

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(21KD2005)

令和4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 客員研究員
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	Susanne Stalford	ラーサ研究所 研究員
研究協力者	Alex Cayley	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	ラーサ研究所 研究員

研究要旨

リードアクロスの信頼性の向上へ向けて、毒性機序に基づく生殖発生毒性(DART) AOP キーイベント等のデータをリスク評価に用いるため、REACH 登録情報など国際的なデータベースなどから毒性データを追加収集し、さらなる AOP 作成のためのデータマイニングを行うことを目的とした。令和4年度は、ECHA の REACH に登録されているデータセットを用いて、DART リスクと DART の原因となる潜在的メカニズムの探索を行った。その結果、ECHA REACH データセットの大部分は現時点での DART AOP ネットワーク内に含まれておらず、このデータセットが新たな AOP やそのメカニズム(MIE や KE 等)を開発する為の検証データセットとして有用であると考えられた。化学構造フィンガープリント法による類似性検索を用いると AOP ネットワークにヒットする物質数が上がり、*in silico* 毒性予測ツールである Derek Nexus よりも感度が高くなることがわかった。一方、偽陰性となる物質も多くあることが判明した。偽陰性となる物質について、DART と関連する Derek アラートの探索を行ったところ、ミトコンドリア毒性、トポイソメラーゼ II 阻害に関連する物質が比較的多く検出できた。今後はこれらのキーイベントに関して詳細な検討を行うことにより新たな AOP 開発が可能となると考えられた。

A. 研究目的

現在、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。この *in silico* 予測手法の一

つである定量的構造活性相関(QSAR)について、医薬品不純物の遺伝毒性評価における ICH M7 ガイドラインの中で、行政利用として利用されるようになったものの、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。R3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リスク評価に適用する場合のケーススタディにより、AOP アプローチの優位性を検証したが、依然生殖毒性に関するデータギャップが多いことも示された。そこで R4年度は、ECHA-REACH 登録情報など国際的なデータベースなどから毒性データを追加収集し、さらなる AOP 作成のためのデータマイニングを行うことを目的とした。

B. 研究方法

データセットの作成

ECHA REACH に提出された 2,278 件の研究(陽性 711 件、陰性 1,567 件)から OECD ガイドライン(TG 421、TG 442、TG 414-416、TG 443)に従って実施された試験から生殖発生毒性(DART)データを抽出した。

モデルの検証

データギャップ検証のため、ラーサ研究所

の DART AOP ネットワークに対して類似検索方法を行うとともに Derek Nexus の性能も検証した。

データマイニングと知識抽出

in silico モデルがうまく機能しない化学的・生物学的空間の領域の特定するために、ECHA REACH DART データセットにおける化合物のアッセイおよびモデル結果をレビューした。

(倫理面への配慮)本研究は動物及びヒト試料等を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

データセットの作成

ECHA REACH に提出された 2,278 件のデータセットの解析により、CAS 番号に基づいて 1,647 種の化合物を特定した。データセットの構造を SMILES から INCHI に変換し、ラーサ研究所内で開発した KNIME ノードを用いて構造標準化とコンテキスト化を行った。この処理の結果、コンテキスト化した INCHI に基づく 1,590 種、標準化 INCHI では 1,612 種の化合物について 2,237 件のデータセットを得た(表 1)。

これらは、実施されたガイドライン毎に分類され、保守的な判断で陰性と陽性の結果に分類した(表 2)。表 2 は、AOP ネットワークにリンクするための有用なデータを提供し、表 1 は、AOP ネットワークのパフォーマンスを検証するために使用した。

表 1: コンテキスト化した化合物数と試験結果が陽性と陰性の化合物数:

Dataset	Total number of study records	Total number of compounds	Positive compounds (any assay)	Negative compounds (any assay)
Contextualised	2237	1590	558	1032

表 2: ガイドライン毎に分類されたデータセットと試験結果が陽性と陰性の化合物数:

OECD Guideline	Total number of study records	Total number of compounds	Positive compounds	Negative compounds
		Contextualised	Contextualised	Contextualised
414	630	609	197	412
415	85	78	47	31
416	176	166	75	91
421	444	341	105	236
422	883	671	198	473
443	19	19	4	15

モデルの検証

ECHA REACH データセットの化合物と AOP ネットワークのデータとの重複の比較: 類似性検索機能を行うに、ECHA REACH データセット内にある、ラーサ研究所の AOP ネットワークにそのアッセイデータがある化合物の数を求めた(表 3)。

表 3 データセット化合物と AOP ネットワークデータとの重複

	All assay data associated to our AOP network*	AO assay data associated to our AOP network
Number of compounds	786/1590	313/1590

この結果は、AOP ネットワークとリンクしていない新規の 804 化合物であることを示していると共に、AOP ネットワークに既に存在する 786 化合物のうち、毒性データがあるのは 313 化合物に留まっていることを示している。このため、ECHA REACH データセットには 1,277 種の化合物に対する新たな毒性データがある。したがって、このデータセットは AOP ネットワークツールを検証するのに役立つほか、現在のデータギャップを特定することができると考えられる。

類似性検索法の検証: 類似性検索における化学的フィンガープリントを生成する為のフラグメンテーション法のうち、CERES2(ラーサ独自方法)、EFP4(Extended-Connectivity Fingerprint 法に基づいてラーサ研究所が作成した方法)および、アトムペア extended sybyl(アトムペアに基づいた独自方法)を用いて、それぞれの手法で Tanimoto 類似性閾値を 100%、90%および 80%としたときの性能を検証した。その結果、CERES2 法が類似性検索閾値の減少に対して、カバーする化合物数の増加が最も大きく、明らかに類似していない化合物とのマッチが少ないことが示された。

図 1 及び表 4 に示すように、CERES2 類似性方法(類似性 90%、80%)の性能を、AOP ネットワーク内の完全一致の性能や DART 関連 DX アラートの性能と比較した。AOP ネットワーク内の完全一致の性能で判るように、類似検索する前に 74 の偽陽性(FP)が含まれている。この FP のうち 52 は、AOP ネットワークに MIE および KE ベースのデータがある化合物であるが、必ずしも *in*

vivo 毒性試験結果を反映していない MIE や KE のアッセイ結果に基づいている可能性がある。また 74 の FP のうち残りの 22 は、有害性発現 (AO) データに基づいているが、AO ベース試験の複雑さに基づいている可能性がある。AOP ネットワーク内の完全一致の性能のモデルでは、全体のバラン

ス精度は約 55%、感度は 20% 未満であり、DX DART 関連アラートの性能とよく一致している。これらのモデルを CERES2 に基づく類似性評価法の性能と比較した場合、バランス精度は類似化合物探索で影響を受けないことが、類似性の閾値を下げると感度は約 45% に劇的に増加した。

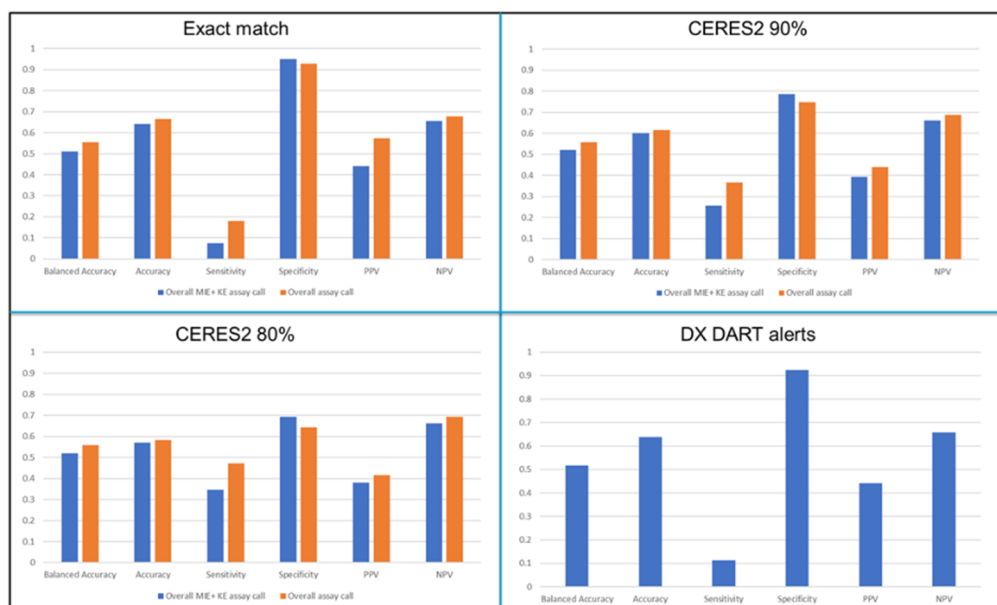


図 1：各予測法の性能の比較

表 4：各予測法の性能の比較

		Total	TP	FP	TN	FN	Equivocal	Out of Domain
exact match	Overall MIE+ KE assay call	1590	41	52	980	517	0	0
exact match	Overall assay call	1579	100	74	951	454	11	0
CERES2 0.9	Overall MIE+ KE assay call	1590	143	221	811	415	0	0
CERES2 0.9	Overall assay call	1580	203	259	767	351	10	0
CERES2 0.8	Overall MIE+ KE assay call	1590	193	317	715	365	0	0
CERES2 0.8	Overall assay call	1579	260	366	660	293	11	0
DX DART alerts	N/A	1590	63	80	952	495	0	0

類似性に基づくこの AOP 検索法は、Derek Nexus と比較して、陽性化合物の感度を改善するが改善の余地も示した。例え

ば、どのモデルでも「全体での MIE + KE アッセイコール」を「全体のアッセイコール」と比較することで感度に違いのあることが示さ

れている。これは、MIE または KE に関連する化合物とのマッチングを通じて、現時点で AOP を特定しうる DART 物質よりも多くの陽性物質を特定できる可能性のあることを示している。図 2 は、ECHA REACH データセットの陽性化合物に一致する関連データのある MIE アッセイを示したものである (CERES2 法、類似性閾値 80%)。これは、データセット内の化合物に重要な意味を持つ

とされる経路に関する知見を示しており、AOP ネットワーク内で最も多く予測される MIE が炭酸脱水酵素阻害であり、次が HDAC 阻害とアロマトラーゼ阻害であることが示されている。これ以外にも、ホルモン攪乱や神経伝達物質の阻害などの因子に関して、広範囲にわたる MIE が予測されている。

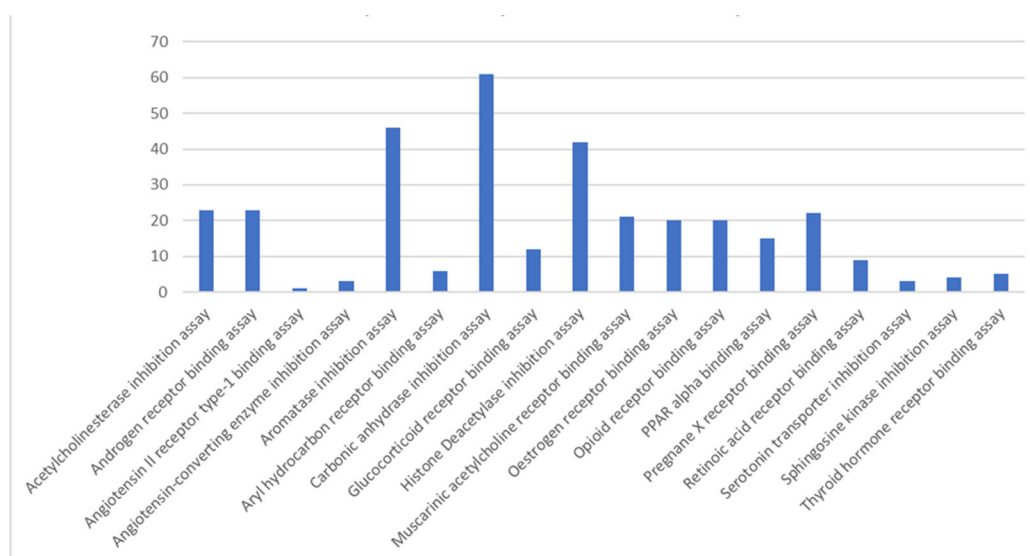


図 2: AOP ネットワークとリンクする MIE アッセイによって予測された陽性化合物の数

データマイニングと知識抽出

「全体での MIE + KE コール」を用いた AOP 類似性検索 ((CERES2 法、類似性閾値 80%)) における偽陰性 (FN) を対象として AOP ネットワーク内のデータおよびメカニズム的ギャップを調査した。FN と結びついた推定作用機序 (MoA) を特定する為、FN に関する Derek Nexus アラートの調査を行い、AOP ネットワーク内に適切な AOP があると考えられるが現時点では把握できていないものと、適切な AOP がネットワークにないと考えられるものの 2 種類をマイニングした。

まず、AOP ネットワーク内に既に適切な AOP があると考えられる FN の特定に関連する結果として、

・データセットにグルタチオン枯渇およびグルタチオンとの求電子反応に関連する Derek アラートとして 40 の FN を捕捉した (表 5)。これらのアラートは、雄の受精能低下の AOP をもたらすグルタチオン減少とリンクしている可能性があり、R 元年度の研究で既に開発したグルタチオン枯渇経路内の KE を予測する可能性もある。その他に AOP に対して 1~5 の化合物を捕捉するその他の Derek アラートが示された。

表 5:AOP ネットワーク内で KE にリンクする可能性がある Derek アラート

Putative MoAs associated to Derek alerts	Number of times a relevant alert was fired	Relevant DART AOP in network
Glutathione (GSH) depletion	41	Yes, (developed)
Glutathione (GSH) reaction with electrophile	13	Yes, (developed)
Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) binding	5	Yes, PPAR α – relevant pathway
Estrogen receptor (ER) binding	5	Yes
Choline deficiency	4	Potentially
Triiodothyronine (T3) decrease	2	Yes
Thyroxine (T4) decrease	2	Yes
Thyroid peroxidase inhibition	2	Yes
Gonadotrophin-releasing hormone inhibition	1	Yes, (developed)
Estrogen receptor (ER) modulation	1	Yes
Dihydrofolate reductase (DHFR) modulation	1	Yes
Cholinesterase inhibition	1	Yes
Aromatase (CYP19) inhibition	1	Yes

表 6:Derek アラートによって特定された推定 MoA を伴う FN(現時点では AOP がない)

Putative MoAs associate to DX alerts	No of times a relevant alert was fired	Relevant DART AOP in network	Additional evidence linking the MoA to DART
Mitochondrial dysfunction	21	No	Yes
Electron transport chain inhibition - succinate-coenzyme Q reductase (SQR)*	1	No	Yes
Krebs cycle inhibition - alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex inhibition*	1	No	Yes
Carnitine depletion*	1	No	Yes
Beta-oxidation competitive substrate*	1	No	Yes
Uncoupling of oxidative phosphorylation*	5	No	Yes
Topoisomerase II-DNA cleavage complex binding	14	No	Yes
Cytochrome P-450 (CYP) inhibition	5	No	Insufficient clarity
Cytochrome P-450 (CYP) increase	2	No	Insufficient clarity
Phospholipidosis	4	No	Insufficient clarity
Constitutive androstane receptor (CAR) binding	3	No	Insufficient clarity
Protein disulfide exchange with nucleophile	3	No	Insufficient clarity
Haemoglobin binding (M)	2	No	Insufficient clarity
Tubulin binding	2	No	Yes
Phosphodiesterase inhibition	1	No	Yes
Pregnane X receptor (PXR) binding	1	No	Insufficient clarity

また、DART ネットワーク内の適切な AOP で、現時点でカバーしないと思われる FN の特定に関連する結果を表 6 に示した。このうち、いくつかの AOP について文献レビューを実施した。

- ・ データセットに約 20 の FN を捕捉するミトコンドリア毒性に関連するアラート
- ・ データセットに 14 の FN を捕捉するトポイソメラーゼ II 結合に関連するアラート
- ・ カルボン酸に代謝される可能性があり、亜鉛代謝、脂質代謝や胚 pH 不均衡を阻止するエステルおよびジエステル。しかし、毒性を引き起こす機序については不明。

D. 考察

ECHA REACH データセットを用いて、現在のラーサ研究所の DART AOP ネットワークに対して類似性検索方法を検証し、データセット内の化学物質の DART リスクと、DART の原因となる潜在的メカニズムを探索することを目的とした。その結果、ECHA REACH データセットの大部分は現時点での DART AOP ネットワーク内に含まれておらず、したがって、このデータセットは新たな AOP やそのメカニズム (MIE や KE 等) を開発する為の検証データセットとして有用であると考えられた。CERES2 化学構造フィンガープリント法による類似性検索を用いて類似度閾値を 80% とした場合、*in silico* 毒性予測ツールである Derek Nexus よりもモデルの感度が大幅に高くなることがわかった。しかし、同時に機構の根拠を予測しうる化合物 (MIE + KE コールにより予測された化合物) を検討したところ、提供

された活性化化合物 365 種が予測できない (FN となる) ことも判り、さらなる知識の集積が必要であることも判明した。

そこで、FN 化合物を調査したところ、一部の化合物は AOP ネットワークによって捕捉されたが、されないものもあることが判明した。これは、現時点で当社のネットワークにある関連 AOP にリンクしているデータが不十分であることが原因である。このような FN のいくつかを、関連する Derek アラートを AOP ネットワークにリンクすることによって捕捉することができると考え、推定される MoA の探索を行った。その結果、ミトコンドリア毒性、トポイソメラーゼ II 阻害を KE の候補とする等とする物質が多く検出された。その他に DART に関連する可能性のある KE もいくつか見つけることができた。今後はこれらの KE に関して、より詳細なメカニズム等について文献検索等を行得ことにより、新たな AOP 開発が可能となると考えられた。

E. 結論

国際的なデータベースなどから毒性データを追加収集し、さらなる AOP 作成のためのデータマイニングを行うことを目的とし、ECHA REACH データセットを用いて、DART リスクと、DART の原因となる潜在的メカニズムの探索を行った。その結果、ECHA REACH データセットの大部分は現時点での DART AOP ネットワーク内に含まれておらず、このデータセットが新たな AOP やそのメカニズム (MIE や KE 等) を開発する為の検証データセットとして有用であると

考えられた。化学構造フィンガープリント法による類似性検索を用いると AOP ネットワークにヒットする物質数が上がり、*in silico* 毒性予測ツールである Derek Nexus よりも感度が高くなることがわかった。一方、偽陰性となる物質も多くあることが判明した。偽陰性となる物質について、DART と関連する Derek アラートの探索を行ったところ、ミトコンドリア毒性、トポイソメラーゼ II 阻害に関連する物質が比較的多く検出できた。今後はこれらのキーイベントに関して、より詳細な検証を行うことにより、新たな AOP 開発が可能となると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada T, [Hirose A](#), Hill E, Fowkes A, Myden A, Stalford S. Development of Adverse Outcome Pathway for histone deacetylase inhibition leading to fetal skeletal malformations. *In preparation*

Stalford S, Myden A, Fowkes A, Hill E, [Hirose A](#), Yamada T. Using new data to identify gaps in knowledge: identification and development of an Adverse Outcome Pathway for glutathione depletion leading to impairment of male fertility. *In preparation*

Yamada T, Kawamura T, Tsujii S, Miura M, Ohata H, Katsutani K, Matsumoto M, [Hirose A](#). Formation and evaluation of mechanism-based chemical categories for regulatory read-across assessment of repeated-dose toxicity: a case of

hemolytic anemia. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*; 2022, 136: 105275.

Yamada T, Katsutani K, Maruyama T, Kawamura T, Yamazaki H, Murayama N, Tong W, Yamazoe Y, [Hirose A](#). Combined risk assessment of food-derived coumarin with *in silico* approaches. *Food Safety*. 2022, 10, 73-82.

Ohno A, Okiyama Y, [Hirose A](#), Fukuhara K., The position of the nitro group affects the mutagenicity of nitroarenes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15; 441:115974, 2022.

Kawashima A, Inoue K, Ushida K, Kai K, Suzuki H, Matsumoto M, Masumura K, [Hirose A](#). Derivation of human health hazard assessment values for toluene under the Japanese Chemical Substances Control Law. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2022;9(4), 123-133.

Iso T, Natsume M, Murata Y, Shigeta 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 mice. *Fundam. Toxicol. Sci.*, 2022; 9(2), 31-36.

2. 学会発表

山田 隆志, 辻井 伸治, 三浦 稔, 齊藤 亮子, 川村 智子, 丸山 多恵子, 勝谷 成男, [広瀬 明彦](#) : IATA による化学物質の神経毒性評価を補完する *in silico* アプローチ : 神経毒性に関連する部分構造と物理化学的および生化学的パラメータを用いたカテゴリ

- 一の精緻化, 日本動物実験代替法学会第 35 回大会 (2022.11.19, 静岡)
- Yamada T, Tsujii S, Miura M, Saito A, Kawamura T, Maruyama T, Katsutani N, Hirose A, *In silico* approach that supports neurotoxicity assessment of chemical substances by IATA: Refining categories by using substructures and physicochemical and biochemical parameters related to neurotoxicity, 11th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (2022.10.20, Chapel Hill)
- Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Umamo T, Hirose A : Derivation of a target value of 1,3-butadiene, a possible contaminant, in drinking water. The 16th International Congress of Toxicology (ICTXVI) (2022.9.18-21, Maastricht)
- 山田 隆志, 勝谷 成男, 丸山 多恵子, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦 : ピロリジジンアルカロイドの肝毒性評価への New Approach Method (NAM) の適用, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.7.1, 札幌)
- 勝谷 成男, 山田 隆志, 村山 典恵, 山崎 浩史, 山添 康, 広瀬 明彦 : 食品中に含まれるクマリンの肝毒性リスク評価についての *in silico* アプローチ, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30, 札幌)
- 広瀬明彦 : ニトロソアミン不純物の発がんリスク、ICH M7/QSAR ワークショップ (日本環境変異原ゲノム学会 第 51 回大会のサテライトミーティング) (2022.10.21, 東京 Online Hybrid)
- 田邊 思帆里, カデール サビーナ, 小野 竜一, カブラル オラシオ, 青柳 一彦, 広瀬 明彦, Edward J PERKINS, 横崎 宏, 佐々木 博己 : 治療抵抗性胃癌に関する Adverse Outcome Pathway (AOP ; 有害性発現経路) の開発, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
- 小野 竜一, 山本 雄介, 成瀬 美衣, 田邊 思帆里, 吉岡 祐亮, 相崎 健一, 広瀬 明彦, 落谷 孝広, 平林 容子, 北嶋 聡 : cfDNA による毒性評価, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
- 大野 彰子, 沖山 佳生, 広瀬 明彦, 福原 潔 : 3 ニトロ多環芳香族炭化水素の変異原性 : ニトロ基の付加位置に関する *in silico* 解析, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)
- 牛田 和夫, 井上 薫, 甲斐 薫, 山下 ルシア幸子, 鈴木 洋, 広瀬 明彦 : 化審法のリスク評価 (一次) 評価 I での発がん性定量的評価のために求められる変異原性評価のあり方 : 閾値の有無に関する再検討, 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札幌)

井上 薫, 鈴木 洋, 橋本 清弘, 三島 雅之,
古濱 彩子, 杉山 圭一, 広瀬 明彦 :
微量変異原性不純物として検出され
たニトロソアミン類の変異原性及び
発がん性ポテンシャルに応じた管理
のための条件の検索、第 49 回日本毒
性学会学術年会 (2022.6.30-7.2, 札
幌)

松本 真理子, 広瀬 望, 磯 貴子, 村田 康
允, 重田 善之, 馬野 高昭, 広瀬 明
彦: Derivation of a target value of
perfluorooctanoic acid in drinking water.
第 49 回日本毒性学会学術年会
(2022.6.30-7.2)

磯 貴子, 村田 康允, 重田 善之, 広瀬 望,
馬野 高昭, 堀端 克良, 増村 健一,
杉山 圭一, 松本 真理子, 広瀬 明
彦 : Evaluation of the *in vivo*
mutagenicity of Carbendazim. 第 49 回
日本毒性学会学術年会 (2022.6.30-
7.2)

村田 康允, 磯 貴子, 重田 善之, 広瀬 望,
馬野 高昭, 堀端 克良, 増村 健一,
杉山 圭一, 松本 真理子, 広瀬 明
彦 : The gene mutation test of styrene
using the transgenic mouse. 第 49 回日
本毒性学会学術年会 (2022.6.30-
7.2)

重田 善之, 広瀬 望, 磯 貴子, 村田 康允,
馬野 高昭, 松本 真理子, 広瀬 明
彦 : GHS classification study of

substances that caused occupational
accident. 第 49 回日本毒性学会学術
年会 (2022.6.30-7.2)

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