

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5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 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 技術顧問  
研究協力者 赤堀 有美 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究企画課長  
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 Alun Myden ラーサ研究所 研究員  
研究協力者 Victor Ude 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 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5年度は、昨年度の ECHA の REACH に登録されているデータセットを用いた調査で新たな AOP の有力候補のひとつとなったミトコンドリア毒性について AOP の可能性調査を行った。その結果、雄性生殖毒性、雌性生殖毒性および胎児毒性につながるミトコンドリア機能障害に関係する 6 つの MIE を含む AOP ネットワークの可能性が示された。また、昨年度のデータセットに含まれていた精巣毒性研究の情報について既存の DART AOP ネットワークによるスクリーニングを実施した。その結果、陽性の MIE アッセイデータが特定されたのは 126 の精巣毒性物質のうち 22 の物質で AOP ネットワーク内の 14 の MIE と 2 の KE に関連しており、DART AOP ネットワーク内の 8 つの AOP に含まれていることが示された。また、AOP ネットワークにリンクされた Derek Nexus アラートを調べた結果、25 の陽性化合物について 3 つの AOP が予測された。本研究では、アッセイデータから特定される精巣毒性物質と Derek Nexus アラートで特定される精巣毒性物質が異なる場合には、化合物を AOP ネットワークに関連付けるために補完的な方法を使用できるという利点も明らかになった。

**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った。R5 年度は、前年度までの結果を受けて DART との関連性の高いミトコンドリア毒性の AOP 可能性調査を行うと共に、精巣毒性についての AOP ネットワークを用いたスクリーニングを行い、さらなる AOP 作成のための手法開発を目指している。

## B. 研究方法

### ミトコンドリア毒性の AOP 可能性調査

昨年度の ECHA の REACH に登録されているデータセットを用いた調査で DART の AOP ネットワーク内に含まれていない化合物が多数あることが確認されたが、その中で DART と関連する Derek アラートの探索を行い新たな AOP の有力候補のひとつとなったミトコンドリア毒性について AOP の可能性調査を行った。

精巣毒性についての AOP ネットワークを用

### いたスクリーニング

昨年度のデータセットに含まれる 1499 の化合物に関する 1911 の精巣毒性研究の化合物情報について Lhasa の既存の AOP ネットワークによるスクリーニングを実施し、提供された精巣毒性データセットにある陽性化合物に関連する MIE/KE がこのネットワーク(主として催奇性または胚毒性の AOP を構成している)の中に含まれているかを確認した。さらに AOP ネットワークに関連することが明らかになった Derek Nexus アラートのキュレーションを行い、対応する KE とのリンクを行った。

(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

### ミトコンドリア毒性の AOP 可能性調査

ミトコンドリアの主な機能はエネルギー産生 (ATP 産生)、さまざまな生理学的過程および代謝過程においてもミトコンドリアは重要な役割を果たす。たとえば、ミトコンドリアは細胞のシグナル伝達(カルシウムシグナル伝達など)、恒常性維持およびプログラム細胞死にとってきわめて重要である。ミトコンドリアは、卵成熟、受精、着床、胚胎発生、精子産生、精子運動性などの発生過程および生殖過程でも重要な役割を果たしている。生体内の ATP 分子の大部分は、ミトコンドリア内で酸化的リン酸化 (OXPHOS) により生成される。酸化的リン酸化過程は電子伝達系における一連の複雑な酸化還元反応に関与しており、電子伝達系は複合体 I、II、III、IV、V という 5 つのタンパク質複合体で構成される。複合体 I から複合体 IV へのこの電子の移動により、内膜の内外にプロトン勾配が生じる。これらのプロトンは一

ノシン三リン酸(ADP)と共役し、F1F0 ATPアーゼ(複合体 V)としても知られるミトコンドリア型アデノシン三リン酸合成酵素の存在下でATPを形成する。ミトコンドリアは多くの疾患や加齢に伴う生殖能低下に関与している。ミトコンドリア機能障害は、受精、胚の生存率、着床および胚胎児発生を含む複数の生殖発生過程と関連する[Podolak, 2022; Babayev, 2015]。酸化的リン酸化脱共役剤の一部はミトコンドリア機能およびATP産生に影響することが報告されており、妊娠げっ歯類に投与すると卵成熟異常、胎仔体重減少および同腹仔数減少を引き起こす。ペルフルオロアルキル化合物は酸化的リン酸化の脱共役剤であることが示されている[Wallace, 2013]。ヒトを対象とした研究では、ペルフルオロオクタン酸(PFOA)、ペルフルオロノナン酸(PFNA)、ペルフルオロヘプタンスルホン酸(PFHpS)などのペルフルオロアルキル化合物の血中濃度が高い女性に、受精能低下および胚胎児毒性(流産、子癩前症、胎児成長異常、出生体重減少など)がみられることが明らかになった[Wikström, 2021; Liew, 2020]。生殖発生過程ではATPが重要な必要条件となることから、酸化的リン酸化脱共役および電子伝達系複合体阻害により引き起こされるミトコンドリア機能障害が、胚胎児毒性および雄性/雌性生殖毒性の機序として妥当であることをこのAOPは示しており、そのイメージを図1に示す。

<各MIE, KEの詳細>

#### 複合体Iに結合 → 電子伝達系阻害

ミトコンドリアの電子伝達系は、ミトコンドリア内膜において電子とプロトンを送達する5つのタンパク質複合体(複合体I、II、III、IV、V)で構成されており、アデノシン三リン酸(ATP)産生に必要なプロトン駆動力が生成

される。複合体I(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)-ユビキノン酸化還元酵素)は、電子伝達系の第1の最も大きい複合体であり、複合体Iのユビキノン(CoQ)結合部位に阻害剤が結合すると、複合体IIIへの電子伝達が遮断され、電子リークおよび活性酸素種(ROS)産生の増加につながる可能性がある[Nolfi-Donagan, 2020; Zhao, 2019]。ロテノンは、単離したラット肝のミトコンドリア[Heinz, 2017]ならびにヒトおよびアフリカツメガエルの卵母細胞[Rodríguez-Nuevo, 2022]において複合体Iの活性を阻害することが報告されている。

#### 複合体IIに結合 → 電子伝達系阻害

複合体II(コハク酸脱水素酵素)は、電子伝達系の第2のタンパク質複合体であり、電子伝達系への第2の電子流入点である[Zhao, 2019]。フラビンアデニンジヌクレオチド(FADH<sub>2</sub>)がコハク酸から受け取った電子は、複合体II内の硫化第一鉄(FeS)クラスターを介して電子伝達系のユビキノン(CoQ)に伝達される[Zhao, 2019]。阻害剤は複合体IIのキノン(Q)部位またはジカルボン酸部位に結合でき、複合体IIの活性を遮断する[Siebels, 2013]。たとえば、アトペニンA5(Q部位阻害剤)およびマロン酸(ジカルボン酸阻害剤)は複合体IIの活性をQ部位で遮断し、ウシ心臓から抽出したミトコンドリアにおいて活性酸素種(ROS)産生を増加させることが示されている[Miyadera, 2003; Siebels, 2013]。

#### 複合体IIIに結合 → 電子伝達系阻害

補酵素Q-チトクロムc還元酵素としても知られる複合体IIIは、電子伝達系の第3のタンパク質複合体である。複合体IIIのユビキノン(CoQ)には、キノール酸化(Qo)部

位とキノール還元(Qi)部位という2つの結合部位がある[Zhao, 2019]。複合体III阻害剤は競合的に複合体IIIのQi部位に結合する(複合体IIIのQoユビセミン(部分還元型キノール)電子の放出を阻害する)またはQo部位に結合する(Qo部位への還元型キノール(QH<sub>2</sub>)の結合を阻害し、それにより電子伝達系における電子伝達を妨げる)[Quinlan, 2011; Zhao, 2019]。アンチマイシンAおよびミソチアゾールは、複合的III阻害剤である[Ramalho-Santos, 2009]。たとえば、アンチマイシンAは、ラット後肢から単離したミトコンドリア[Quinlan, 2011]およびウシ心臓垂ミトコンドリア粒子[Von Jagow, 1981]の複合体III活性を遮断する。

#### 複合体IVに結合 → 電子伝達系阻害

複合体IV(チトクロムc酸化酵素(COX))は、電子伝達系の第4のタンパク質複合体である[Zhao, 2019]。複合体IVは、電子伝達系における酸素からの水の生成を触媒し、ATP合成に必要なプロトン駆動力の生成に寄与する[Torres, 1995; Diaz, 2006]。哺乳類のCOXタンパク質には、COX活性にとって重要な酸化還元活性を有する4つの金属中心と1つの二核中心がある[Cooper, 2008; Zhao, 2019]。酸化還元活性のあるこれらの金属中心および二核中心は、3通りの酸化還元状態(完全酸化、部分還元、または完全還元)で存在しうる[Mason, 2006]。阻害剤は、完全酸化状態、部分還元状態、または完全還元状態にある複合体IVに競合的または非競合的に結合できる[Cooper, 2008]。いくつかの化合物(一酸化窒素、硫化水素、シアン化水素など)が、複合体IV活性を阻害し、電子伝達系によるプロトン駆動力生成を妨げる[Alonso, 2003; Mason,

2006; Torres, 1995; Sarti, 2012; Cooper, 2008]。COXサブユニットをロックアウトすると、COXの活性が阻害され、電子伝達系によるプロトン駆動力生成が阻害されることが示されている[Hüttemann, 2012; Reguera, 2020; Diaz, 2006]。たとえば、マウス皮膚線維芽細胞のCOX10(COX合成に不可欠な会合因子)をロックアウトすると、複合体IVの活性が阻害され、その結果複合体Vへのプロトンの伝達が妨げられ、酸化的リン酸化が阻害される[Diaz, 2006]。

#### 複合体Vに結合 → 電子伝達系阻害

複合体V(F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP合成酵素)は、電子伝達系の第5のタンパク質複合体である。F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP合成酵素は、F<sub>1</sub>およびF<sub>0</sub>機能的ドメインで構成される[Zhao, 2019,]。複合体Vは、電子伝達系で生成されたプロトン駆動力を酸化的リン酸化と共役させ、ADPからATPを合成する[Demine, 2019]。阻害剤はF<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP合成酵素の触媒的活性部位で結合すると考えられ、その結果F<sub>0</sub>の立体構造が変化する[Penefsky, 1985]。F<sub>0</sub>に対する作用はF<sub>1</sub>に伝達され、F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP合成酵素への基質結合の阻害につながる[Penefsky, 1985, 82]。オリゴマイシンはよく知られた複合体V阻害剤である[Dreier, 2019,]。オリゴマイシンはウシ心臓ミトコンドリアの複合体Vを阻害し[Penefsky, 1985]、ヒト、マウス、およびウシの胚においてミトコンドリア膜電位と酸素消費率を低下させることが示されており、複合体V阻害によって電子伝達系活性が損なわれたことが示唆されている[Muller, 2019]。

#### 電子伝達系の阻害 → ミトコンドリアの酸化的リン酸化共役の減少

ミトコンドリアの電子伝達系は5つのタン

パク質複合体から成り、電子とプロトンが電子伝達系に沿って移動すると、プロトン駆動力と活性酸素種(ROS)が生成される。その後、プロトン駆動力はミトコンドリアの酸化リン酸化に使用され ATP が生成され、産生された ROS は細胞恒常性に関与する [Nolfi-Donagan, 2020]。たとえば、ミトコンドリア電子伝達系の複合体のいずれかが阻害されると電子リークが生じ、その結果、プロトン駆動力の生成が不十分となり、ROS 産生が増加し、ATP 合成が減少する。これらは酸化リン酸化の脱共役に起因する [Nolfi-Donagan, 2020]。例えば、フェンブコナゾール(ゼブラフィッシュにおける複合体 II および III の阻害剤) [Qin, 2022]、オリゴマイシン(複合体 V 阻害剤)、アンチマイシン A(複合体 III 阻害剤)、レテノン(複合体 I 阻害剤) [Muller, 2019]、アスピリン(複合体 I および IV の阻害剤) [Raza, 2011]などの電子伝達系タンパク質複合体阻害剤は、電子伝達系におけるプロトンの移動を妨げることが示されており、in vitro 曝露研究において、また阻害剤を投与したラットから単離したミトコンドリアで、酸化リン酸化および ATP 産生が低下した。

#### 酸化リン酸化脱共役剤の結合 → ミトコンドリア酸化リン酸化の共役の減少

酸化リン酸化では、電子伝達系で生成された電気化学的電位を利用して ATP の形でエネルギーが産生される [Nolfi-Donagan, 2020]。酸化リン酸化脱共役剤はプロトンフォアとして作用するか親油性イオン対を形成でき、その結果、プロトンは高度に制御されたミトコンドリア内膜を通して移動できる。このプロトン減少によりエネルギーが散逸し、酸化リン酸化の共役と ATP の合成が妨げ

られる [Demine, 2019; Garlid, 1983; Terada, 1990]。ミトコンドリアを酸化リン酸化脱共役剤に曝露したときにこのような事象が認められることが複数の研究で示唆されている [Weisova, 2012; Sibille, 1995]。たとえば、小脳顆粒神経細胞をシアン化 4-(トリフルオロメトキシ)フェニルヒドラゾン (FCCP、既知のミトコンドリア酸化リン酸化脱共役剤) で処理するとミトコンドリア膜電位および ATP 含量が低下し、FCCP を除去すると回復した [Weisova, 2012]。

#### ミトコンドリア酸化リン酸化共役の減少 → ミトコンドリア機能障害

酸化リン酸化は電子伝達系で生成されたプロトン駆動力の共役に関与し、これにより ADP から ATP が合成される。酸化リン酸化が障害されると、ミトコンドリアの ATP 産生低下、ミトコンドリアの複合体構造の攪乱、酸化ストレスの増加、およびミトコンドリア機能異常が生じる可能性がある [Raffa, 2017]。哺乳動物の胚または卵母細胞(雌の生殖細胞)を酸化リン酸化脱共役剤で処理するか酸化リン酸化に関連する遺伝子を欠失させると、ミトコンドリア機能障害が生じることが示されている。これはミトコンドリア膜電位(MMP)障害、ATP 産生の減少、および酸化ストレスの増大として現れる [Rubattu, 2016; Zhang, 2022; Bestman, 2015]。以下に例を示す。

- 酸化リン酸化脱共役剤 2,4-ジニトロフェノール(DNP)で処理したゼブラフィッシュの胚では、処理 72 時間後、ミトコンドリア機能に必要な遺伝子(ダイナミン関連タンパク質 1(DRP1)関連遺伝子、NADH デヒドロゲナーゼ 5(ND5)関連遺伝子、低酸素誘導因子 1(HIF1A)関連遺伝子など)、

ミトコンドリアDNA損傷修復に必要な遺伝子(8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ (OGG1) 関連遺伝子など)、および酸化ストレスからのミトコンドリアの防御に必要な遺伝子(スーパーオキシドジスムターゼ (SOD2) 関連遺伝子)のダウンレギュレーションが認められた。また、DNP によりミトコンドリア呼吸の減少、ATP 産生の減少、嫌気性呼吸の増加、活性酸素種 (ROS) 産生の減少、ミトコンドリア機能阻害が生じた[Bestman, 2015]。

- ・ トリクロサン(酸化的リン酸化脱共役剤)で処理したラット脳ミトコンドリアでは、酸素消費が増大し、酸化的リン酸化と ATP 合成が減少した[Ajao, 2015]。
- ・ ラット脳から単離したミトコンドリアを酸化的リン酸化脱共役剤であるフルオキシセチンで処理すると、酸化的リン酸化と ATP 合成が減少する[Curti, 1999]。
- ・ in vitro で FCCP に曝露したマウス胚では、未処理対照と比較して MMP が用量依存的に低下し ATP 含量が減少した[Zander-Fox, 2015]。
- ・ ペルフルオロオクタン酸(PFOA)を投与したマウスの卵母細胞では、対照と比較した場合、ミトコンドリア機能障害、ROS 濃度上昇、MMP 障害および ATP 合成障害が認められた[Zhang, 2022]。単離したマウスの肝臓および脳のミトコンドリアを PFOA に曝露した場合にも、チトクロム c の増加、ミトコンドリアの膨張を含む同様の所見が報告された[Mashayekhi, 2015]。

#### ミトコンドリア機能障害 → 胚胎児毒性

ミトコンドリア活性および ATP 含量が最適であることは、正常な初期胚胎児発生に不可欠である [Zhao, 2012; Van Blerkom,

1995; Babayev, 2015]。2015 年のレビュー [Babayev, 2015]にあるように、ミトコンドリア機能障害は流産、卵成熟障害、受精障害および発生障害に関連している。ミトコンドリア機能異常による ATP 含量の低下は、げっ歯類の同腹仔数、出生数および新生仔体重に影響を及ぼすことが報告されている [Salimi, 2019; Takahashi, 2009]。以下に例を示す。

- ・ 受胎 7 日後から 15 日後までペルフルオロオクタン酸(PFOA)を投与したマウスでは、胎仔の一部の器官(肝臓、心臓など)でミトコンドリア機能異常が認められ、複数の器官(前肢指、肝臓、心臓、後肢指、眼など)の形成異常が誘発され、胎仔の体重および体長が減少した [Salimi, 2019]。別の研究者グループは、妊娠マウスに胎生 13 日目から妊娠終了まで PFOA を投与した後に、胎仔のミトコンドリア機能障害(ATP 産生の減少および酸化ストレス)、出生体重異常および発生毒性(胚胎仔の成長低減など)が認められた [Huang, 2022]。
- ・ 雌雄ラットに対し、交尾 14 日前から 40~47 日間、DNP を投与した。雄ラットと雌ラットの両者に器官毒性(肝臓、腎臓など)が認められ、非投与ラットと比較して出生数および出生体重が減少した [Takahashi, Environmental Toxicology, 2009, 24, 74-81]。
- ・ ゼブラフィッシュの胚を DNP で処理するとミトコンドリア機能障害が誘発され、胚の長さおよび生存率が減少し、胚の運動神経細胞軸索および眼の発生が阻害された [Bestman, 2015]。
- ・ ラット胚を FCCP で in vitro 処理し、成体

ラットに移植したところ、雌産仔の出生体重が減少した。また、FCCP で in vitro 処理したマウス胚から出生した雌産仔では、出生体重の減少およびグルコース取り込み障害(胎児毒性につながると考えられる代謝疾患とミトコンドリア機能障害を示す徴候)が認められた[Zander-Fox, 2015]。

- ・フルオキシセチンを投与した妊娠動物の新生仔に心血管形成異常が生じた[Kiryanova, 2013; Hines, 2004]。両論文では、妊娠中にフルオキシセチンを投与した雌のラットおよびマウスからの産仔において、出生後死亡、心血管形成異常、出生体重減少、同腹仔数の減少などの異常が認められた[Kiryanova, 2013; Hines, 2004]。

#### ミトコンドリア機能障害 → 卵成熟異常

卵母細胞は、健全な初期胚発生を維持するため、成熟中に相当量のエネルギーを(ATPの形で)を必要とすると考えられている。これらの ATP 分子の大部分は、卵母細胞ミトコンドリア内で酸化的リン酸化により産生される[Chappel, 2013; Babayev, 2015]。したがって、受精とその後の発生を支持できる高品質の卵母細胞を成熟させるには効率的なミトコンドリア機能と十分な ATP 含量が存在することが重要である[Podolak, 2022; Chappel, 2013; Roth, 2018; 2015; Van Blerkom, 1995]。いくつかの研究がこのキーイベント間の関係を裏付けている。

- ・人工授精(IVF)を受け妊娠に至った女性から採取した卵母細胞の ATP 含量(2.2 ~ 2.6 pmol)は、妊娠できなかった女性(ATP 含量 1.4 ~ 1.7 pmol)と比較して高かったことから、卵母細胞の成熟と品質な

らびに着床にとってミトコンドリアの ATP 合成が重要であることが示唆される[Van Blerkom, 1995]。

- ・卵成熟の胚胞期を FCCP および DNP に曝露したマウス卵母細胞は減数分裂期 II に進むことができず、試験培地(脱共役剤を含む)を通常の増殖培地と交換すると卵母細胞は発生を再開したが、対照と比較して十分な成熟に至るまでの時間が長かった[Van Blerkom, 1995]。
- ・ペルフルオロオクタン酸(PEOA)を投与したマウスでは、活性酸素種(ROS)の増加、ATP 産生の減少、ミトコンドリア機能および減数分裂過程の変化、ならびに卵成熟および卵胞発生の阻害が認められた[Zhang2022; Huang, 2022]。
- ・PFOA または PFOS に曝露したマウス卵母細胞では、生存率が用量依存的に減少し、ROS 形成が増加し、卵母細胞のミトコンドリア分布が変化した。この曝露はミトコンドリア機能障害および染色体異常なども引き起こした[Guo, 2021; López-Arellano, 2019; Wei, 2021]。
- ・2,6-ジイソプロピルフェノール(酸化的リン酸化脱共役剤)で処理したマウス卵母細胞に、卵成熟減数分裂期の破綻および精子進入の減少が報告された[Tatone, 1998]。
- ・マウス卵母細胞をトリクロカルバン(酸化的リン酸化脱共役剤)で処理すると、ミトコンドリア膜電位の低下、ATP 含量の減少、ミトコンドリア機能障害、および卵母細胞減数分裂障害(卵成熟と卵母細胞の品質を損なわせる)が引き起こされた[Ding, 2020]。

#### 卵成熟異常 → 雌性生殖能の低下

生殖成績にとって卵母細胞の品質が重要であることを示すエビデンスが複数存在する[Orazov, 2019; Babayev, 2015; Santos, 2006]。卵母細胞のATP含量は卵母細胞の品質ならびに生殖能力に影響する[Babayev, 2015; Van Blerkom, 1995]。ミトコンドリア酸化的リン酸化の脱共役剤は卵母細胞のATP含量を低下させるため雌性生殖能に悪影響を及ぼすことが複数の研究で示されている[Van Blerkom, 1995; Zhou, 2022]。以下に例を示す。

- ・人工受精を受けている女性患者に関する調査から、卵母細胞および胚のATP含量およびミトコンドリア活性が十分な患者でのみ受胎と妊娠完了が可能であり、卵母細胞のATP含量が大幅に低い患者は妊娠を保持できなかつたことが示された[Van Blerkom, 1995; Zhao, 2012]。
- ・胚胞期にDNPに曝露したマウス卵母細胞の受精率は、対照卵母細胞と同等であった。しかし、胚盤胞にまで発育したのは、DNPに曝露し受精した卵母細胞では193個中46個であったのに対し、対照卵母細胞では234個中187個であった[Van Blerkom, 1995]。
- ・ミトコンドリア酸化的リン酸化の脱共役剤(PFOAなど)にマウスを曝露した場合、ミトコンドリア機能障害、卵成熟障害、受精阻害、着床および胚発生の阻害につながった[Zhang, 2022]。
- ・酸化的リン酸化に関連するミトコンドリア遺伝子(アデノシン三リン酸合成サブユニット6(ATPアーゼ6)、チトクロムcオキシダーゼIII(COIII)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド-ユビキノン酸化還元酵素サブユニット3(ND3)の関連遺伝子な

ど)の発現が減少すると、卵母細胞が受精しなかつたり胚が不活性となることが人工受精(IVE)を受けている女性で報告されている[Hsieh, 2004]。

#### ミトコンドリア機能障害 → 精子機能障害

ミトコンドリアの重要な役割は、精細胞に運動性を与え、受精能獲得のために先体反応を促進することである。ミトコンドリアが生成する活性酸素種(ROS)は、精子表面上のシャペロンをリン酸化し、これにより先体反応を促進する[Park, 2021]。ミトコンドリア機能障害はエネルギー産生の減少およびROSの不均衡につながり、そのため精子の機能の中でも特に精子の運動性と受精能獲得が障害されると考えられる。精子には(精子膜中に)高濃度の多価不飽和脂肪酸が含まれることから、ミトコンドリア機能障害に起因するROS不均衡による損傷に対し感受性が高いと思われる[Vertika, 2020]。さらに、ミトコンドリアは雄性生殖能を制御する他の過程、たとえば精子形成、細胞の増殖および細胞死の制御、ならびにステロイド前駆物質の合成にも関与する[Park, 2021; Vertika, 2020]。

多くの男性不妊症例はミトコンドリア機能障害に関連すると考えられており、症例の30~80%はROS関連精子損傷と関連付けられている[Park, 2021]。男性のミトコンドリアDNAの変異は不妊および精子機能障害の徴候(精子無力症など)と関連付けられている[Vertika, 2020]。電子伝達系の阻害または酸化的脱共役によりミトコンドリア機能障害を引き起こす化合物が、精子機能障害および雄性生殖能を障害するという考えは、生物学的に妥当であるが、一方で精子によるATP生成は他の多くの細胞や器官とは異

なり、酸化的リン酸化ではなく解糖を介するという点に留意する必要がある[Park, 2021]。KE 間の関係を裏付けるエビデンスには、以下の様な知見が報告されている。

- ・ ミトコンドリア DNA の変異を有する男性では精子の運動性が低下し不妊となる可能性がある[Amor, 2022; Vertika, 2020]。
- ・ 変異型ミトコンドリア DNA を有するマウスモデル(野生型および変異型ミトコンドリア DNA を有する)は不妊となり、精子の大半でミトコンドリアの障害が生じた[Nakada, 2006; Vertika, 2020]。
- ・ 成人から採取した健康な精子を解糖阻害剤または酸化的リン酸化阻害剤とインキュベートした in vitro 研究では、精子運動性に関する一貫した結果は得られなかった[Irigoyen, 2022]。別個にインキュベートした場合、FCCP は精子の運動性を有意に低下させたが、解糖阻害剤(オキサミン酸ナトリウムおよび 2-デオキシ-D-グルコース)および電子伝達系複合体 III 阻害剤(アンチマイシン A)は精子の運動性を有意に変化させなかった[Irigoyen, 2022]。しかし、アンチマイシン A を解糖阻害剤のいずれかと共にインキュベートした場合、運動性の低下が認められた。オキサミン酸ナトリウムを除き、これらの阻害剤は ATP 産生を阻害した。
- ・ 健康な精子のサンプルを複合体 I 阻害剤ロテノンで処理した in vitro 研究では、精子のミトコンドリア膜電位差が低下した。しかし、精子運動性の低下は解糖も同時に遮断した場合にのみ認められた[Barbonetti, 2010]。
- ・ シアン化物は電子伝達系の複合体 IV を阻害することでミトコンドリア機能障害を引

き起こす[Nourani, 2021]。シアン化ナトリウムを投与した雄マウスでは精子機能が障害され、精子の運動性と生存率が有意に低下した[Nourani, 2021]。また、対照群と比較して脂質過酸化が増大し(ROS 過剰の徴候)、生殖能力が低下した。ピルビン酸エチルをシアン化ナトリウムと共に投与すると、この作用が軽減された。

- ・ 1,2-ジブプロモエタンの職業曝露を 5 年間受けた人では、対照群と比較して精子の運動性、生存率および精子数が低下し、精子形態異常が認められた[Rarcliffe, 1987]。

#### 精子機能障害 → 雄性生殖能の低下

精子機能障害の徴候には精子運動性の障害が含まれ、運動性障害はヒトの男性不妊と関連する[Schoenwolf, 2020,]。

#### 精巢毒性についての AOP ネットワークを用いたスクリーニング

Lhasa の DART AOP ネットワークの作成は、催奇性および胎児致死性に基づく有害事象を優先して作成しているが、このネットワーク内にある MIE/KE の一部は生殖能ベースの有害事象にも関連する可能性がある。この仮説を検証するために、昨年度のデータセットに含まれる 1499 の化合物に関する 1911 の精巢毒性研究の化合物情報について既存の AOP ネットワークによるスクリーニングを以下の手順で実施した。

- データのキュレーション(陽性物質の抽出)を行う。
- 提供されたデータセットに含まれる精巢毒性物質について、AOP ネットワーク内の MIE および KE に関連する既存の陽性アッセイデータを特定

- AOP ネットワークにリンクされている Derek Nexus アラートのヒットする化合物を特定
  - 類似性検索を実施して、推測リンクを決定する。
- ・提供された精巢毒性データセットは、HESS、ToxRef、COSMOS、RepDose および FSCJ から得られたもので、1499 の化合物に関する 1911 のデータで構成されていた。データセットには 146 の陽性結果と 1765 の陰性結果が含まれる。Konstanz Information Miner (KNIME) バージョン 4.5.2 および Lhasa 社内で生成した KNIME ノードを用いて構造確認と文脈化を行った後に、保守的アプローチを用いて陽性を決定した結果、1471 の化合物 (陽性 126、陰性 1345) のデータセットとなった。これ以降はこのデータセットに含まれる 126 の精巢毒性物質を中心に解析を行った。
- ・この精巢毒性陽性であった 126 の化合物について DART AOP ネットワークによるスクリーニングを実施し、ネットワークにリンクされたアッセイデータのうちデータセットに含まれる精巢毒性物質に関するものを特定した。この検索では、類似度閾値を 100% として完全一致で行った。その結果、陽性の MIE アッセイデータが特定されたのは 126 の精巢毒性物質のうち 17 の物質であった (表 1)。この結果は、Lhasa DART AOP ネットワーク内の 14 の MIE に関連するものであった (表 1)。これらの MIE は DART AOP ネットワーク内の 8 つの AOP に渡って分布している (表 2)。最も多く予測された MIE は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害およびムスカリン性アセチルコリン受容体結合であり、次いでエストロゲン受容体結合、プレグナン X 受容体結合および甲状腺ホルモン受容体結合であった。3 つの例では、1 つの

化合物について 2 つの MIE が陽性であった。これらの MIE は、ムスカリン性アセチルコリン受容体結合とヒストン脱アセチル化酵素阻害、アンドロゲン受容体結合とグルココルチコイド受容体結合、ならびにエストロゲン受容体結合とプレグナン X 受容体結合であった。

ハーシュバーガーアッセイおよび子宮肥大アッセイは、それぞれ AOP「雄性生殖器官形成異常につながるアンドロゲン受容体 (AR) 結合」および AOP「雄性生殖器官形成異常につながるエストロゲン受容体 (ER) 結合」のキーイベント (KE) アッセイである。ハーシュバーガーアッセイおよび子宮肥大アッセイでは、それぞれ 3 つの化合物で陽性データが得られた (表 1)。これらの化合物のうち、1 つの活性化合物は子宮肥大アッセイおよび対応する MIE アッセイ (エストロゲン受容体結合アッセイ) で陽性であった (表 1)。ハーシュバーガーアッセイと子宮肥大アッセイの両者では、1 つの化合物が陽性であったことから、この化合物は「雄性生殖器官形成異常につながるアンドロゲン受容体 (AR) 結合」および「雄性生殖器官形成異常につながるエストロゲン受容体 (ER) 結合」の 2 つの AOP に関連すると考えられる。

・AOP ネットワークに関連すると特定された Derek Nexus アラートは、最近キュレーションされ、関連する KE と関連付けられています。これらのアラートは、関連するアッセイデータが不足している可能性のあるネットワークの領域を補い、DART AOP ネットワークの化学空間の範囲を強化する可能性があります。そのため、提供されたデータセットの精巢毒性物質に対してこれらのアラートがどのように実行されたかの分析が行われました。これらの化合物は、Derek Nexus (一般に公開されているマスターの知識ベースと、ステロイドに関連する受容

体と酵素に関するアラートを含む独自の知識ベースを使用して)を通じて処理されました。精巣毒性に陽性の合計 25 の化合物は、DART AOP ネットワークに関連する 14 のアラートに関連していました(表 3)。これらのアラートは、5 つの異なる KE に関連付けられていました。25 の陽性化合物のうち、22 の化合物は Derek Nexus Master 知識ベースで 12 のアラートを発し、これらはすべて「男性生殖毒性につながるグルタチオン (GSH) 減少」の AOP 内の KE に関連付けられていました。「男性生殖毒性につながるグルタチオン (GSH) 減少」は以前の共同研究で開発されている。精巣毒性に陽性の残りの 3 つの化合物は、カスタム Derek Nexus ナレッジベースで 2 つの DART 関連の警告を発した。2 つの警告は、「男性生殖器奇形につながるアンドロゲン受容体 (AR) の結合」と「男性生殖器奇形につながるエストロゲン受容体 (ER) の結合」という AOP 内の KE を予測した。Derek Nexus の警告に基づいて、グルタチオン (GSH) の減少が最も予測される KE として強調され、次いで精巣毒性であった(表 3)。グルタチオン (GSH) の減少と精巣毒性は、DART AOP ネットワークにおける雄性生殖毒性に関連する 2 つの AOP のうちの 1 つである「雄性生殖毒性につながるグルタチオン (GSH) の減少」AOP 内の KE である。強調された他の KE には、2 つの化合物で予測されたエストロゲン受容体結合と催奇形性、および 1 つの化合物で予測されたアンドロゲン受容体結合が含まれる。総合すると、AOP ネットワークにリンクされた Derek Nexus アラートは、3 つの AOP に存在する 5 つの KE を予測した。

AOP ネットワークに関連付けられたデータは、類似性方法論に基づいて、毒性の考えられる

メカニズムについて予測するために利用できることを実証した。これは、毒性物質に関する正確なデータが入手できない場合に、作用機序を特定するのに役立つ可能性がある。この特定の例では、類似性検索方法論を適用することと、提供された精巣毒性物質に関連する可能性のある MIE/KE を予測しようとするものの両方は、あまり信頼できない可能性がある。しかし、類似性方法論は、精巣毒性物質の正確なデータがすでに特定されている場合に、関連する MIE/KE のデータを特定するのに役立つ可能性がある。例えば、図 1 のアッセイに関連する類似化合物のデータは、図 1 の MIE に結合する化合物が精巣毒性を引き起こす可能性があるという主張をさらに裏付ける可能性がある。そのため、CERES 2 Tanimoto の方法論と 80%の類似性閾値を利用して、DART AOP ネットワーク内の MIE および KE に対して精巣毒性物質をスクリーニングした。表 5 に示すように、すでに特定されている各アッセイについて、さらにいくつかの化合物が特定されたが、これは MIE/KE と精巣毒性との関連性を過剰に強いものにする可能性がある。当然の結果として、これまで未確認だった他の MIE も予測された。これらは、今後の調査対象の候補となる可能性がある。

#### D. 考察

AOP ネットワークを開発するために用いたエビデンスは、主にヒトの垂集団研究、げっ歯類やゼブラフィッシュを用いた研究および in vitro 研究が用いられている。たとえば、DNP や FCCP などの酸化的リン酸化脱共役剤を投与した場合のラットのミトコンドリア機能異常、マウスの新生仔体重の減少。ゼブラフィッシュへの DNP の投与の結果におけるミトコ

ンドリア機能障害による新生稚魚の体重および生存率低下、器官の発生異常。ヒトにおけるペルフルオロアルキル化合物血中濃度とミトコンドリア機能障害および胎児毒性との関連事象。in vitro で PFOA に曝露したマウス胚における胎児発生時間依存的な減少および減数分裂過程の異常、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害および同腹仔数減少。PFOA による雌マウスの卵胞形成異常、卵成熟不全および卵母細胞発生中の減数分裂阻害、雄性不妊とミトコンドリア機能障害などから得られている。

しかし、ミトコンドリアの機能は多様であるため、この AOP にはいくつかの不確実な要素が存在する。この AOP ネットワークでは、ミトコンドリア機能障害および発生生殖毒性につながる複数の分子開始イベント(MIE)を考慮したが、大半の研究では、細胞内 ATP 含量に寄与する可能性がある解糖や TCA サイクルなど他の ATP 生成経路は考慮されていなかった。ミトコンドリアの機能はヒトの複数の生物学的過程に関与していることから、ミトコンドリア機能障害がこの AOP ネットワークで特定された他のストレス要因によって発生毒性を誘発する可能性がある。たとえば、芳香族ニトロ化合物はグルタチオンと直接反応し、グルタチオンの減少および酸化ストレスをもたらす可能性がある [Kovacic, 2014]。ペルフルオロアルキル化合物はいくつかの重要な生物学的経路(ペルオキシソーム増殖剤受容体  $\alpha$  (PPAR  $\alpha$ ) 経路、構成的アンドロスタン受容体(CAR)経路、プレグナン X 受容体(PXR)経路など)と相互作用することが示されている [Karatekin, 2022]。したがって、観察された DART にはミトコンドリア毒性以外の生物学

的経路が寄与している可能性がある。

一方、DART AOP ネットワーク内の KE とデータセットに含まれる精巣毒性物質との間に関連があることが示された。最終的には、精巣毒性物質の AOP ネットワークに関連する陽性データから、22 の精巣毒性陽性化合物と関連する 14 の MIE、2 つの KE および 8 の AOP が特定された。また、AOP ネットワークにリンクされた Derek Nexus アラートを調べた結果、25 の陽性化合物について 3 つの AOP が予測された。その中には、以前の共同研究で開発した「雄性生殖毒性につながるグルタチオン減少」という AOP との関連性が示され、過去の研究が DART AOP ネットワークの性能を改善していたことを確認できた。さらに類似性検索法および類似度閾値 80%によるスクリーニングにより拡大された関係の多くは正確なデータに基づくものではないため、相関の信頼性は低くなるが、特定された経路は今後の開発につながる可能性がある。

今年度の研究では、アッセイデータから特定される精巣毒性物質と Derek Nexus アラートで特定される精巣毒性物質が異なる場合には、化合物を AOP ネットワークに関連付けるために補完的な方法を使用できるという利点も明らかになった。さらに調査を進め、AOP ネットワーク内に関連の他の MIE と「精巣毒性」という有害事象とのリンクを作成することも可能であると考えられる。さらに、それらの標的の調査を進め、各標的に基づいて十分な裏付けがある AOP を開発することも考えられる。

#### <参考文献>

Ajao, Toxicology Reports, 2015, 2, 624-637.

- Alonso, *Pharmacology and Toxicology*, 2003, 93, 142–146.
- Amor, *Genes (Basel)*, 2022, 13, 1182; Vertika, *Mitochondria*, 2020, 54, 26-40.
- Babayev, *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 2015, 27, 175-181.
- Barbonetti, *Endocrinology*, 2010, 151, 5882-5892.
- Bestman, *Differentiation*, 2015, 89, 51-69.
- Chappel, *Obstetrics and Gynecology International*, 2013, 2013, 183024.
- Cooper, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2008, 40, 533-539.
- Curti, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1999, 199, 103-109.
- Demine, *Cells* 2019, 8, 795.
- Ding, *Environmental Pollution*, 2020, 262, 114271.
- Dreier, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2019, 38, 1625-1634.
- Garlid, *The Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258, 7974-7980.
- Guo, *Birth Defects Research*, 2021, 113, 1074–1083;
- Heinz, *Scientific Reports*, 2017, 7, 45465.
- Hines, *Birth Defects Research (Part B)*, 2004, 71, 193-280.
- Hsieh, *Fertility and Sterility*, 2004, 81 (S1), 912-918.
- Huang, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 236, 113467.
- Irigoyen, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 10, 1-18.
- Kiryanova, *Developmental Neuroscience*, 2013, 35, 437-449.
- López-Arellano, *Environmental Toxicology*, 2019, 24, 92-98.
- Mashayekhi, *Human and Experimental Toxicology*, 2015, 34, 985-996.
- Mason, *PNAS*, 2006, 103, 708-713
- Miyadera, *PNAS*, 2003, 100, 2, 473-477.
- Muller, *Scientific Reports*, 2019, 9, 16778.
- Nakada, *PNAS*, 2006, 103, 15148-15153.
- Nolfi-Donagan, *Redox Biology*, 2020, 37, 101674.
- Nourani, *Archives of Rezi Institute*, 2021, 76, 323-333.
- Orazov, *Gynecological Endocrinology*, 2019, 35(S1), 24-26.
- Park, *Antioxidants*, 2021, 10, 98 .
- Penefsky, *PNAS*, 1985, 82, 1589-1593.
- Podolak, *Cells*, 2022, 11, 797.
- Qin, *Toxicology*, 2022, 470, 153137.
- Quinlan, *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286, 31361-31372.
- Ramalho-Santos, *Human Reproduction Update*, 2009, 15, 553-572.
- Rarcliffe, *British Journal of Industrial Medicine*, 1987, 44, 317-326.
- Raza, *European Journal of Pharmacology*, 2011, 668, 15-24.
- Rodríguez-Nuevo, *Nature*, 2022, 607, 756-561.
- Roth, *Journal of Dairy Science*, 2018, 101, 3642-3654.
- Salimi, *Environmental Toxicology*, 2019, 34, 878-885,
- Santos, *Fertility and sterility*, 2006, 85, 584-591.
- Sarti, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1817, 610-619.
- Schoenwolf, *Larsen's Human Embryology*, 2020, sixth edition, 13-40.
- Sibille, *European Journal of Biochemistry*, 1995, 231, 498-502.
- Siebels, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 2013, 1827, 1156-1164.
- Takahashi, *Environmental Toxicology*, 2009, 24, 74-81.
- Tatone, *Human Reproduction Reported*, 1998, 13, 430-435.
- Terada, *Environmental Health Perspectives*, 1990, 87, 213-218.
- Torres, *Biochemical Journal*, 1995, 312, 169-173.
- Van Blerkom, *Human Reproduction*, 1995, 10(2), 415-424.
- Vertika, *Mitochondria*, 2020, 54, 26-40.
- Von Jagow, *FEBS Letters*, 1981, 136, 19-24.
- Wallace, *Toxicol Lett*, 2013, 222, 257–264.
- Wei, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 225, 112807.
- Weisova, *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 2012, 1817, 744-753.
- Wikström, *Scientific Reports*, 2021, 11, 3568.

Liew, *Environmental Health Perspectives*, 2020, 128, 47007.  
Zander-Fox, *Biology of Reproduction*, 2015, 92, 124.  
Zhang, *Environmental Toxicology*, 2022, 37, 2965-2976.  
Zhao, *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 44, 3-15.  
Zhao, *The Journal of International Medical Research*, 2012, 40, 734-739.  
Zhou, *Environment International*, 2022, 167, 107413.

## E. 結論

令和 5 年度は、昨年度の ECHA の REACH に登録されているデータセットを用いた調査で新たな AOP の有力候補のひとつとなったミトコンドリア毒性について AOP の可能性調査を行った。その結果、雄性生殖毒性、雌性生殖毒性および胚胎児毒性につながるミトコンドリア機能障害に関係する 6 つの MIE を含む AOP ネットワークの可能性が示された。また、昨年度のデータセットに含まれていた精巣毒性研究の情報について既存の DART AOP ネットワークによるスクリーニングを実施した。その結果、陽性の MIE アッセイデータが特定されたのは 126 の精巣毒性物質のうち 22 の物質で AOP ネットワーク内の 14 の MIE と 2 の KE に関連しており、DART AOP ネットワーク内の 8 つの AOP に含まれていることが示された。また、AOP ネットワークにリンクされた Derek Nexus アラートを調べた結果、25 の陽性化合物について 3 つの AOP が予測された。本研究では、アッセイデータから特定される精巣毒性物質と Derek Nexus アラートで特定される精巣毒性物質が異なる場合には、化合物を AOP ネットワークに関連付けるために補完的な方法を使用できるという利点も明らかになった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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. doi: 10.1016/j.crttox.2023.100124.

Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Shigeta Y, Iso T, Umamo T, Hirose A. Derivation of subacute guidance values for chemical contaminants of drinking water quality standard in Japan. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2023 Jun;141:105401. doi: 10.1016/j.yrtph.2023.105401.

Murata Y, Natsume M, Iso T, Shigeta Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Sugiyama KI, Masumura K, Hirose A, Matsumoto M. In vivo mutagenicity assessment of styrene in MutaMouse liver and lung. *Genes Environ*. 2023 Apr 11;45(1):12. doi: 10.1186/s41021-023-00270-9.

### 2. 学会発表

広瀬明彦：ペル及びポリフルオロ化合物 (PFAS) の環境曝露によるリスク評価の現状と課題、第 50 回日本毒理学学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

広瀬明彦：Extractables と Leachables の毒性評価の考え方、第 50 回日本毒理学学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

村田康允、重田善之、磯貴子、馬野高昭、広瀬望、長谷川彩由香、堀端克

良、杉山圭一、広瀬明彦、増村健一、松本真理子：トランスジェニックマウスを用いた tert-ブチルヒドロペルオキシドの遺伝子突然変異試験、第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

Yamada T, Ohata H, Furuhashi A, Sugiyama K, Honma M, Segawa K, Saito Y, Aisaki K, Kitajima S, Hirose A, Masumura K : Development of an Artificial Intelligence (AI)-based Safety Prediction Platform to Support Regulatory Chemical Risk Assessment, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

Iso T, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Shigeta Y, Hasegawa S, Horibata K, Mutsuga M, Sugiyama K, Hirose A, Masumura K, Matsumoto M. ; Evaluation of the in vivo mutagenicity of azodicarbonamide, 第 50 回日本毒性学会学術年会 (2023.6.19-6.21, 横浜)

Akahori Y., Ishida K., Ohno F., Hirose A.: Possibility for Liver Toxicity Evaluation by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) using Key Event-Specific Gene Sets Applying Gene Expression Data Obtained in Rat Primary Hepatocytes, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

Hayashi T, Kotaki A, Fukushima A, Kawamura T, Katsutani N, Yamada T, Hirose A.: Development of modifying factor for exposure route extrapolation from oral TTC to parenteral TTC, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

Murata Y, Matsumoto M, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Horibata K, Sugiyama K, Inoue K, Hirose A, Masumura K : *In vivo* mutagenicity assessment and derivation of oral and inhalation hazard assessment values of styrene, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

Matsumoto M, Murata Y, Hirose N, Iso T, Shigeta Y, Hasegawa S, Umamo T, Hirose A : Derivation of a target value of acrylic acid in drinking water, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

Hirose A, Shigeta Y., Kawamura T., Inoue K., Matsumoto M : Comparison of BMDL calculation performance by the recently developed Bayesian BMD calculation tools using quantal datasets of animal toxicity studies, EUROTOX 2023 (2023.9.10 - 13, Ljubljana)

## 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

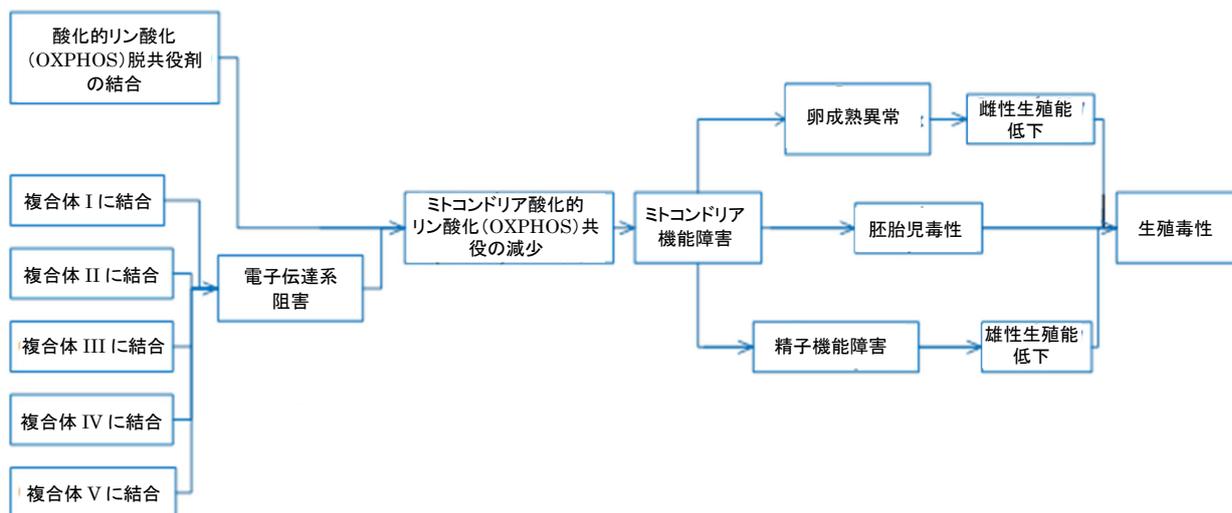
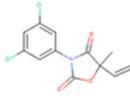
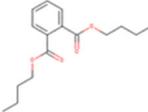
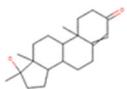
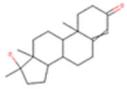
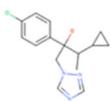
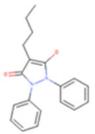
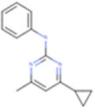
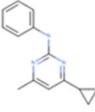
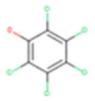


図 1. ミトコンドリア毒性による生殖毒性 AOP ネットワークのイメージ図

表 1 精巣毒性物質に関連する、DART AOP ネットワーク内に含まれる陽性アッセイデータの概要。

AOPs	MIE	Key Events	Structure
1 Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations		Hershberger assay (antagonist mode)	
2 Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations	Oestrogen receptor (ER) binding assay	Uterotrophic assay	
3 Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations		Hershberger assay (antagonist mode)	
4 Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations		Uterotrophic assay	
5 Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations		Hershberger assay (antagonist mode)	

6	Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations		Uterotrophic assay	
7	Thyroid hormone signalling disruption leading to neuro-developmental toxicity	Thyroid hormone receptor (TR) binding assay		
8	Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations	Androgen receptor (AR) binding assay		
9	Glucocorticoid receptor (GR) binding leading to cleft palate	Glucocorticoid receptor (GR) binding assay		
10	Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Muscarinic acetylcholine receptor binding assay		
11	Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Muscarinic acetylcholine receptor binding assay		
12	Thyroid hormone signalling disruption leading to neurodevelopmental toxicity	Pregnane X receptor (PXR) binding assay		
13	Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Muscarinic acetylcholine receptor binding assay		
14	Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	Histone Deacetylase (HDAC) inhibition assay		
15	Carbonic anhydrase (CA) inhibition leading to teratogenicity	Carbonic anhydrase (CA) inhibition assay		
16	Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding leading to developmental toxicity	Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding assay		

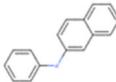
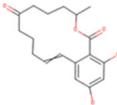
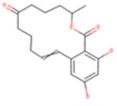
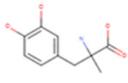
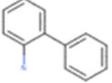
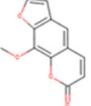
17	Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	Histone Deacetylase (HDAC) inhibition assay	
18	Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations	Oestrogen receptor (ER) binding assay	
19	Thyroid hormone signalling disruption leading to neuro-developmental toxicity	Pregnane X receptor (PXR) binding assay	
20	Thyroid hormone signalling disruption leading to neuro-developmental toxicity	Thyroid hormone receptor (TR) binding assay	
21	Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	Histone Deacetylase (HDAC) inhibition assay	
22	Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Acetylcholinesterase (ACHE) inhibition assay	

表 2. 精巢毒性物質に関連する MIE/KE データが陽性である、DART AOP ネットワーク内の AOP。

AOP	Number of positive compounds
Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	4
Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations	4
Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding leading to developmental toxicity	1
Carbonic anhydrase (CA) inhibition leading to teratogenicity	1
Glucocorticoid receptor (GR) binding leading to cleft palate	1
Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	3
Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations	4
Thyroid hormone signalling disruption leading to neurodevelopmental toxicity	4

表 3. データセットの精巢毒性物質によって活性化された Derek Nexus アラートの概要。

Derek Alert Name	Derek Alert ID	Key Event Name	Number of Compounds	AOP
<b>2-Aminopyrimidine</b>	821	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>2-Halopyridine</b>	802	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>4-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)benzotrile or analogue</b>	847	Androgen receptor (AR) binding	1	Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations
<b>Arsenic compound</b>	559	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>Ethylene- or propylene-urea</b>	Rapid Prototype 163	Testicular toxicity	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>Halobenzene</b>	557	Glutathione (GSH) decrease	4	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>Monothioglycol or glycol monoalkyl ether, alkoxy- or alkylthio-carboxylic acid or precursors</b>	067	Testicular toxicity	4	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>Oestradiol or analogue</b>	767	Oestrogen receptor (ER) binding, Teratogenicity	2	Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations
<b>Organic peroxide</b>	649	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>Phenoxyacetic acid or derivative</b>	690	Glutathione (GSH) decrease	4	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>Phenylethylamine or derivative</b>	684	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>Phthalate mono- or di-ester</b>	637	Testicular toxicity	4	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>para-Alkylphenol or derivative</b>	666	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity
<b>para-Aminophenol or derivative</b>	619	Glutathione (GSH) decrease	1	Glutathione (GSH) decrease leading to male fertility toxicity

表 4. AOP ネットワーク内の KE に関連する Derek アラートを持つ精巢毒性物質の数。

AOP	Number of positive compounds
Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	4
Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations	4
Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding leading to developmental toxicity	1
Carbonic anhydrase (CA) inhibition leading to teratogenicity	1
Glucocorticoid receptor (GR) binding leading to cleft palate	1
Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	3

表 5. DART AOP ネットワークにリンクされた MIE データ陽性物質に類似した化合物の数。

AOP	Key Event Name	Number of Compounds
Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Acetylcholinesterase (ACHE) inhibition assay	3
Androgen receptor (AR) binding leading to male reproductive organ malformations	Androgen receptor (AR) binding assay	6
Aromatase (CYP19) inhibition leading to teratogenicity	Aromatase (CYP19) inhibition assay	4
Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding leading to developmental toxicity	Aryl hydrocarbon receptor (AHR) binding assay	3
Carbonic anhydrase (CA) inhibition leading to teratogenicity	Carbonic anhydrase (CA) inhibition assay	5
Glucocorticoid receptor (GR) binding leading to cleft palate	Glucocorticoid receptor (GR) binding assay	3
Histone deacetylase inhibition leading to developmental toxicity	Histone Deacetylase (HDAC) inhibition assay	10
Acetylcholine receptor activation leading to developmental toxicity	Muscarinic acetylcholine receptor binding assay	5
Oestrogen receptor (ER) binding leading to male reproductive organ malformations	Oestrogen receptor (ER) binding assay	5
Opioid receptor (OPR) binding leading to developmental toxicity	Opioid receptor binding assay	1
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) binding leading to male reproductive organ malformations	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) binding assay	1
Thyroid hormone signalling disruption leading to neurodevelopmental toxicity	Pregnane X receptor (PXR) binding assay	4

Retinoic acid signalling modulation leading to teratogenicity	Retinoic acid receptor (RAR) binding assay	1
Serotonin transporter inhibition leading to embryo-foetal toxicity	Serotonin transporter (SERT) inhibition assay	1
Thyroid hormone signalling disruption leading to neurodevelopmental toxicity	Thyroid hormone receptor (TR) binding assay	3