

令和3年度 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）  
（21KD2005）総括研究報告書

*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

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、Ames 変異原性を対象とした QSAR の高度化と、*in vivo* 毒性を対象とした New Approach Methodology (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基盤整備を行う。

Ames データベースの精緻化については、安衛法試験結果のデータベース精密化を完了させるとともに、Ames 陽性の懸念が高いが既存データベースでは陰性の報告に偏っている芳香族 N-ニトロソ 6 化合物の実試験を完了させ、結果の整理および考察を進めている。

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ついては、ジクロロニトロベンゼン異性体を対象に、種々の代謝予測モデルと類似物質の既存の代謝データを活用することにより、予測の不確実性を減少させ、代謝の類似性に基づく毒性発現を予測する方法の妥当性を検証した。

生殖発生毒性予測系構築では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害の有害性発現経路 (AOP) を用いてケーススタディを行い、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。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、更なるデータ及び知識をレビューし、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。

*In vitro-in vivo* 外挿 (IVIVE) 用の生理学的動力学 (PBK) モデル構築のための基盤整備では、R 言語で構築した各 PBK モデルで、既報と同様に血中濃度や NOAEL を推定する事が出来た。モデルパラメータについては、情報源により値にバラツキがある事が確認された。各種情報源より入手したパラメータを用いて IVIVE を試行した結果 8 物質中 4 物質について期待値の 1/10~10 倍の範囲の値が得られ、大きな感度を有するパラメータの特定が出来た。

機械学習による皮膚感作性の予測モデル構築については、既存の文献情報から *in vitro* 実験結果を予測する高性能なモデルが得られた。また、化学物質の構造情報のみからヒトでの皮膚感作性の有無を判別する高性能なモデルも構築した。

上記 5 つの分担研究は、着実に結果を積み重ねていずれも初年度の計画を達成できる見込みであり、本研究は順調に推移している。

## 研究分担者

杉山 圭一

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
変異遺伝部 部長

古濱 彩子

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
変異遺伝部 主任研究官

本間 正充

国立医薬品食品衛生研究所  
副所長

広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
安全性予測評価部 部長

松本 真理子

国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
安全性予測評価部 主任研究官

安部 賀央里

名古屋市立大学 大学院薬学研究科  
レギュラトリーサイエンス分野 講師

## 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いるが、ヒト健康リスク評価における利用は限定的である。定量的構造活性相関（QSAR）は、ICH M7ガイドラインに基づいた医薬品不純物の遺伝毒性評価において利用されるようになったが、化学物質の規制上での使用を拡大させるためには、高品質のデータセットの使用、モデルの予測精度の更なる向上、予測結果の信頼性を評価する方法等、本アプローチの高度化が求められている。

また、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。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。諸外国の規制当局は、新しい動物試験要求を最小限に抑え、NAMの活用を促進するビジョンやロードマップを近年相次いで公表している。一方で、NAMデータを活用した有害性評価の行政的受け入れは未だ限られており、ケーススタディによって、その信頼性や規制上のニーズを満たすことに貢献できるかを概念実証することが求められる。さらに、その受け入れを促進するために、NAMの知識をリスク評価の関係者が共有することが必要である。

そこで本研究では、Ames変異原性を対象としたQSARの高度化と、*in vivo* 毒性を対象とした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基盤整備を行う。Ames変異原性については、安衛法試験結果を新規データセットとして世界中のQSARベンダー等に提供することにより、QSARモデルの改良を目指す第一回国際共同研究プロジェクトを先導し、予測精度の向上に貢献を果たした。本研究では、新規デー

タの追加と、専門家による既存試験データの再評価を実施することにより高信頼性のデータセットを開発する（令和3年度）と共に、国内外の専門家から知見を得てQSAR予測の向上に資する改良を推進し、情報共有する（令和4、5年度）。Ames QSARの結果を行政における判断基準として積極的に活用する統合的な遺伝毒性評価系開発の基盤を構築する。

反復投与毒性、生殖発生毒性については、リードアクロスの適用範囲の拡大を目指して、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、NAMデータを活用した統合的アプローチの優位性を検証する。反復投与毒性では、化学物質の既知の代謝情報を収集し、種々の代謝予測モデルと類似物質の既知代謝情報を組み合わせて代謝予測の不確実性を減少させ、代謝カテゴリーの精緻化を図る（令和3年度）。継続してその適用範囲拡大を図るとともに、ヒト外挿性向上を考慮したヒト代謝予測モデルの化学物質に対するパフォーマンスを評価する（令和4、5年度）。生殖発生毒性では、毒性エンドポイントに関連するキーイベントに基づいたAOPを、リードアクロスに適用する際のケーススタディを検証する（令和3年度）。さらなる毒性データ収集と新規AOPを開発して、その利点や課題を抽出してAOPの適用拡大を目指すための基礎的な知見を得る（令和4、5年度）。

化学物質の体内動態シミュレーションに利用する生理学的動力学（PBK）モデルに必要なパラメータの既報値は限られており、適用範囲拡大のためには、*in vitro*試験データ/*in silico*推計データの利用が有効と考えられる。諸外国において*in vitro-in vivo*外挿（IVIVE）が活発に行われるようになってきたことを考慮し、モデルパラメータの*in silico*推定手法等の調査を行い、その精度評価を試みる（令和3年度）とともに、ケース

スタディによる有害性評価、ヒト健康リスク評価への適用の可能性を検討する（令和4、5年度）。

機械学習などの人工知能（AI）アプローチは、リスク評価の様々なステップで、急速に増加する多様で関連性のあるデータの有効活用をサポートする大きな可能性を有している。皮膚感作性を対象に、機械学習を活用して予測モデルを構築し、予測精度や適用範囲、結果の説明性等を評価する（令和3年度）。さらに、将来の他毒性エンドポイントへの適用を視野に入れ、皮膚感作性のケーススタディを行い規制安全性評価への受け入れへ向けた課題整理を行う（令和4、5年度）。

## B. 研究方法

### B.1. 遺伝毒性評価に資するAmes/QSARの深化（杉山・古濱・本間）

QSARによるAmes予測精度向上に必須となる高信頼性のデータセットを開発するため、i) 試験結果の再評価とii) Ames変異原性試験を実施した。i) 再評価対象は12140物質の安衛法試験結果である。精査に用いる結果報告書が入手可能なのは10694物質であった。令和3年3月末現在、A判定（Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg以上の強い陽性と判定される物質）およびB判定（Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質）は全て評価を終えており、C判定（Ames試験における陰性判定物質）の評価途中であった。今年度は、再評価未実施のC判定の2980物質に対し精査を行った。

ii) 芳香族N-ニトロソ化合物に注目し、6物質のAmes試験の計画を立てた。

更に、実施中の第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトについては、参加チームから結果の精査と共有を行った。

### B.2. 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 (山田)

代謝予測ツールとして、OECD IATA Case Studies Projectの複数の事例研究で使用実績があるLhasa社のMeteor (v.3.1.0)を使用した。さらに、医薬品の創薬・安全性研究においてしばしば使用されているとされるGLORYxを選定した。いずれのツールもPhase IIの代謝予測も可能である。対象物質として、二つのジクロロニトロベンゼン異性体を選んだ。既存の代謝情報や予測ツールによる既知の代謝物構造の再現など複数のエビデンスを用いて、毒性発現につながる代謝物の予測の信頼性を評価した。類似物質の構造と毒性情報をNIHS統合DBの反復毒性試験結果から収集し、代謝と毒性機序の類似性に基づきグループ化を行い、その反復投与毒性と毒性レベルをリードアクロスにより予測した。

動物試験結果のヒト外挿性向上とNAMデータ利用の留意点を代謝の観点から検討するため、ヒトCYPを対象に、代謝予測モデルの利用可能性を調査した。

### B.3. AOP に基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究 (広瀬)

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) 阻害のAOPを用いて、以下の事例研究を実施し、生殖発生毒性エンドポイント評価に対するAOPがどのように適用できるかを検証した。

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

### B.4. In vitro-in vivo外挿 (IVIVE) 用の生理学的動力学 (PBK) モデル構築のための基盤整備 (松本)

発生毒性や内分泌かく乱影響を対象としたIVIVEを検討している既存研究を調査し、PBKモデルの詳細等が記載され、外挿の過程が再現可能な研究論文を選択し、使用されている各PBKモデルの構造を解析し、R言語でモデルをコード化し、それらの予測再現性を確認した。また、投与量-血中濃度関係の確立に必要なパラメータの推定に使用された手法についても解析した。

さらに、解析したPBKモデルによる計算に必須のパラメータである血漿蛋白非結合率 ( $f_{up}$ )、Caco-2 細胞膜透過速度 ( $P_{app}$ ) および代謝クリアランス ( $CL_{int}$ ) に関して、フリーでアクセス可能なオンライン推定ツールや検索ツールを検討し、得られる値を論文既報値等と比較することにより、それらの有用性の確認を行った。

調査したオンラインデータベースおよび推定ツールから得たパラメータ値を用いて、8物質の15 *in vitro* アッセイの結果をIVIVEに供した。

### B.5. 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と化学物質のリスク評価への活用に関する研究 (安部)

皮膚感作性の*in silico*予測モデルの精緻化として、*in vitro*実験の予測モデル構築に着手した。AOPにおいて、分子開始イベントMIE (タンパク質との共有結合) を評価するDPRA (OECD TG442C) とKey Event2 (角化細胞における炎症性応答) を評価するKeratinoSens<sup>TM</sup> (OECD TG442D) に着目し、DPRAからKeratinoSens<sup>TM</sup>を予測する*in silico*モデルを構築した。既存の文献情報からKeratinoSens<sup>TM</sup>の陽性、陰性物質を抽出し、説明変数をDPRAの実験値とMOEを用いて算出した化学物質の構造情報である分子記述子とした。勾配ブースティング決定木系のアルゴリズムを使用して機械学習による予測モデルを構築した。

また、ヒトの皮膚感作性評価を*in silico*で予測する機械学習モデルを構築した。既存の文献情

報からヒトの皮膚感作性の有無に関するデータを抽出し、MOEを用いて化学物質の分子記述子を算出し、説明変数として使用した。勾配ブースティング決定木系のアルゴリズムにより予測モデルを構築した。

## C. 研究結果

### C.1. 遺伝毒性評価に資するAmes/QSARの深化 (杉山・古濱・本間)

i) 複数名の遺伝毒性専門家による精査を実施した結果、未評価であったC判定2980のうち17物質について陽性B判定の専門家判定を下した。なお、15物質の報告書については、一部欠落などで評価不能であり、C判定のままとした。

最終的な専門家判断では、A判定649、B判定1150、C判定10335、合計12134（評価不能6）の分類となった。評価前のA判定672、B判定1085、C判定10383、合計12140からは、A判定26物質、B判定18物質、C判定66物質に対し、評価の変更が行われた。

ii) ① 3-nitrosomethylaminopyridine; ② 4-nitrosomethylaminopyridine; ③ *n*-nitroso-*n*-ethylaniline; ④ benzenamine, *n*-nitroso-*n*-phenyl-; ⑤ *n*-nitrosodibenzylamine; ⑥ *N*-methyl-*N*-phenylnitrous amideの6物質の芳香族*N*-ニトロ化合物に対しAmes試験の実施計画をたてた。これら6物質のうち、ハンセンデータベースでは、⑥以外の5物質が陰性の報告であった。一方で、統計ベースQSARであるCaseUltraのGT1\_BMUTモデルにおける陽性の可能性の高さは98%以上であり、①、②、④、⑤は既知の陽性、③、④は既知の陰性の予測結果となった。知識ベースQSARであるDerek Nexusでは6物質のうち④以外の5物質が陽性（PLAUSIBLE）の予測結果であった。既存データの結果とQSAR評価が一致しておらず試験による検証がAmes予測精度の向上に資する物質群であった。令和3年度Ames試験の実施を終え、6剤のうち5剤で陽性の結果であった。Hansenデー

タベースに記載された根拠となる原著論文の精査等、結果の解析を進めおり、令和4年度以降考察を進めていく。

更に、第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトについて、参加全19チームの同意を得て2021年7月に予測精度の統計値データ等の結果を参加チームメンバーに限定して共有した。第2回プロジェクトの結果では、モデルの特異度（陰性物質を陰性と判定できる能力）は比較的高いが、感度（陽性物質を陽性と判定できる能力）が低い傾向であった。学習データの陰性・陽性バランスや化学物質の構造を含めた精査の必要性等の問題点が整理された。なお、第2回プロジェクトでの参加チームは2チーム増え、11か国21チームの構成となった。2021年10月以降は第2回プロジェクトの参加者の追加を締めきり、21チームの予測結果を用いた議論を深め、指標の概要などを学会や学術論文で公開することとした。

### C.2. 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 (山田)

代謝物予測に基づく毒性予測では、1,3-dichloro-2-nitrobenzeneと1,3-dichloro-5-nitrobenzene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た。ニトロ基のアミノ基への還元のプロセスで生成されるN-水酸化体による生体高分子への作用およびGSHとの抱合反応によるGSH枯渇が溶血および肝毒性発現に関わると考えられた。そこで、評価対象物質の類似物質における実測の代謝物（GSH抱合体およびジクロロアニリン）を予測モデルが正しく予測できるかを検証した。このクラスの物質の代謝については、Meteorが正しい予測を適切な根拠情報とともに提示した。そこで、評価対象物質の代謝をMeteorで予測し、その類似性に基づき、毒性データの信頼性、毒性を過小に予測しないことなども考慮して適切な類似物質を選

定した後、対象物質の最も感受性が高いと考えられた毒性エンドポイント（溶血影響）と LOAEL をリードアクロスにより予測し、不確実性係数を除して、化審法スクリーニング評価の有害性クラス分類を行った。

ヒトの主要薬物代謝酵素である CYP3A4 を対象に、2D モデル（SMARTCyp、ADMET Predictor、GLORY）を適用した。44 基質について 3 番目までの代謝物構造または代謝部位の予測精度を検証したところ、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。

### C.3. AOP に基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究（広瀬）

AOP の事例検証を行う為に、まず HDAC 経路に関連し得る試験法を Derek Nexus および文献情報を用いて、AOP に関連する 6 つの試験法と 1 つの Derek アラートを特定し、各試験法を適切なキーイベント（KE）に関連付け、各試験法における関連物質の生物活性データを整理した。Case 1 では、催奇形物資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。

### C.4. In vitro-in vivo 外挿（IVIVE）用の生理学的動力学（PBK）モデル構築のための基盤整備（松本）

調査した 6 論文では、phenol 類、tebuconazole 等の抗菌剤、17 $\beta$ -estradiol や bisphenol A 等のエストロゲン受容体（ER）アゴニスト、acetaminophen 等の医薬品を対象に、胚性幹細胞分化、ヒト乳がん培養細胞増殖、ヒト骨肉腫細胞 CALUX、酵母エストロゲンスクリーニング、酵母アンドロゲンスクリーニング、米国 high-throughput screening programs での 16 の *in vitro* アッセイ等の結果が IVIVE の検討対象であった。使用された PBK モデルの対象臓器コンパートメントは様々であったが、R 言語で構築した各モデルは、論文に記載された血中濃度推定結果を適切に再現した。また、Quantitative Structure-Property Relationships 等の *in silico* のモデルパラメータ推定法は、主に組織/血液間の分配係数に適用され、 $f_{up}$ 、 $P_{app}$ 、 $CL_{int}$  への適用は限定的で、これらは主に *in vitro* 法で推定されていた。

次に、既存研究で検討された 35 物質を対象に、 $f_{up}$ 、 $P_{app}$ 、 $CL_{int}$  を、解析した研究で使用された手法およびオンライン推定ツールや検索ツールで整備した結果、 $f_{up}$  と  $P_{app}$  では手法間で推定値に大きな差はなかった。 $CL_{int}$  については、既存の手法等が少なく、推定値間の比較はできなかった。PBK モデルに必須のパラメータと IVIVE に必要なパラメータ（ $f_{up}$ 、 $P_{app}$ 、 $CL_{int}$  等）について、フリーでアクセス可能なオンラインデータベースと推定ツールについて、既報文献値と比較した結果、 $f_{up}$  と  $CL_{int}$  の値はかなりバラつく一方、 $P_{app}$  値にはあまりバラツキがなかった。

さらに、R 言語で構築した PBK モデルと、調査したオンラインデータベースおよび推定ツールから得たパラメータ値を用いて、8 物質の 15 *in vitro* アッセイの結果を IVIVE に供した。その結果 8 物質中の 4 物質の *in vitro* アッセイからの予測影響

量の中央値は、*in vivo* 試験のLELの中央値の1/10～10倍の範囲内に入った。また、予測影響量は、 $f_{up}$ と $f_{up, in vitro}$ に大きな感度を有した。これらの結果から、現状でIVIVEの試行を行うことは可能と判断した。

#### C.5. 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と化学物質のリスク評価への活用に関する研究 (安部)

これまでに我々が開発した皮膚感作性の強度指標 (LLNA EC3 値) の予測モデルを基に、Defined Approachのガイドライン (No.497) において検討された化学物質の試験情報を使用してモデルの改良を行った。試験情報等が得られた171物質を訓練データと検証データに分割し、構築した回帰モデル (XGBoostとCatBoostを使用) において、検証データ30物質を用いて評価したところ、決定係数 $R^2$ 値が0.8程度となり高性能なモデルが得られた。

*In vitro* 実験値の予測モデル化においてHoffmann (2018)らの文献から抽出・精査した122物質を訓練用データセットとし、Urbisch (2015)らの文献から抽出・精査した103物質を検証用データセットとした。MOEを用いて算出した分子記述子440種と、分子量、LogP、DPRAの実験値2種 (システインペプチド減少率とリジンペプチド減少率) の計444種を説明変数とした。KeratinoSens™の陽性、陰性を判別する機械学習モデルを構築したところ、検証用データセットにおいて、感度0.881、特異度0.629、ROC-AUC 0.8が得られ、高い予測性能を示した。モデルはPython3.8.5のXGBoostClassifierを使用した。

ヒトの皮膚感作性予測モデルにおいて、Golden(2020)らの文献から抽出・精査した437物質を訓練用データセットとし、Hoffmann(2018)らの文献から抽出・精査した29物質を検証用データセットとした。MOEを用いて算出した分子記述子53種を説明変数とし、ヒト

の感作性の有無を目的変数とした。検証用データセットにおいて、感度0.840、特異度0.670、ROC-AUCが0.907であり、高い予測性能を示した。モデルはPython3.8.5のCatBoostClassifierを使用した。

#### **D. 考察**

##### D.1. 遺伝毒性評価に資するAmes/QSARの深化 (杉山・古濱・本間)

i) 第1回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトで評価対象とした12140物質に対し可能な範囲で、安衛法試験結果を見直し精査を完了させた。結果取違の様な単純なミスも含むが、110物質 (約1%) は専門家判断による結果変更があった。今後は、どの様な構造・物性の特徴がある物質で専門家判断による変更が行われたのか考察を進めることで、優先的に専門家判断を必要とする物質の方向付けが可能となる。

ii) データベースの精緻化が望まれる物質として、陽性の懸念は高いが陰性の報告がされている物質やAmes/QSAR予測が難しい警告構造(Alert構造)が挙げられる。これらの物質に対し、Ames試験を行い、データをアップデートすることはAmes/QSARの改善に直接寄与する。本年度は前者の典型である芳香族N-ニトロソ化合物に注目して、試験を実施した。令和4年度以降も、芳香族を中心としたN-ニトロソ化合物を含む試験を実施し、比較検討することで、QSARの構築に必要な精緻なアラート構造および予測の基盤となる変異原性メカニズムの解明を目指す。

第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトについて、令和3年度は低感度な要因を一般的に整理していった。令和4年度には、チームが特定されない形で成果を発表し、議論を深める準備を完了させ、成果を学会発表および原著論文文化することを目標とする。

##### D.2. 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 (山田)

毒性発現につながる代謝予測の不確実性を減少させる方法を検討した。多くの代謝予測ツールは、推定代謝物構造を数多く提示し、その取捨選択はユーザーに委ねられる。代謝予測の専門家判断を支援するエビデンスとして、類似物質の実測代謝を正しく予測できるか、すなわちローカルな予測精度を別途確認することが、代謝と毒性発現の予測を総合的に判断する上で有効であることが示唆された。

これらは、現在 OECD の QSAR Assessment Framework プロジェクトで検討されている予測結果の妥当性評価の方法の一部を取り入れたものである。複数のツールの利用と他の物質への展開を図って試行事例を積み重ねて、代謝の類似性に基づくカテゴリアプローチにより反復投与毒性を予測できる範囲を拡大させることが期待される。本アプローチの効率化のためには、実測の代謝情報を集約する必要がある。今年度は、約1000の化学物質について、点在する既報の代謝物構造情報の収集と一元化を進めている。

CYP代謝予測モデルは、*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とから、毒性予測に有用である。CYP3A4の代謝はラットとヒト間の種差が比較的小さいと考えられており、ヒトCYP3A4代謝予測の結果は、動物試験の結果のヒトへの外挿に対し有益な情報を提供できると期待される。予測精度の評価を継続し、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。

### D.3. AOP に基づく生殖発生毒性の予測系構築に関する研究 (広瀬)

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。

### D.4. *In vitro-in vivo*外挿 (IVIVE) 用の生理学的動力学 (PBK) モデル構築のための基盤整備 (松本)

米国での IVIVE 研究は、high-throughput screening programsデータの活用を前提としたシンプルなモデルによる迅速な評価が基本であるのに対して、欧州の研究ではベンチマーク用量モデルによる濃度(量) - 反応評価を含む丁寧な検討が行われており、現時点ではより参考になると思われる。外挿の対象とする*in vivo*毒性エンドポイント、それに関連する*in vitro*試験の選定については、参考となる先行研究があることや、*in vivo*及び*in vitro*の試験情報の多さの観点から、子宮肥大とそれに関わるエストロゲン作用の*in vitro*試験が適当であると考えられた。来年度はこれらの条件を満たす物質の選定を行う予定である。

### D.5. 機械学習を用いた皮膚感作性試験代替法の開発と化学物質のリスク評価への活用に関する研究 (安部)

*In vitro*実験値の予測モデル化において、既存の文献情報から作成したKeratinoSens™の機械学習モデルは高い予測性能を示した。*In vitro*実験は動物を使用しない代替法として有用だが、*in silico*と比較するとコスト、時間がかかるため、高性能な予測モデルは皮膚感作性の評価において実験値が無い場合の穴埋めや、*in vitro*実験が必要かどうかのスクリーニングにも使用できる。また予測モデルの変数重要度の結果から、KeratinoSens™の予測にはDPRAのシステインペプチド減少率が大きく関連していることがわかった。これらの情報はAOPの検証やさらなる理解にも有益だと考えられる。



ヒトの皮膚感作性予測モデルにおいて、化学物質の構造情報のみから、感作性の有無を精度良く判別する機械学習モデルが構築できた。動物実験代替法において、最終的な目標はヒトでの有害事象の予測であるため、有益な結果となった。今後、変数重要度の検討や*in vitro*実験値を加えたモデルの構築が必要だと考えている。

## E. 結論

Amesデータベースの精緻化については、安衛法試験結果のデータベース精密化を完了させるとともに、Ames陽性の懸念が高いが既存データベースでは陰性の報告に偏っている芳香族*N*-ニトロソ6化合物の実試験を完了させ、結果の整理および考察を進めている。

代謝予測に基づく反復投与毒性リードアクロモデルの高度化については、種々の代謝予測モデルと類似物質の既存の代謝データを活用することにより、予測の不確実性を減少させ、代謝の類似性に基づく毒性発現を予測する方法の妥当性を検証した。

生殖発生毒性予測系構築では、HDAC阻害から催奇形性へ至る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。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、更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。

IVIVE用のPBKモデル構築のための基盤整備では、発生毒性や内分泌かく乱影響を対象としたIVIVE手法を用いた米国および欧州の先行研究を調査し、そのうち6論文のPBKモデルについてR言語による予測モデルの再現を行うことができた。

機械学習による皮膚感作性の予測モデル構築については、既存の文献情報から*in vitro*実験結果

を予測する高性能なモデルが得られた。また、化学物質の構造情報のみからヒトでの皮膚感作性の有無を判別する高性能なモデルも構築した。

以上のことから本研究は順調に推移している。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama K, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure–activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™. *Genes and Environ.* **43**, 16, 2021.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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*.
10. Anklaam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Girard P, Halamoda-Kenzaoui B, Hinton D, Hirose A, Hoeveler 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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 Muta™ Mouse. *Fundam. Toxicol. Sci.* **9**(2), 31-36, 2022.
15. 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.
16. Ambe K, Suzuki M, Ashikaga T, Tohkin M. Development of quantitative model of a local lymph node assay for evaluating skin sensitization potency applying machine learning CatBoost. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **125**, 105019, 2021.

17. Ambe K, Ohya K, Takada W, Suzuki M, Tohkin M. *In Silico* Approach to Predict Severe Cutaneous Adverse Reactions Using the Japanese Adverse Drug Event Report Database. *Clin. Transl. Sci.* **4**(2), 756-763, 2021.
2. 学会発表
1. 古濱 彩子, 杉山 圭一, 本間 正充 : 毒性予測活用への取り組み : 第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト. CBI 学会 2021 年大会 (2021.10.27, Online)
  2. Furuhama A. Bigdata Analysis: Outcome of the 2nd AMES/QSAR International Challenge Project . 11th Annual Global Summit on Regulatory Science (GSR21) (2021.10.5, Online)
  3. 古濱 彩子, 杉山 圭一, 本間 正充 : Ames/QSAR の必要性・具体例と国内外のインシリコ研究. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7, 神戸-Online Hybrid)
  4. 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)
  5. 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)
  6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. 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 (2021.7.7-7.9, 神戸 -Online Hybrid)
  10. 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)
  11. 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).
  12. Ohno A, Watanabe M, Hirose A : Application to toxicity evaluation of ilicone dioxide nanoparticles based on physicochemical properties using multivariate analysis method. The international chemical congress of PACIFIC BASIN SOCIETIES 2021

- (2021.12.16- 21, Online)
13. 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, Online)
  14. 広瀬 明彦：BMD 法の基礎、活用の歴史について. 哺乳動物試験研究会 (JEMS・MMS 研究会) 第 79 回定例会 (2021.10.11, Online)
  15. Ohno A, Okiyama Y, Hirose A, Fukuhara K : Docking study on the position of nitro groups affecting the mutagenicity of nitroarenes. 262nd ACS National Meeting & Exposition (2021.8.22- 26, Online)
  16. 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 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
  17. 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 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
  18. Ohno A, Watanabe M, Hirose A：ナノマテリアルの物理化学的性状に基づく毒性評価手法への応用. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7-7.9, 神戸-Online Hybrid)
  19. 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)
  20. Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Shigeta Y, Iso T, Hirose A : Hazard assessment of disinfection by-products, bromo chloroacetic acid and bromo dichloroacetic acid, in drinking water. EUROTOX 2021(2021.9.27- 10.1, Online)
  21. 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)
  22. 磯 貴子, 村田 康允, 重田 善之, 広瀬 望, 堀端 克良, 増村 健一, 杉山 圭一, 松本 真理子, 広瀬 明彦：食品用器具・容器包装のポジティブリスト収載物質「4, 4'-オキシビス(ベンゼンスルホノヒドラジド)」の遺伝毒性評価. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
  23. 村田 康允, 重田 善之, 磯 貴子, 広瀬 望, 松本 真理子, 広瀬 明彦：水道水要検討項目「ブロモジクロロ酢酸」の有害性評価. 第 48 回日本毒性学会学術年会 (2021.7.7 - 7.9, 神戸-Online Hybrid)
  24. 伊藤潤, 安部 賀央里, 足利太可雄, 頭金正博：ヒト皮膚感作性データを用いた機械学習による in silico 予測モデルの開発. 日本薬学会第 142 年会 (2022 年 3 月 Online)
  25. 家田 維哉, 安部 賀央里, 頭金 正博：医薬品副作用自発報告データベースを用いたアンサンプル機械学習モデルによる薬剤性急性腎障害の予測. 第 42 回日本臨床薬理学会学術総会 (2021 年 12 月 仙台-Online Hybrid)
  26. 土井 更良, 安部 賀央里, 頭金 正博：機械学習による薬物性肝障害の予測～大規模副作用報告データベースの活用～. 第 42 回日本臨床薬理学会学術総会 (2021 年 12 月 仙台-Online Hybrid)
  27. 安部 賀央里：機械学習法による特異体質性副作用の予測. シンポジウム 臨床薬理学と人工知能、第 42 回日本臨床薬理学会学術

- 総会 (2021年12月 仙台-Online Hybrid)
28. 秋田 彩佑, 魏 捷, 安部 賀央里, 頭金 正博: 既存の臨床試験データを用いた直接経口抗凝固薬の有効性と安全性に関する民族差の検討 Young Investigator Award 第31回日本医療薬学会年会 (2021年11月 Online)
  29. 東野 竜空, 中森 瑞季, 安部 賀央里, 頭金 正博, 佐々木 崇光, 吉成 浩一: 機械学習によるラット薬物代謝酵素および胆汁酸トランスポーターの阻害活性予測モデルの開発. 日本動物実験代替法学会第34回大会 (2021年11月 Online)
  30. 安部 賀央里: 化学物質の安全性評価における *in silico* 予測モデル. フォーカストセッション FS-07 創薬における WET 研究者と計算毒性学とのコラボレーション、および最新の安全性評価研究と Ames/QSAR 国際チャレンジプログラム. CBI 学会 2021 年大会 (2021年10月 Online)
  31. Saki Katayama, Sarara Doi, Takayuki Tachiki, Kaori Ambe, Masahiro Tohkin, Toshimasa Jindo: Development of *in silico* prediction method for idiosyncratic drug-induced liver injury. CBI 学会 2021 年大会 (2021年10月 Online)
  32. 安部 賀央里: 毒性データベースを用いた化学物質のインシリコ毒性予測. シンポジウム S5: 計算機科学が拓く薬学の未来、第65回日本薬学会関東支部大会 (2021年9月 Online)
  33. 片山 早紀, 土井 更良, 立木 孝幸, 安部 賀央里, 頭金 正博: *in vitro* 試験情報を利用した薬物性肝障害の *in silico* 予測手法の開発. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021年7月 神戸-Online Hybrid)
  34. 中森 瑞季, 東野 竜空, 安部 賀央里, 頭金 正博, 佐々木 崇光, 吉成 浩一: 機械学習を用いた薬物代謝酵素阻害活性の *in silico* 予測手法の開発. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021年7月 神戸-Online Hybrid)
  35. 吉井 優花, 秋田 彩佑, 安部 賀央里, 頭金 正博: 臨床試験データを用いた疾患修飾性抗リウマチ薬とメトトレキサート併用時の有効性と安全性に関する研究. 医療薬学フォーラム 2021 (2021年7月 Online)
  36. 家田 維哉, 安部 賀央里, 頭金 正博: 医薬品副作用自発報告データベースを用いた機械学習による薬剤性急性腎障害の予測手法の開発. 医療薬学フォーラム 2021 (2021年7月 Online)
  37. 佐々木 裕, 三輪 誠, 安部 賀央里, 頭金 正博: 組み込み・除外判定を機械読解により実現した系統的レビュー. 第248回自然言語処理研究会・第226回コンピュータビジョンとイメージメディア合同研究発表会(2021年5月 Online)

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし