

令和5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：

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

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	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	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	山本 繁史	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	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	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
研究協力者	頭金 正博	名古屋市立大学大学院薬学研究科	レギュトリーサイエンス分野	教授
研究協力者	安部 賀央里	名古屋市立大学大学院薬学研究科	レギュトリーサイエンス分野	講師

研究要旨

反復投与毒性は、化学物質リスク評価における主要な毒性エンドポイントである。そのデータギャップをリードアクロスにより補完するためには、構造類似性だけでなく生物学的類似性に基づき、試験データのない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。しかし、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、評価対象物質が生体内で速やかに共通の構造あるいは構造が極めて類似する物質へ変換されると考えられるケースはしばしばあり、代謝を含めたトキシコキネティクス（TK）の類似性にもとづくグループ化は、適用範囲の拡大のための有用且つ必要なアプローチであると考えられる。本年度は、リードアクロスTKの類似性に基づき低毒性が予測される物質群へ拡大適用することを検討した。反復投与毒性の統合データベースから低毒性物質を抽出して化学構造に基づいてグループ化した。続いて既存のTKや代謝のデータに基づいて低毒性となる理由を正当化し10個のカテゴリーを作成した。さらに事例研究として、ベンゼンスルホン酸類2物質を評価対象物質として、化学物質審査規制法（化審法）スクリーニング評価を想定した反復投与毒性の予測を行った。本アプローチは他の物質への適用が十分可能であり、さらなる事例を積み重ねることにより、行政リスク評価への実装が期待される。

A. 研究目的

反復投与毒性は、化学物質安全性評価に

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（定量的）構造活性相関（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、トキシコキネティクス（TK）やトキシコダイナミクス（TD）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、反復投与毒性の信頼性が高い予測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てデータベース化し、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。

反復投与毒性のデータギャップ補完へのリードアクロスの適用には、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、鍵となる毒性メカニズムの情報は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、評価対象物質が代謝を受けて共通の構造あるいは構造が極めて類似する物質へ変換されるケースのように、代謝や TK 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、その適用範囲の拡大が期待される。したがって、それら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や TK を予測する生理学的動力学（PBK）モデルが開発されており、また実際の代謝物や TK パラメータに関する実測データの蓄積が進められている。一方、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、代謝や TK 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、代謝や TK 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。

本年度は、本アプローチを特に低毒性が予測される物質群へ拡大適用することを検討する。反復投与毒性は、構造アラートや AOP の整理は未だ十分でない。したがって、低毒性の予測には、“該当する構造アラートや AOP がない”ことは十分でなく、“速やかに代謝分解され排出される”など、低毒性となる理由を正当化することが必要である。試行を重ねて、このアプローチの妥当性と留意点をまとめる。

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 代謝に関わるシトクロム P450 (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. 低毒性物質の抽出とカテゴリー化

毒性試験公開データベースの HESS、COSMOS、FSCJ、RepDose、ToxRef から経口投与によるラット反復投与毒性試験データを統合した NIHS 反復投与毒性試験統合データベース (1518 物質、1908 試験) から、OECD テストガイドラインと同等あるいは準拠した試験を選定した。その中から病理組織学的所見が認められない且つ NOAEL 値を不確実性係数で除した有害性評価値により化学物質審査規制法 (化審法) スクリーニング評価の有害性クラス [一般毒性] “外” または “4” に分類される物質 (28 日間試験および 90 日間試験で NOAEL 値がそれぞれ 30 mg/kg/day または 90 mg/kg/day 以上で病理組織学的所見が認められなかった物質) を低毒性物質として抽出した。

次いでこれらを化学構造に基づいてグル

ープ化し、すべての物質について PubChem、HESS (ver.3.3)等に登録されている ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion)情報を検索した。さらに、OECD の高生産量物質のカテゴリー評価文書から、ADME に関する情報を収集した。化学構造と ADME 情報を関連付けて低毒性に対する考察を行い、化学構造、TK、毒性学的性質が類似すると考えられる物質群をカテゴリー化した。

続いて、関連する既存データの量と新規性の観点から優先的に選択したカテゴリーを対象に、共通する部分構造を有するが低用量から毒性影響 (病理組織学的変化) が観察された物質を統合データベースから抽出した。両グループを、1) 化学構造、2) ADMET Predictor (ver11)、OECD QSAR Toolbox (ver.4.4)、US EPA CompTox Chemicals Dashboard (ver. 2.4.1)より算出または抽出された TK 関連パラメータ、3) OECD QSAR Toolbox (ver.4.4)、EPA CompTox Chemicals Dashboard よりそれぞれ得られた化学反応性および生物活性に関するプロファイルを相互比較することにより、低毒性物質カテゴリーの構造領域及びパラメータ領域を定義した。

B.2. リードアクロスによる NOAEL 値推定

低毒性カテゴリーに該当すると考えられた 2 物質を選定し、その 28 日間反復投与毒性試験の NOAEL 値をリードアクロスにより推定した。評価対象物質が上で定義されたカテゴリーの領域内に入るかを確認したのち、化学反応性や特定の毒性メカニズムに関連する構造アラートがないかを確認し、試験済み類似物質と TK や毒性の観点から

類似性を評価し、最も適切な類似物質の試験の NOAEL 値をリードアクロスに適用した。そして NOAEL 値から有害性評価値を算出し、化審法有害性クラス分類を行った。

B.3. ヒト P450 基質テンプレートモデルによる代謝予測のプロトコールの詳細化

ヒト P450 基質テンプレートモデルの汎用化を目指して、CYP3A4 を対象に、その基質を Yamazoe らの下記 5 論文 (Yamazoe *et al.*, Food Safety, 9, 10-21, 2021., Yamazoe *et al.*, Food Safety, 8, 34-51, 2021., Yamazoe *et al.*, Drug Metab Pharmacokinet., 35, 253 - 265, 2020., Yamazoe *et al.*, Drug Metab Pharmacokinet., 34, 113-125, 2019., Goto *et al.*, Drug Metab Pharmacokinet., 34, 351-364, 2019) から選択し、その化学構造を Mac 版 Chem3D で作成した。本モデルの開発者である Yamazoe から、テンプレート当てはめの方法や規則の説明を受けた後に、ChemDraw 上で基質テンプレートへの当てはめを実施した。各々の基質について、基質挿入部位の立体的制限および基質テンプレートとの相互作用等の観点から、基質になる配置と基質にならない配置を確認した。

(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. 反復投与毒性試験に対する低毒性物質の抽出およびカテゴリー化

まず、NIHS 反復投与毒性試験統合データベースから抽出した低毒性物質 189 物質について、その化学構造の類似性によりグループ化した。次にすべての物質について

個々の ADME 情報を検索したところ、入手可能な ADME 情報はごく一部に限られることが判明した。その中で構造情報と ADME 情報と関連付けることができたのは 10 グループ (鎖状脂肪族炭化水素類、鎖状脂肪族 1 級アルコール類、エチレングリコールアルキルエーテル類、プロピレングリコールアルキルエーテル類、安息香酸類、“プロパンジオール、プロパントリオールおよびペンタエリスリトール”類、ヒダントイン類、イミダゾリノン類、ベンゼンスルホン酸類、ナフタレンスルホン酸類) であった。

毒性レベルが低い理由を既存の ADME 情報に基づいて整理すると、経口投与後に① 吸収されにくい、② 吸収されるが代謝を受けて胆汁もしくは尿中に排泄される、③ 吸収されるが大部分は未変化体として尿中に速やかに排泄される、に分類されると考えられた。① に該当するカテゴリーとして、鎖状脂肪族炭化水素類、② に該当するカテゴリーとして鎖状脂肪族 1 級アルコール類、エチレングリコールアルキルエーテル類、プロピレングリコールアルキルエーテル類、安息香酸類、③ に該当するカテゴリーとして“プロパンジオール、プロパントリオールおよびペンタエリスリトール”類、ヒダントイン類、イミダゾリノン類、ベンゼンスルホン酸類、ナフタレンスルホン酸類がリストアップされた。

上記の低毒性物質グループを対象に、共通する部分構造を有するが低用量から毒性影響が観察された物質を統合データベースから抽出し、低毒性物質グループと予備的に比較したところ、鎖状脂肪族アルコール類、エチレングリコールアルキルエーテル類およびベンゼンスルホン酸類について、

低毒性物質群を構造領域や TK に関わるパラメータ領域の観点から定義できる可能性が示唆された。そこで、関連する既存データの量および新規性の観点からベンゼンスルホン酸類を優先的に選択してカテゴリーを作成し、その妥当性を評価した。

NIHS 反復投与毒試験統合データベースから抽出された 9 個のベンゼンスルホン酸類は、28~49 日間の反復投与毒性試験で NOAEL 値は 100 mg/kg/day~1000 mg/kg/day であった。2 物質の試験で病理組織学的所見が認められたもののいずれも胃への影響のみであった。経口投与時の局所的な刺激作用によると考えられ、それ以外の物質では全身で病理組織学的所見は認められなかった。一方、分子内にスルホ基を有しないがそれ以外の官能基は同様の種類を有するベンゼン誘導体 14 物質を同毒性データベースから抽出しその毒性影響を調べたところ、種々の臓器毒性が認められ、そのほとんどで NOAEL 値は数 mg/kg/day ~ 数十 mg/kg/day であった。以上より、ベンゼン環に置換するスルホ基は全身毒性影響を緩和する効果があると考えられた (表 1)。

28 日間反復投与毒性試験で毒性所見が観察されず NOAEL 値が 300 mg/kg/day であった Sodium toluene-4-sulphonate (CAS No: 657-84-1) では、PubChem 検索により実測の ADME 情報が見つかった。同試験は 1970 年代初期に報告され、原本の入手はできず詳細は不明であるが、経口投与後に速やかに体内に吸収され、大部分が未変化体として尿中排泄されることが示されている。したがって、ベンゼンスルホン酸類は、疎水性は高くないものの経口暴露時には一定量が体内に吸収されるが代謝を受けにくく、さら

に分布体積が小さく、化学反応性や生物活性は高くないために全体として低毒性であると考えられた。そして、スルホ基以外の置換基 (アミノ基、ニトロ基、クロロ基、短い炭素鎖 (C1~2)) の種類や数は、全身毒性に対し影響が大きいと考えられた。

そこで、ベンゼンスルホン酸類 9 物質とスルホ基を有しないベンゼン誘導体 14 物質について、TK に関わるパラメータの計算値を収集した。実測値がある場合にはそれも収集し、該当する *in silico* モデルの局所的な予測性能を評価した。さらに、化学反応性と生物活性に関連するプロファイルを収集した (表 2)。*In vitro* 変異原性、皮膚感作性、急性毒性、生殖発生毒性の試験データも可能な限り収集した。

TK 関連パラメータの予測モデル (ADMET Predictor) の局所的な精度を評価した。実測の logP 値が利用できたベンゼンスルホン酸類 5 物質およびスルホ基を有しないベンゼン誘導体 11 物質についての S-logP 予測値は、実測値と比べて差はおよそ 1 以内であった。ヒト CL_{int} についても予測値は実測値と一桁以内の差であった。ベンゼンスルホン酸類はスルホ基を有しないベンゼン誘導体類と比べて、S+logP、ヒト S+Peff、Vd、HEP_hCL_{int} の値は低い傾向にあり、パラメータ領域に差が認められた (S-logP: -1.789~0.412 ⇔ 1.402~4.643、S+Peff: 0.464~3.409 ⇔ 3.055~12、Vd: 0.246~0.275 ⇔ 0.873~2.587、HEP_hCL_{int}: -2.705~6.394 ⇔ 1.917~91.4) (表 2)。

EPA CompTox Chemicals Dashboard が提供する、物性および ADME-IVIVE 情報を収集した。

logKOW(=logP)の実測値については、ベン

ゼンスルホン酸類のデータは少なく、一物質のみのため、比較が難しいが、スルホ基を有しないベンゼン誘導体類と比較して、logKOW が低い可能性が考えられた。PBK-IVIVE Intrinsic Hepatic Clearance、Fraction Unbound in Plasma の実測値、PK Half life (ラット、ヒト)、Volume of Distribution (ラット、ヒト) の予測値の情報を収集した。Intrinsic Hepatic Clearance と、Volume of Distribution に差が見られ、低毒性物質は肝クリアランスが小さく、分布容積も小さい傾向があった。

一方、生体高分子との反応性については、ベンゼンスルホン酸類およびスルホ基を有しないベンゼン誘導体類いずれも QSAR Toolbox の DNA binding および Protein binding アラートはほとんど示されず、両グループ間で明確な差は認められなかった。

ToxCast の *in vitro* ハイスループット試験データについては、ベンゼンスルホン酸類は、9 物質 (計 1777 アッセイ) に対して active call は 49 アッセイであった。ビニル基を有する CAS No. 2695-37-6 を除く 8 物質 (計 1559 アッセイ) に対して active call は 13 アッセイであった。一方、スルホ基を有しないベンゼン誘導体類では、11 物質 (計 5771 アッセイ) に対して、73 個の active call が認められた (表 2)。全体としてベンゼンスルホン酸類およびスルホ基を有しないベンゼン誘導体類の親物質の生物活性は共に低い傾向にあり、両グループに明確な差は認められなかった (表 2)。

代謝については、ラット肝の *in vitro* データがあるのはスルホ基を有しないベンゼン誘導体類の 4 物質のみであったが、QSAR Toolbox の代謝シミュレータ (Rat liver

metabolism simulator) はその実測代謝物をよく再現できていた。予測代謝物数は、ベンゼンスルホン酸類では 0~1 個、スルホ基を有しないベンゼン誘導体類では多くのケースで 5~10 個であり、ベンゼンスルホン酸類は代謝を受けにくい可能性があることが示唆された (表 2)。

In vitro 変異原性については、試験データのある物質については両グループともほとんど陰性であった。皮膚感作性については、陰性と陽性が混在しており、両グループ間で明確な差は認められなかった。

一方、急性毒性および生殖発生毒性については、試験データのある物質数は限られたが、ベンゼンスルホン酸類のその毒性レベルは低かった。一方、スルホ基を有しないベンゼン誘導体類では、より低い用量で毒性影響が認められる傾向にあった。試験データがない物質が多数あることに留意する必要はあるものの、両毒性の結果は、反復投与毒性試験結果とおよその傾向の一致性が認められた (表 2)。

以上より、ベンゼンスルホン酸類 9 物質は、極性の大きいスルホ基の作用により、体内に吸収され、代謝はあまり受けず速やかに排泄されること、化学反応性や生物活性は総じて高くないことから、反復経口投与では低毒性のカテゴリーとすることができると考えられた。

C.2. 低毒性カテゴリー物質の 28 日間反復投与毒性をリードアクロスにより予測する事例研究

評価対象物質は、2-Amino-4-chloro-5-methylbenzenesulfonic acid (CAS: 88-51-7: Target 1) および 2-Amino-4-methyl-

benzenesulfonic acid (CAS: 88-62-0: Target 2) である。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、化審法有害性クラスの分類を行った。

Target 1 は、QSAR Toolbox を用いたデータ検索では、反復投与毒性の試験結果はなかった。

Target 1 は、ベンゼンスルホン酸にアミノ基、クロロ基、メチル基がそれぞれ 1 個置換しており、ベンゼンスルホン酸カテゴリーの構造領域を満たした。

ADMET Predictor により TK 関連パラメータのデータを生成したところ、S+logP は 0.098、S+Peff は 3.023、Vd は 0.252、HEP_hCLint は 3.647 であった。CompTox Chemicals Dashboard を用いた検索では、ToxCast の Bioactivity 試験結果は 218 アッセイですべて "inactive" であった。ADME-IVIVE の結果は、Intrinsic Hepatic Clearance (Rat) は 6.25、Fraction Unbound in Plasma は 0.269 (いずれもラット実測値)、PK Half life は 0.5161 時間、Volume of Distribution は 0.3595 L/kg (いずれもラット推計値) であった。TK 関連パラメータは、カテゴリー物質のパラメータ範囲内である。QSAR Toolbox を用いたデータ検索では、Ames 変異原性の試験結果は陰性、急性毒性の LD50 値は 12,300 mg/kg であり、毒性影響は低いと考えられた。以上から Target 1 は当該カテゴリーに属すると判断された。

化学構造と TK パラメータの類似性からもっとも適切な類似物質(ソース物質)は ID 6 (CAS No. 6627-59-4、Target 1 のナトリウム塩)と考えられた。当該ソース物質の毒性値を用いてリードアクロスすることにより、

NOAEL 値は 300 mg/kg/day と推計された。

Target 2 は、ベンゼンスルホン酸にアミノ基、メチル基がそれぞれ 1 個置換しており、ベンゼンスルホン酸カテゴリーの構造領域を満たす。その TK 関連パラメータは、S+logP は -1.123、S+Peff は 1.048、Vd は 0.247、HEP_hCLint は 3.345 であり、カテゴリー物質のパラメータ範囲内である。以上から Target 2 も当該カテゴリーに属すると判断された。

化学構造と TK パラメータの類似性からもっとも適切な類似物質(ソース物質)は ID 1 (CAS No. 88-44-8)と考えられた。当該ソース物質の毒性値を用いてリードアクロスすることにより、NOAEL 値は 300 mg/kg/day と推計された。

Target 1 および Target 2 の反復投与毒性の有害性評価値は、NOAEL 値を不確実性係数 600 で除すことによりいずれも 0.5 が導出された。したがって有害性クラス[一般毒性]はクラス 4 に分類された。

C.3. ヒト P450 基質テンプレートモデルの汎用性向上

ヒトの CYP3A4 の基質の化学構造を Mac 版 Chem3D で作成した。テンプレートへの当てはめが比較的容易であると考えられた多環芳香族炭化水素やステロイド等の平面構造を取る 11 物質を対象とした (Androstenedione, Benzopyrene, Chrysene, Finasteride, Nitropyrene, Phenanthrene, Progesterone, Pregnenolone, Pyrene, Reactive blue 19, Testosterone)。昨年度と作業者を代えて各々の基質について、基質挿入部位の立体的制限および基質テンプレートとの相互作用等の観点から、基質になる配置とな

らない配置を検討し、予測の再現性を確認した。

その結果に基づき、基質テンプレートへの当てはめによる代謝部位予測のプロトコールの詳細化を図るため、化学物質の構造情報取得方法、Mac 版 Chem 3D の操作方法、化学物質の動かし方、テンプレートへの当てはめについて要点を以下に示す。

- ・六員環を有する物質は当てはめが比較的容易である。
- ・最初にテンプレートの position 1 と position 6 にどの原子を配置するかを考えておくと当てはめ操作がしやすい。
- ・平面的な分子であれば、横向きのテンプレートで制約を受けることはほとんどない。一方で、立体的にかさ高い分子は、平面的な構造になるよう動かすことが必要である。
- ・「Cavity 2 residue: Trigger site には最後に trigger が落ちてくるので前から横からも経路を邪魔してはいけない」については、横から見た図の矢印上に原子や結合が重なっていないことを確認している。かさ高い分子の場合この制約が最も大きな障壁となることが多い。
- ・テンプレート内に 2 分子入る場合は、検討されている物質が少ないのでパターンを理解しにくい。ただ、現状ではサイズが小さい分子の場合 2 分子の可能性を考慮する必要がある一方で、(Reactive blue 19 等のように) サイズが大きい分子だと、2 分子入る可能性は少ないと考えられる。

D. 考察

本分担研究では、リードアクロスを低毒性物質の予測に適用することを検討した。その信頼性の担保のためには、“速やかに代

謝分解され排出される”など、低毒性となる理由を正当化することが必要である。

しかし、化学物質の体内動態や代謝に関する実測データは限られている。低毒性の物質は、毒性が強い物質より既存データはさらに少ない。したがって体内動態や代謝物構造を予測する *in silico* モデルの活用が期待される。

ベンゼンスルホン酸類および比較対象としたスルホ基を有しないベンゼン誘導體類いずれも生体高分子との化学反応性および生物活性の *in silico/in vitro* プロファイル、*in vitro* 変異原性や皮膚感作性に顕著な差は認められなかった。したがって、ベンゼンスルホン酸類の低毒性を説明する要因としてトキシコダイナミクスよりむしろ TK の性質の寄与が示唆された。

TK に関するパラメータでは、logP、Peff、Vd、Clint、予測代謝物数について両グループの間に明確な差が認められた。さらに急性毒性の LD50 値、生殖発生毒性の NOAEL 値は試験データのある物質数は限られたが、ベンゼンスルホン酸類のその毒性レベルは低かった。既存の様々なタイプの既存データを説明できる NAM を選択し、それらを総合することにより、“極性の大きいスルホ基の作用により、体内に吸収され、代謝はあまり受けず速やかに排泄されること反復経口投与では低毒性のカテゴリー”を正当化できると考えられた。また、カテゴリー物質の構造の違いと TK パラメータ値から、このカテゴリーの適用範囲を定義づけすることができた。

TK に関連するパラメータ値を用いる時に留意すべき点として、モデルの適用範囲と全体的な予測精度に関する不確実性を同

定し評価しておくことが挙げられる。それを実施するために必要な情報が利用できない場合には、予測モデルは限られた実測データを再現できるか、すなわち局所的な精度評価を実施することが求められる。独立した異なるモデルから同一構造に対する一貫した（一致する）予測が得られ、それを統合して最終結果が生成される場合、個々の予測の不確実性を低減することができると思われる。

事例研究として、ベンゼンスルホン酸類 2 物質を評価対象物質として、化審法スクリーニング評価を想定した反復投与毒性の予測と有害性クラス分類を行った。評価対象の 2 物質はいずれも同カテゴリーの適用範囲内にあった。TK パラメータの推計値の不確実性はあるが、評価対象物質と極めて類似の試験済み物質が同定されたことから、リードアクロス全体の不確実性は大きくないと考えられた。導出された有害性クラス 4 が予測の不確実性を含めても、優先評価化学物質の候補になるクラス 2 になるとは考えにくいことから、この予測結果は化審法スクリーニング評価の文脈で受け入れの可能性は大きいと考えられる。

さらに本分担研究では、これまでに精度評価したヒト P450 代謝予測モデルのうち、もっとも予測精度が優れていた Yamazoe の P450 基質テンプレートモデルについて、プロトコルの詳細化を図った。選定した 11 物質について、複数のユーザーが基質テンプレートへの当てはめを再現できることを確認できた。さらに適用しやすい物質の基本的構造を整理できた。

一方、Yamazoe による P450 基質テンプレートモデルは、代謝部位および代謝物の予

測性は優れるが、対象物質が基質とならないという結果を予測することは難しい。したがって、その使用場面として、他の P450 代謝予測モデル（基質が代謝されるか否かを判別するモデル）と組み合わせることで、代謝される可能性が高い物質を選定し、続いて P450 基質テンプレートに当てはめ、どの部位が代謝されるかを予測する等、段階的な代謝予測フローの検討が必要であると考えられる。

E. 結論

本研究では、反復投与毒性を対象に、リードアクロスを TK の類似性に基づき低毒性が予測される物質群へ拡大適用することを検討した。作成した低毒性カテゴリーを TK の性質に基づいて正当化した。本アプローチは他の物質への適用は十分可能であり、さらなる事例を積み重ねることにより、行政リスク評価への実装が期待される。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. 山田隆志, 丸山 (薦田) 多恵子. 化学物質のヒト健康影響評価に資するリードアクロス -行政リスク評価への適用を目指して- (*CICSJ Bulletin* 2023, Vo.41, No.1, 6-10).
2. Myden A, Stalford SA, Fowkes A, White E, Hirose A, Yamada T. Enhancing developmental and reproductive toxicity knowledge: A new AOP stemming from glutathione depletion. *Curr Res Toxicol*. 2023 Sep 15;5:100124.
3. Yamazoe Y, Murayama N, Kawamura T, Yamada T. Application of fused-grid-

based CYP-Template systems for genotoxic substances to understand the metabolisms. *Genes Environ.* 2023 Aug 7;45(1):22.

4. 山田隆志. Next Generation Risk Assessment の現状と行政利用へ向けた課題 (動物実験代替法と New Approach Methods の開発・利用動向. 監修: 小島肇夫. 発行日: 2023.9.29, シーエムシー出版)

F.2 学会発表

1. 山田隆志: 化学物質の規制安全性評価の国際動向: OECD (Q)SAR 評価フレームワーク(QAF)の概要. 日本薬学会第144年会 (2024.3.30, 横浜)
2. Rathman J, Yamada T, Yang C, Mostrag A, Hobocienski B, Ribeiro V, Barber C.: Computational decision workflows evaluation following the new OECD QSAR Assessment Framework. Society of Toxicology 63rd Annual Meeting (2024.3.11, Salt Lake City, US).
3. Yamada T, Tamehiro N, Teratani N: Case studies on refining risk assessment of food-related substances with New Approach Methods. (13th Global Summit on Regulatory Science (GSR23), Parma, 2023.9.27).
4. Yamada T, Katsutani N, Hirose A, Hill E, Fowkes A, Stalford S, Myden A: An Adverse Outcome Pathway for histone deacetylase inhibition leading to axial skeletal defects: Development and potential to improve decision support in chemical safety assessment. (12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (WC12), Niagara Falls, August 30, 2023).
5. 山田隆志: 次世代リスク評価の信頼性構築へ向けた New Approach Methodology の活用の課題. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.19)
6. 山本 繁史, 明関 由里子, 吉田 喜久雄, 山田隆志: 生理学的薬物動力学(PBK)モデリングを用いた環境化学物質のトキシコキネティクス予測のためのデータベースの構築. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
7. 勝谷成男, 山田隆志, 広瀬明彦, Emma Hill, Adrian Fowkes, Susanne A. Stalford, Alun Myden: ヒストン脱アセチル化酵素阻害から発生毒性につながる AOP の開発. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
8. 丸山(薦田)多恵子, 山添康, 齊藤亮子, 山田隆志: 試験データベース解析に基づく肝毒性関連情報の抽出—予測精度向上を目指して. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
9. 山田隆志, 大畑秀雄, 古濱綾子, 杉山圭一, 本間正充, 瀬川勝智, 相崎健一, 広瀬明彦, 増村健一: 行政における化学物質リスク評価を支援する AI を用いた安全性予測プラットフォームの開発. (第50回日本毒性学会学術年会, 横浜, 2023.6.21)
10. Furuhashi A, Maruyama T, Yamada T, Sugiyama K, Honma M: Evaluating Ames mutagenicity predictions for 1,3,5-tris(2,3-

dibromopropyl)-1,3,5-triazinane-
2,4,6-trione under the OECD QSAR
Assessment Framework. The 20th
International Workshop on (Q)SAR
in Environmental and Health Sciences
(June 7 2023, Copenhagen, Denmark)

なし

G.3. その他
なし

F.3 シンポジウム/講習会/Work Group での 発表

1. Yamada T: Development and application of toxicity databases for improvement of *in silico* approaches for regulatory chemical safety assessment. (OECD 20th Meeting of the QSAR Toolbox Management Group, Boulogne, France, 2023.11.17).
2. 山田隆志: ヒト健康影響に関連した QSAR とリードアクロス. 令和 5 年度 QSAR/リードアクロス講習会, 独立行政法人製品評価技術基盤機構 化学物質管理センター主催, 環境省 大臣官房環境保健部後援 (2023.10.11, 東京-Online)
3. 山田隆志: In silico 予測手法の高度化と New Approach Methodology の活用に基づくヒト健康リスク評価の効率化・迅速化を目指して. シンポジウム [リスク評価手法の現状と今後], 2023 年 日化協 LRI 研究報告会 (東京, 2023.8.25)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

G.1. 特許取得
なし

G.2. 実用新案登録

表 1. ベンゼンスルホン酸カテゴリ物質と同カテゴリに属さないスルホ基を有しないベンゼン誘導体の化学構造

いずれの化学構造も NIHS 反復投与毒試験統合データベースから抽出された。スルホ基を有しないベンゼン誘導体の化学構造は、スルホ基が毒性を緩和する効果があるとする仮説を説明するために用いられ、置換基の種類、数はできるだけカテゴリ物質と一致性をもつように選択された。

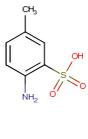
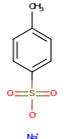
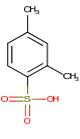
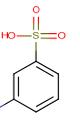
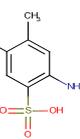
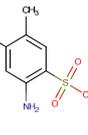
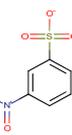
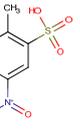
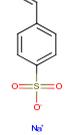
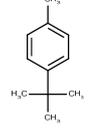
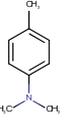
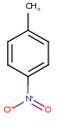
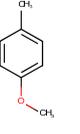
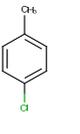
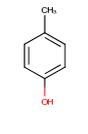
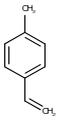
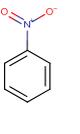
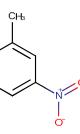
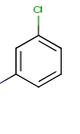
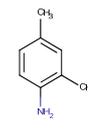
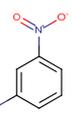
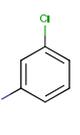
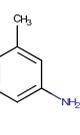
Category	in	in	in	in	in
ID	1	2	3	4	5
CAS	88448	657841	88619	121471	88539
Structure					
ID	6	7	8	9	
Category	in	in	in	in	
CAS	6627594	127684	121039	2695376	
Structure					
ID	10	11	12	13	14
Category	out	out	out	out	out
CAS	98511	99978	99990	104938	106434
Structure					
ID	15	16	17	18	19
Category	out	out	out	out	out
CAS	106445	622979	98953	99081	121733
Structure					
ID	20	21	22	23	
Category	out	out	out	out	
CAS	95681	99092	108429	108441	
Structure					

表 2. ベンゼンスルホン酸カテゴリーの構築のためのデータマトリックス

ID	Category	Repeated dose toxicity				
		duration	NOEL (mg/kg/day)	effective dose	Organ (Tissue)	Effect
1	in	28	300			
2	in	28	300			
3	in	42	100			
4	in	28	300			
5	in	28	1000			
6	in	42	300			
7	in	28	1000			
8	in	49	175	700	Stomach (Glandular stomach)	Hemorrhage, Erosin
9	in	28	100	1000	Stomach (Forestomach/Limiting ridge)	Hyperplasia/Thickening epithelium, Hyperkeratosis/Parakeratosis
10	out	28	1.5	50	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Periportal)
				50	Testis	Atrophy seminiferous, Hyperplasia leydig cell
				50	Epididymis	Germ cell ↓
11	out	91	<62.5	62.5	Bone marrow	Hematopoiesis ↑
				62.5	Kidney	Pigmentation (Other)
				125	Kidney	Nephropathy, Mineralization, Necrosis
				62.5	Liver	Necrosis hepatocyte (Other), Pigmentation (Hemosiderin)
				125	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Other)
				250	Lymph node	Other findings
				62.5	Spleen	Extramedullary hematopoiesis, Congestion, Fibrosis, Pigmentation (Other)
				250	Spleen	Atrophy
				500	Stomach (Forestomach/Limiting ridge)	Inflammation
12	out	91	<42	42	Kidney	Pigmentation (Other)
				42	Spleen	Pigmentation (Hemosiderin), Extramedullary hematopoiesis, Congestion
				342	Testis	Other findings
13	out	28	100	1000	forestomach	Hyperkeratosis, Hyperplasia
				1000	lung	Respiratory Distress
				1000	liver	Hypertrophy, Necrosis
14	out	90	<50	50	Stomach (Glandular stomach)	Erosin
				800	Adrenal	Cell hypertrophy
				800	Kidney	Basophilic change/Regeneration/Degeneration, Dilatation, Cell infiltration/Inflammation, Other findings
				800	Stomach (Glandular stomach)	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Centriobular)
				800	Stomach (Glandular stomach)	Erosin
15	out	91	<50	600	Trachea	Other findings
				600	Kidney	Nephropathy
16	out	90	50	300	Lung	Cell infiltration/Inflammation, Other findings
17	out	28	<5	25	Spleen	Congestion, Pigmentation (Other)
				125	Bone marrow	Hematopoiesis ↑
				125	Brain	Other findings
				125	Epididymis	Germ cell ↓
				125	Kidney	Pigmentation (Other)
				125	Liver	Extramedullary hematopoiesis, Pigmentation (Other)
				125	Testis	Atrophy seminiferous, Degeneration semiferous tubule
18	out	91	<48	48	Spleen	Pigmentation (Hemosiderin)
				171	Spleen	Pigmentation (Hemosiderin)
				336	Spleen	Congestion
				661	Testis	Other findings
19	out	28	<1	1	spleen	Hyperplasia, Extramedullary Haematopoiesis
				5	liver	Hypertrophy
				25	testes	Degeneration
				25	spleen	Changes in Organ Structure, Discoloration
20	out	28	<2	10	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Centriobular)
				10	Kidney	Eosinophilic body/Hyaline droplets
21	out	28	<15	15	Bone marrow	Hematopoiesis ↑
				15	Spleen	Congestion, Extramedullary hematopoiesis, Pigmentation (Hemosiderin)
				50	Epididymis	Germ cell ↓
				50	Kidney	Pigmentation (Other)
				50	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Other)
				170	Liver	Extramedullary hematopoiesis, Pigmentation (Hemosiderin)
				50	Testis	Germ cell ↓
				170	Testis	Hyperplasia leydig cell, Multinucleated giant cell
22	out	93	<10	40	Bone marrow	Hematopoiesis ↑, Other findings
				40	Kidney	Pigmentation (Hemosiderin)
				40	Liver	Pigmentation (Hemosiderin), Extramedullary hematopoiesis
				10	Spleen	Pigmentation (Hemosiderin), Extramedullary hematopoiesis, Congestion
				40	Spleen	Fibrosis, Other findings
23	out	42	<30	30	Spleen	Extramedullary hematopoiesis, Congestion, Pigmentation (Other)
				100	Liver	Hypertrophy/Swelling hepatocyte (Other), Extramedullary hematopoiesis, Pigmentation (Other)
				300	Kidney	Pigmentation (Other)

表 2. ベンゼンスルホン酸カテゴリーの構築のためのデータマトリックス (続き)

ID	Category	ADMET Predictor							OECD QSAR Toolbox			
		MW	S+logP	S+logD	S+Peff	Vd	HEP_hCLint	HEP_rCLint	log Pow	Acute toxicity (mg/kg)	Reproductive toxicity (mg/kg bdwt/d)	number of simulated
1	in	187.218	-1.116	-2.244	1.348	0.253	2.705	14.537	-0.67	>2000	1000	0
2	in	194.185	0.051	-1.921	2.808	0.251	5.83	25.98		≥3346	300	0
3	in	186.231	0.412	-2.061	3.06	0.255	5.982	27.417				0
4	in	173.191	-1.789	-2.041	0.464	0.275	3.094	9.084	-2.79	>5000		0
5	in	221.663	-0.182	-1.209	2.089	0.249	4.518	20.656	-0.83			0
6	in	243.645	0.098	-1.423	3.023	0.252	3.647	18.839				0
7	in	225.156	-0.223	-1.233	3.499	0.246	3.051	16.116	-2.61	>5000		1
8	in	217.201	0.078	-1.285	3.303	0.25	3.327	18.963	-0.7, -1.5	300~2000	1000	1
9	in	206.197	0.338	-1.563	2.572	0.269	6.394	31.788			700	
10	out	148.25	4.643	4.643	12	1.729	91.436	841.659	4.4		25, <200	9
11	out	135.21	2.902	2.9	9.925	2.414	44.143	242.851	1.73	1650		8
12	out	137.139	2.309	2.309	6.693	1.05	37.555	49.373	2.37	>2250		3
13	out	122.168	2.63	37.853	10.195	1.293	2.63	183.956	2.8	1920	100, ≥1000	7
14	out	126.586	3.297	133.683	11.908	2.271	3.297	147.408				9
15	out	108.141	1.918	42.841	7.873	1.882	1.917	164.014	1.94	207		4
16	out	118.18	3.309	48.801	12	2.114	3.309	320.234			500	6
17	out	123.112	1.811	1.811	6.598	0.963	37.819	35.203	1.86	588		3
18	out	137.139	2.215	2.215	6.901	1.002	28.478	31.643	2.4	1784, 2121		10
19	out	157.557	2.446	2.446	7.794	1.07	61.192	24.05	2.49			2
20	out	121.183	1.84	1.84	6.345	2.3	14.62	58.597	2.02	1259	300	9
21	out	138.127	1.458	1.458	3.035	0.873	9.344	21.845				5
22	out	127.574	1.863	1.863	5.952	2.587	15.575	33.655	1.88	256		1
23	out	107.156	1.402	1.401	5.894	2.251	12.22	41.687	1.4	922		7

表 2. ベンゼンスルホン酸カテゴリーの構築のためのデータマトリックス (続き)

ID	Category	CompTox Chemicals Dashboard							ToxCast	
		logKOW	Fup (%)	CLint (hepatic)	Vd (human, predicted)	Vd (rat, predicted)	Half life (human, predicted)	Half life (rat, predicted)	Total assays	Active calls
1	in	-	38.3	6.25	0.4423	0.4604	0.8504	0.4923	293	0
2	in	-	37.6	6.25	0.3951	0.423	0.365	0.1842	322	1
3	in	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	in	-	34.7	0	0.371	0.3875	6.918	2.462	218	0
5	in	-	28.2	6.25	0.3445	0.3578	0.8266	0.4888	218	1
6	in	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	in	-2.61	29.2	0	0.3561	0.3783	7.891	2.856	218	5
8	in	-	30.3	0	0.3946	0.4094	8.362	2.979	290	6
9	in	-	-	-	0.296	0.3134	0.3513	0.1866	218	36
10	out	5.17	-	-	-	-	-	-	320	6
11	out	2.81	-	-	-	-	-	-	548	11
12	out	2.37	26.59	19.32	1.733	1.369	2.874	1.075	553	14
13	out	2.66	-	-	-	-	-	-	218	0
14	out	3.33	-	-	-	-	-	-	546	2
15	out	1.94	32.59	39.66	1.808	1.616	1.578	0.6925	562	6
16	out	-	-	-	-	-	-	-	317	5
17	out	1.85	38.44	8.168	1.471	1.254	2.77	1.217	561	5
18	out	2.45	7.728	16.82	1.025	0.7946	3.901	1.711	555	3
19	out	2.46	9.92	21.7	1.185	0.9203	3.203	1.343	296	5
20	out	1.68	41.7	21.7	1.283	1.095	1.411	0.5975	218	1
21	out	1.37	21.4	21.7	0.7008	0.6194	1.11	0.5336	218	0
22	out	1.88	26.5	21.7	1.16	0.9617	1.653	0.7053	293	7
23	out	1.4	54.9	32.9	1.22	1.084	1.014	0.43	566	8