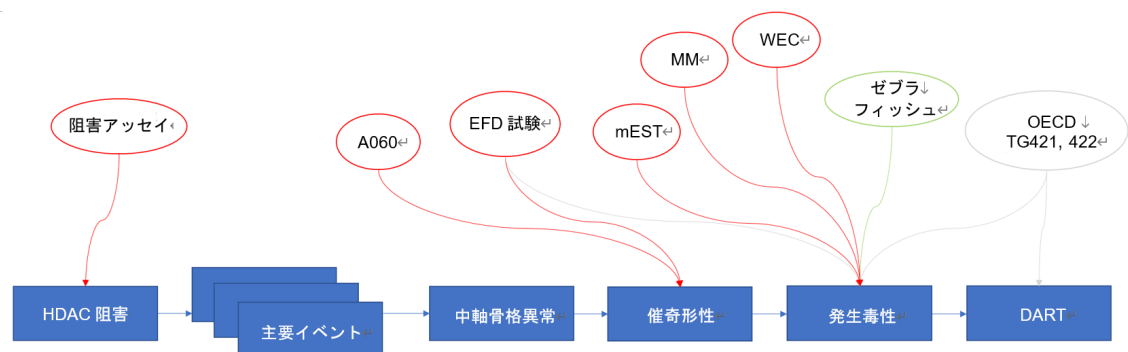
データセット	分類方法	測定した KE	試験数	活性あり	活性なし	不確定
HDAC 阻害*	Lhasa による導出	HDAC 阻害	16350	15030	1320	
Lhasa マスター-DART	Lhasa による導出	催奇形性	1307	820	416	71
Lhasa マスター-DART	Lhasa による導出	発生毒性	997	144	567	286
EST	著者による導出	発生毒性	44	27	17	
EST	Lhasa による導出	発生毒性	23	14	2	7
WEC	Lhasa による導出	発生毒性	21	11	3	7
MM	Lhasa による導出	発生毒性	23	13	7	3
ゼブラフィッシュ	EPA による導出	発生毒性	1038	199	839	
NIHS データセット TG421、422	Lhasa による導出	発生毒性	395	150	245	
NIHS データセット TG421、422	Lhasa による導出	生殖発生毒性	395	181	214	

*データを AOP に関連付けるために、多くの HDAC アイソフォームのデータをグループ化した。

- HDAC 阻害データセットは 16000 を超える試験を含む最大のデータセットであった。この経路について記述された MIE は HDAC アイソフォームに特異的ではないため、このデータセットには複数の HDAC アイソフォームのデータが含まれる。マウスのロックアウト試験ではアイソフォーム間の機能的冗長性が実証されており、HDAC 阻害剤が複数のアイソフォームを標的とする可能性があるため、AOP において特定のアイソフォームの経路を明らかにすることは困難であった [Ververis ら 2013, Haberland ら 2009]。
 - Lhasa の社内マスターデータセットに含まれる EFD 試験には、催奇形性および発生毒性の両方のエンドポイントに関するデータが含まれる。このデータセットにはげっ歯類および非げっ歯類の毒性試験が含まれており、各試験にはエキスパート・コールが割り当てられている。
 - EST、WEC および MM に関するデータは公表されたバリデーション試験から得られたものであり、EST の追加データは追加公表により提供された [Genschow ら 2002, Genschow ら 2004, Spielmann ら 2004, Piersma ら 2004, Paquette ら 2008]。これらの試験では、いくつかの化合物の胚毒性を測定し、(エンドポイントの広範な性質に起因して) 発生毒性と関連付けた。
 - 同様に、ゼブラフィッシュのデータセットには、胚毒性について EPA が割り当てた活性コールが含まれている。
 - NIHS TG421 および 422 のデータは、Lhasa Limited が行ったデータへのエンドポイントの割り当てに基づいて、発生毒性または DART の KE に割り当てた。
- AOP の主要イベントは測定可能な事象であるが、この事例では、この経路の多くの KE について頑健なアッセイやデータセットが特定されなかった。多くの KE に対するアッセイは、開発初期段階にあるかまだ検証されておらず、これから開発が始まる可能性があるに過ぎない。状況が進むにつれて、KE の測定データがより容易に利用できるようになる可能性がある。これには、遺伝子発現に関連する主要イベント (RA 依存性の遺伝子転写増加、Runx2 シグナル伝達変調 KE など) のオミクスデータ、並びに骨形成および軟骨形成障害 KE に関する組織分化試験が含まれる可能性がある。AOP により、新しく利用可能になるアッセイの解釈および試験戦略更新の支援のためのアプローチが提供されることから、この方法でデータを AOP に継続的にマッピングすることにより、2 つの利点が得られると考えられる。
- 異種データを 1 つのデータモデルに統合することができ、機序の観点からデータを探し出すことができる。
 - この方法は、主要データのギャップを明示するため、関連アッセイの開発または既存アッセイによる新規データの生成を通して、これらのギャップに将来対処することができる。
- **Case 1** : 特定の化合物に関連するデータのレビュー
- バルプロ酸はヒト催奇形性物質として知られており、広範に研究されているため、データが豊富な化合物であるといえる。このようなデータが豊富なケースでは、分析結果を AOP の周辺で構成することができ

るため、評価者は、KE に対する化合物の活性を検討し、続いて AOP 全体に対する活性を検討することができる。バルプロ酸のアッセイデータがどのように HDAC 経路に関連付けられるか、および KE の活性を分類し、AOP の全体的な予測を行うためにデータをどのように分解できるかを図 2

に示す。この事例では、KE ごとに活性コールドを割り当てる保守的な方法が採用された。したがって、KE と関連付けられたアッセイのいずれかのアッセイ結果が陽性であった場合、KE を引き起こす化合物の活性を「陽性」と定義した。



1) 評価					2) KEに関するエビデンスを確立		3) 経路に関するエビデンスを確立
懸念化合物	評価したAOP	主要イベント (KE)	エビデンス	結果	系の複雑性	KEの結果	経路の結果
バルプロ酸	発生毒性を引き起こすHDAC阻害	HDAC阻害	阻害アッセイ (HDAC1および2)	陽性	In vitro	陽性	陽性
			阻害アッセイ (HDAC4~7および9)	陰性	In vitro		
			Derek Nexus アラート 60	陽性	In silico		
		催奇形性	EFD試験*	陽性	In vivo	陽性	
			mEST	陽性	In vitro		
			WEC	陽性	In vitro		
			MMアッセイ	陽性	In vitro		
		発生毒性	ゼブラフィッシュ	陰性	In vivo	陽性	
			OECD TG421	データなし	In vivo		
			OECD TG422	データなし	In vivo		

図 2 : KE および AOP レベルでのバルプロ酸に関するデータの分析 :

*バルプロ酸に関連する EFD 試験データは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルにおけるバルプロ酸の催奇形性を特定する様々な試験の要約から構成される

全体として、データが利用可能な各 KE について、本 AOP 全体に渡るバルプロ酸の一貫した活性を示す十分なデータがあった。

利用可能なデータにより、バルプロ酸が HDAC1 および HDAC2 の両方を阻害することが示されている。HDAC AOP は、多

くの HDAC アイソフォーム (HDAC1 および 2 を含む) の摂動によって催奇形性が生じる可能性があり、そのため HDAC 阻害がバルプロ酸の発生毒性の原因となることを示している。

関連する 2 つのエビデンスにより、バルプロ酸が催奇形性を引き起こす可能性が

あることが示されている。第一に、*in vivo* 胚・胎児毒性試験のデータは、バルプロ酸がヒト催奇形性物質であり、バルプロ酸に関連する一般的な奇形には神経管欠損、四肢欠損、骨格異常、心臓奇形、二分脊椎、および頭蓋顔面欠損が含まれることを示している。次に、催奇形性のエンドポイントを予測する Derek Nexus アラート (A060 : 短鎖カルボン酸または前駆体) がバルプロ酸に対して出されている。しかし、このアラートは上記の *in vivo* 毒性データについて訓練されているため、情報はこの毒性データと無関係ではない。注釈付けされた構造アラートは、データが豊富な化合物をレビューする際に、評価者にさらなる信頼をもたらす可能性がある。この AOP に対する *in silico* アラートの関連性は、どのように異種データや代替データを AOP の枠組みに統合できるかを強調している。

また、催奇形性を含む、より広範なエンドポイントである、発生毒性の KE に関連するバルプロ酸のデータが存在する。このデータは、マイクロマスアッセイ、全胚培養アッセイ、胚性幹細胞試験、ゼブラフィッシュアッセイといった複数の代替モデルから得られたものである。5 つのモデルのうち 4 つから得られたデータは、バルプロ酸が潜在的な発生毒性物質であることを示している。したがって、KE の総合的なコールを陽性として間違いない。ゼブラフィッシュの陰性結果は、このモデルがバルプロ酸の発生毒性評価に適していないこと、あるいは生データの解釈を見直す必要があることを示唆している可能性がある。バルプロ酸が催奇形性物質であることを実証した別のゼブラフィッシュの研究が文献中に

存在する [Lee ら 2013]。これは、試験デザインまたは結果の解釈が関連要因であり、AOP モデルへの試験データの更なる統合が有益であることを示している。これらのことから、バルプロ酸は HDAC 阻害を通じて発生毒性を引き起こす可能性があると予測することができる。この主張は、胚・胎児毒性データが AOP の結果 (骨格異常など) と一致していることから裏付けられる。しかし、この場合 AOP はバルプロ酸を用いた試験のデータについて訓練されているため、一致は (したがって結論も) 驚くに値しない。しかし、この例は、活性に対して AOP を用いて論理的で透明性の高い機序に関する仮説と予測を与えるために、複数の情報源からデータをまとめる際に、このアプローチが有用であることを示している。この Case では、解釈を支援するために図 2 のデータの一部をグループ化した。HDAC 阻害アッセイはその活性によりグループ分けされている。EFD 試験では複数の動物種 (ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサル) からの総合的な結果が得られており、これらの結果から、バルプロ酸が催奇形性を有することが示されている。様々な種の EFD 試験の結果が一致しない場合は、より詳細な情報が必要となることがある。

➤ **Case 2 :** 機序に関する仮説 1 に基づくアッセイ選択の優先順位付け

毒性データと機序に関するデータの両方を AOP と関連付けることは、毒性を引き起こす化合物について懸念される機序を示すのに役立つ。この潜在的な使用事例を示すために、提供された TG422 および 421

のデータセットの化合物について HDAC 阻害データを検索した。2-エチル酪酸が、NIHS 提供データセットと HDAC 阻害データセットの両方に存在することが判明した (図 3)。TG422 の試験では 250 mg/kg/日 で投与した場合に生児出生が減少し、「50 mg/kg/日 で分娩時の状態が不良 (母体毒性の徴候の可能性あり)」となり、2-エチル

酪酸が潜在的な発生毒性物質として同定された。TG422 試験におけるこうした陽性の所見は、本化合物が DART を引き起こす可能性があることを示している。HDAC 阻害についての利用可能なデータは、2-エチル酪酸が HDAC 阻害剤ではないことを示した、詳細不明のアイソフォームを用いた 1 件の試験に限られている。



図 3 : HDAC 阻害 AOP に関連付けられた 2-エチル酪酸のデータ

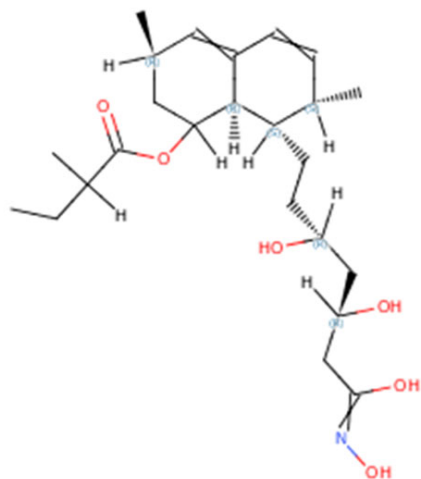
このデータによれば HDAC 結合を介して起こる可能性は低いものの、この場合、評価者は 2-エチル酪酸が DART を引き起こす可能性がある」と述べる事ができる。したがって、観察された毒性は、別の標的を介した別の機序または HDAC 阻害剤への化合物の代謝によって発生している可能性がある。しかしその代わりに、評価者は 2-エチル酪酸が HDAC 阻害を引き起こす可能性について最終的な評価に至っていないと判断することもできる。したがって、この機序に関する仮説を最終的に棄却するためには、さらなる HDAC 阻害試験が必要であり、それは QSAR 試験の形態をとると考えられる。AOP を参照することで、複数

の HDAC アイソフォームを評価する必要性が示されるとともに、リスク評価者を当該経路に関連する他の分析法 (マイクロマアッセイや EFD 試験など) へ誘導することができる。

➤ **Case 3** : 新規物質における類似化合物のレビューデータ

この Case では、リードアクロスを用いて意思決定を支援するために、類似化合物のデータをどのように利用できるかを示している。利用可能なデータを調査した結果、いくつかのスタチンが HDAC 阻害能を有することが確認された。このうちの 1 つの化合物 (A) は HDAC を阻害することが示

されているが、発生毒性を示すデータはない (図 4)。



(A)

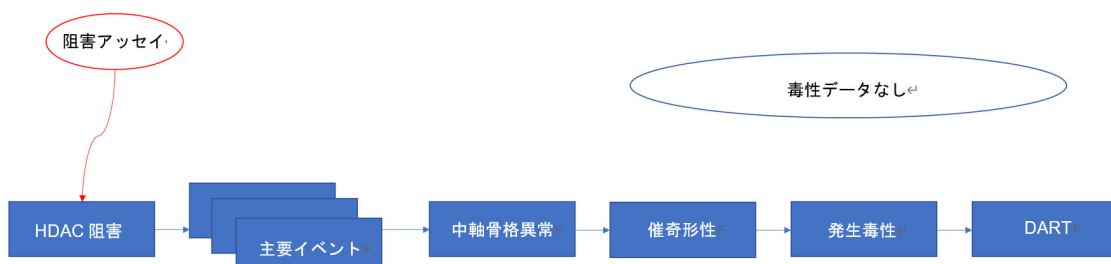


図 4 : スタチンに関する HDAC AOP 関連データ

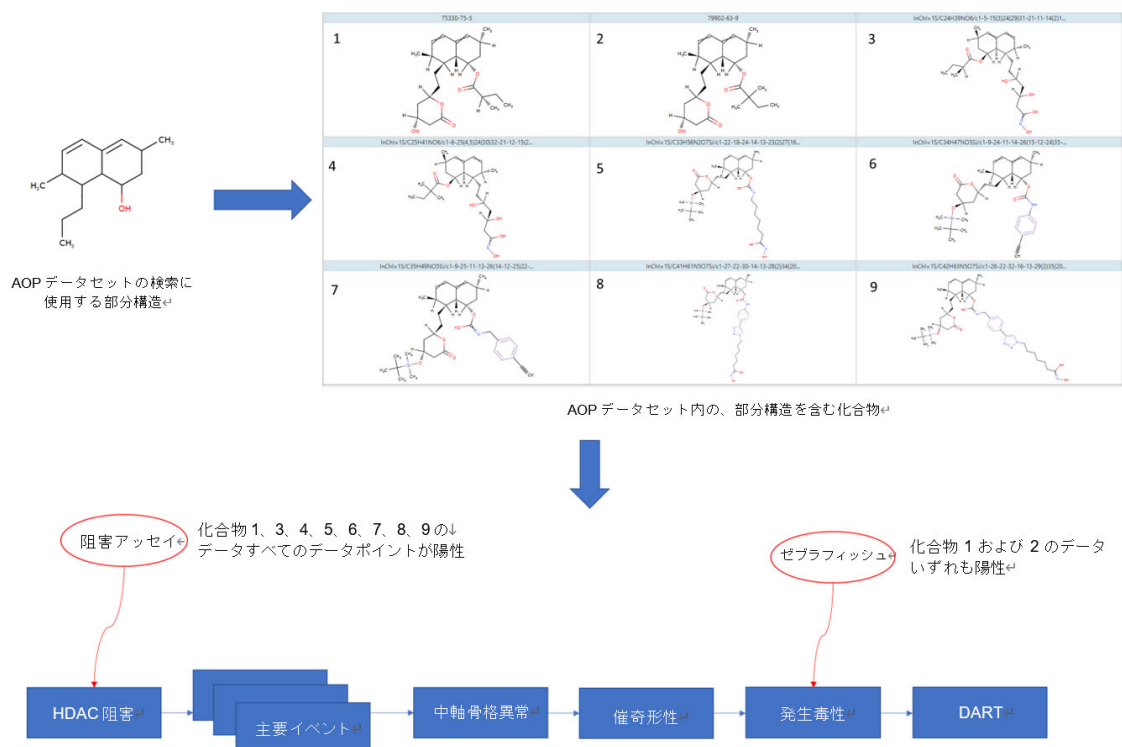


図 5 : AOP データセット内で特定された関連部分構造を含む化合物

(上記の化合物(A)を除く) これらの化合物のデータは、HDAC AOP 上に示されている。

このような状況では、毒性データが存在する類似体を用いたリードアクロスにより、化合物の潜在的な毒性を評価することができる。スタチンに共通の部分構造を用いた、HDAC AOP アッセイデータベースの部分構造検索により、9 つの関連化合物が同定された (図 5)。

図 5 のスタチンのうち 1 つを除くすべてについて HDAC 阻害データが得られており、これらの化合物が様々な HDAC を阻害できることが示された。2 つの化合物についてゼブラフィッシュアッセイのデータが得られており、いずれも発生毒性を引き起こすことが示された。この代替アッセイデータは、これらの化合物が既知の MIE を介した有害性発現を引き起こす潜在的リスクを有することを示している。したがっ

て、類似化合物のデータに基づき、図 5 に示す化合物を HDAC 阻害剤および潜在的な発生毒性物質とみなすことができる。これらの詳細は、この化合物の催奇形性や作用機序を確定するものではないが、この結果はこの化合物に関連したリスクの可能性を示しており、これは追加試験により確定または否定することが可能である。スタチンは、コレステロールの生合成に関与する酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害するように設計されている [Sirtori 2014]。したがって、ゼブラフィッシュモデルで観察された発生毒性の原因が HMG-CoA 還元酵素の阻害である可能性があり、推定 AOP としてこれを調査する必要がある。

D. 考察

AOPは随時更新される生きた文書であり、新たなエビデンスが得られる度に修正することができる。アッセイ結果を経路に関連付けることができるデータモデルでAOPの枠組みを拡張することにより、更なる情報の集中化がもたらされた。これは関連情報を求めるリスク評価者にとって有用である可能性がある。今回収集されたデータおよび知識をレビューすることにより、AOPを安全性評価の改善に使用できる3つのシナリオを特定することができた。

Case 1では、催奇形物質として知られているバルプロ酸を例として取り上げ、HDAC阻害に始まる各KEに関連する試験法でも陽性結果を得ることができ、結果として当該AOPを経由した発生毒性を示すことを確認できた。Case 2では、TG422試験が陽性であり且つ、HDAC阻害DBに含まれる2-エチル酪酸を例として検証が行われたが、HDAC阻害活性のデータが限定的であり、仮説の裏付けに必要な試験経験を選別することが可能となった。Case 3では、いくつかの類似構造にHDAC阻害活性があるが発生毒性データの無いスタチン類似構造化合物についての検討が行われ、そのうちの2つの化合物におけるゼブラフィッシュ陽性結果からHDAC阻害による潜在的な発生毒性物質群の推定が可能となった。

今回、検証した事例研究では、単一のHDAC阻害AOPを用いて各種試験法のデータを評価することに焦点を当てた。AOPネットワークにおける各試験法の結果を利用することで、評価者が更なる仮説を立て、追加の試験戦略実施できるようになることや、更なる試験法の結果と解釈を関連付けることにより、複数の試験法からなら総合的な試験戦略の開発に役立つことも明らか

となった。

E. 結論

これまでの研究では、反復投与毒性、生殖発生毒性への*in silico*手法の適用に関して、機序に基づくリードアクロスの適用を目指して、データベースの構築、カテゴリーの構築、有害性発現経路(AOP)の開発を行ってきたが、令和4年5月20日3年度は機序に基づくリードアクロスの信頼性の向上へ向けて、AOPキーイベント等のデータを評価目的に適合するよう選択し、リスク評価に適用する場合のケーススタディを実施することにより、AOPアプローチの優位性を検証することを目的とした。AOPに基づく生殖発生毒性の予測系構築に関して、今年度は、既存化学物質点検結果あるいは文献情報等による生殖発生毒性エンドポイントを基にしたヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)結合阻害のAOPを用いてケーススタディを行い、具体例を基にリスク予測におけるAOPに基づくアプローチの有用性と課題を検証した。その結果、アッセイ結果を経路に関連付けることができるデータモデルでAOPの枠組みを拡張し、さらなるデータおよび知識をレビューすることにより、AOPを安全性評価の改善に使用できる3つのシナリオを検証した。

(参考文献)

1. Ververis K., Hiong A., Karagiannis T.C., Licciardi P. V, Histone deacetylase inhibitors (HDACIs): multitargeted anticancer agents., *Biologics*. 7 (2013) 47–60. doi:10.2147/BTT.S29965.
2. Haberland M., Montgomery R.L., Olson E.N., The many roles of histone

- deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy., *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 32–42. doi:10.1038/nrg2485.
3. Genschow E., Spielmann H., Scholz G., Seiler A., Brown N., Piersma A., Brady M., Clemann N., Huuskonen H., Paillard F., Bremer S., Becker K., The ECVAM international validation study on *in vitro* embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *European Centre for the Validation of Alternative Methods.*, *Altern. Lab. Anim.* 30 (2002) 151–76. doi:10.1177/026119290203000204.
 4. Genschow E., Spielmann H., Scholz G., Pohl I., Seiler A., Clemann N., Bremer S., Becker K., Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests., *Altern. Lab. Anim.* 32 (2004) 209–44. doi:10.1177/026119290403200305.
 5. Spielmann H., Genschow E., Brown N.A., Piersma A.H., Verhoef A., Spanjersberg M.Q.I., Huuskonen H., Paillard F., Seiler A., Validation of the rat limb bud micromass test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests., *Altern. Lab. Anim.* 32 (2004) 245–74. doi:10.1177/026119290403200306.
 6. Piersma A.H., Genschow E., Verhoef A., Spanjersberg M.Q.I., Brown N.A., Brady M., Burns A., Clemann N., Seiler A., Spielmann H., Validation of the postimplantation rat whole-embryo culture test in the international ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests., *Altern. Lab. Anim.* 32 (2004) 275–307. doi:10.1177/026119290403200307.
 7. Paquette J.A., Kumpf S.W., Streck R.D., Thomson J.J., Chapin R.E., Stedman D.B., Assessment of the Embryonic Stem Cell Test and application and use in the pharmaceutical industry., *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 83 (2008) 104–11. doi:10.1002/bdrb.20148.
 8. Lee S.H., Kang J.W., Lin T., Lee J.E., Jin D. II, Teratogenic Potential of Antiepileptic Drugs in the Zebrafish Model, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 1–6. doi:10.1155/2013/726478.
 9. Sirtori C.R., The pharmacology of statins., *Pharmacol. Res.* 88 (2014) 3–11. doi:10.1016/j.phrs.2014.03.002.
- F. 研究発表**
1. 論文発表
 1. 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.
 2. 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.
 3. 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.
4. 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.
 5. 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*.
 6. Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Girard P, Halamoda-Kenzaoui B, Hinton D, Hirose A., Hoeverler A, Honma M, Hugas M, Ishida S, Kass GE, Kojima H, Krefting I, Liachenko S, Liu Y, Masters S, Marx U, McCarthy T, Mercer T, Patri A, Pelaez C, Pirmohamed M, Platz S, Ribeiro AJ, Rodricks JV, Rusyn I, Salek RM, Schoonjans R, Silva P, Svendsen CN, Sumner S, Sung K, Tagle D, Tong L, Tong W, Eijnden-van-Raaij JVD, Vary N, Wang T, Waterton J, Wang M, Wen H, Wishart D, Yuan Y, Slikker W Jr. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **247**(1), 1-75, 2022.
 7. Matsumoto M, Takano M, Takabe M, Yamaguchi N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Hirose N, Inoue K, Hirose A. Initial hazard assessment of ethyl(dimethyl)(tetradecyl)ammonium ethyl sulfate: Genotoxicity tests and combined repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening in rats. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **122**, 104914, 2021.
 8. Matsumoto M, Fujii S, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Murata Y, Inoue K, Hirose A. Repeated-dose and reproductive/developmental toxicity screening of polyoxymethylene in rats. *Fundam. Toxicol. Sci.* **8**(4), 103-116, 2021.
 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. Iso T, Natsume M, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonohydrazide) in liver and glandular stomach of MutaTM Mouse. *Fundam. Toxicol. Sci.* **9**(2), 31-36, 2022.
2. 学会発表
 1. 広瀬明彦：行政利用を目的とした定量的有害性評価手法の開発、第48回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Webハイブリッド開催）
 2. 田邊 思帆里、Sabina QUADER、小野 竜一、Horacio CABRAL、青柳 一彦、広瀬明彦、Ed PERKINS、横崎 宏、

- 佐々木 博己：慢性的活性酸素種からヒト治療耐性胃がんへ至る有害性発現経路の開発及び分子ネットワーク解析、第 48 回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
3. 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（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 4. 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ー統合毒性データベースを利用した事例ー、第 48 回日本毒性学会学術年会（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 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（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 6. 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（2021.7.7-9、神戸・Web ハイブリッド開催）
 7. Akiko Ohno, Yoshio Okiyama, Akihiko Hirose, Kiyoshi Fukuhara：Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes, 262nd ACS National Meeting & Exposition (online 開催), Aug 22 - Aug 26, 2021 (Atlanta, GA)
 8. 広瀬明彦：ニトロソアミン曝露許容値設定の考え方、ICH M7/QSAR ワークショップ（日本環境変異原ゲノム学会 第 50 回記念大会）2021.10.29、Web 開催）
- G. 知的所有権の出願・登録状況**
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし