

令和6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）

研究課題名：
化学物質管理のための *in silico* 毒性予測の利用推進と
統合的リスク評価の基盤構築に関する研究（24KD2004）

分担研究報告書

反復投与毒性及び生殖発生毒性を対象とした
NAM を活用したリードアクロス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	城島 光司	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	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	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	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	Jade Jones	ラーサ研究所		研究員

研究要旨

生殖発生毒性や反復投与毒性などの複雑な毒性予測を含むヒト健康リスク評価の基盤を構築するため、リードアクロスの信頼性向上と高度化へ向けて、New Approach Methodology (NAM) 手法を取り入れた統合的アプローチの開発に向けた研究を行った。

令和6年度は、OECD IATA Case Study の開発に適切な物質クラスターとシナリオの調査を行った。生殖発生毒性については、動物試験データセットや有害性発現経路（AOP）ネットワークの探索により、生殖発生毒性に関連する物質クラスターを同定した。これらのクラスターについてさらに調査を進め、ケーススタディに適したクラスターを2つ同定した。いずれも、生殖発生毒性とグルタチオン枯渇に関連していた。また、これらの物質の評価目的に適合する NAM 手法の探索、選別を進めた。

反復投与毒性については、先行研究にて検討してきた、共通あるいは類似の解毒代謝を有する可能性が高い低毒性の物質群から、ケーススタディに使用できるクラスターの選定を行った。毒性発現と代謝の関係性を説明することを目指し、*in vitro* ADME 試験手法を調査・選定し、*in vitro* ADME 試験を試行した。

A. 研究目的

本研究は、反復投与毒性及び生殖発生毒性を対象としてリードアクロスを実施し、

NAM により精緻な予測を実現することを目指している。

反復投与毒性は、化学物質安全性評価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。また、生殖発生毒性は、化学物質の次世代影響を対象としており、医薬品、農薬など幅広い分野において、安全性評価に必須項目とされているが、試験には多数の動物個体が必要となる。いずれの試験も時間的・経済的コストの低減が求められており、また近年高まってきている動物福祉の観点などから、段階的な動物試験の削減は不可避である。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。

一方で、反復投与毒性や生殖発生毒性のような複雑な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。IATA とは、既存文献、QSAR、リードアクロス、New Approach Methodology (NAM) などの複数のタイプの情報を統合して評価を導くものである。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なるため、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、反復投与毒性試験を対象とした NIHS 統合 DB および生殖発生毒性試験を対象とした DART NIHS 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。

R6 年度は、OECD IATA Case Study の開発に適切な物質クラスターとシナリオの調査を目的とした。反復投与毒性および生殖発生毒性両方を対象としたが、より注意深い解析を必要とする生殖発生毒性により多くのリソースをかけた。生殖発生毒性については、AOP ネットワークの探索により、反復投与毒性については、先行研究にて検討してきた、共通の解毒代謝機構を有する可能性が高い低毒性の物質群から、ケーススタディに使用できるクラスターの選定を行った。また、評価目的に適合する NAM 手法の探索、選別を進めた。R7 年度以降は、NAM 手法の選別とデータ取得を進め、それらの組合せによりそれぞれの毒性エンドポイントを予測するケーススタディを実施し、NAM を活用した統合的アプローチの優位性を検証し、他の事例に展開できるように留意点を取りまとめることを目指している。

B. 研究方法

生殖発生毒性ケーススタディ候補物質クラスターの解析

先行研究で使用してきた欧州化学品庁 (ECHA) REACH データセット、国立衛研が構築し公開している TG422 / TG421 データセット、先行研究で構築した NIHS 統合 DB より別途作成した精巢毒性データセ

ットを対象に、生殖発生毒性 (DART) ケーススタディの候補となる物質クラスターを探索した。先行研究で構築した DART AOP ネットワークに関連する Derek 構造アラートやアッセイデータを参照し、AOP ネットワークに対して意義のある Derek 構造アラートに関連する物質、または AOP における MIE (Molecular Initiating Event) と KE (Key Event) のアッセイデータで陽性を示す物質を対象にクラスタリング解析を行った。

反復投与毒性ケーススタディ候補物質群の解析

先行研究で検討してきた低毒性物質群のうちエチレンおよびプロピレングリコールアルキルエーテル類を対象として、NIHS 反復投与毒性試験統合 DB および OECD QSAR Toolbox、PubChem を用いて化学構造と物理化学的性状、代謝、*in vivo* 毒性情報を整理し、毒性の強さに影響する要素を抽出した。さらに *in vitro* ADME 情報を取得することを検討した。

(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

生殖発生毒性ケーススタディ候補物質クラスターの同定

DART AOP ネットワークを用いた候補物質群のスクリーニングにより、さまざまな化学物質を同定することができた。これらの物質が最も高頻度に関連づけられた経路は、グルタチオン枯渇経路とミトコンド

リア毒性経路であり、いずれも我々の先行研究の中で AOP として提案したものである。他には、ステロイド関連経路 (アンドロゲン/エストロゲン受容体関連経路など) も高頻度で見られた。

得られた DART AOP 関連物質について、独自のクラスタリングツールとフラグメント化法 (CERES 2_CO) を用い、類似性の閾値を 80% に設定して、Butina に基づく化学的クラスタリングを行ったところ、4 以上の物質を含む 17 のクラスターが生成された。これらのクラスターについて個別に確認し、DART 陽性物質が 1 または 0 のクラスターは DART への関連性が低いと考えられるので、対象外とした。以上から、2 物質以上が DART 陽性を示す 10 クラスターが得られた (表 1)。

これらのクラスターに優先順位をつけるため、それぞれのクラスターについて、毒性データ、機序に関するデータや最新の論文を調査したところ、クラスター 4 は近年の何報か研究があることから、また、クラスター 5 および 6 は、物質数、構造の多様性、活性の広がり観点から、優先順位をさげることとした。残る 7 クラスターについてさらに精査を進めた。

クラスター 1 (アルキルフェノール)

グルタチオン枯渇 AOP とミトコンドリア機能障害 AOP の両方に関連があるものとして同定された。さらに、幾つかの物質は AOP ネットワークの MIE アッセイの結果が陽性であった。これらの MIE のうち、4 つはステロイドシグナル伝達経路に関連していた。このクラスターは、陽性物質が 11、陰性物質が 7 と、バランスよく含まれてお

り、さまざまな置換フェノール構造を持つ。このクラスターに含まれる多くの物質について、エストロゲン受容体活性を予測する論文が発表されていた。そのため、このクラスターについては、優先順位を下げることにした。

クラスター2 (フタル酸エステル)

クラスター1 同様、陽性物質と陰性物質がどちらも多く含まれるクラスターである。しかし、このクラスターに含まれる物質とその代謝物について論文や総説が発表されており、生殖発生毒性プロファイルに基づくグループ化なども報告されていた。そのため、このクラスターについては、優先順位を下げることにした。

クラスター3 (ペルオキシエステル)

このクラスターの物質のほとんどが、主要代謝物 tert-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP) を介して毒性を示すことがあると考えられた。DART 研究では、TBHP は雄における不妊を誘発し、酸化ストレスを介して雌の生殖能力を損なうことが報告されている。

クラスター7 (クミルペルオキシド)

ECHA ウェブサイト上のレビューには、このクラスターの物質は多くの場合、混合物で、一般特性を示し、生殖毒性データは限られると書かれている。また、陰性となる原因が不明であることから、ケーススタディには適さないと考えられる。

クラスター8 (ベンゼンプロパン酸誘導体)

このクラスターの物質についてリードア

クロスを行った研究はないが、このクラスターの1 つについて、環境中運命、ヒトへの曝露や毒性の評価を試みた文献が1 報ある。ケーススタディの候補となるかについては適合性をさらに精査する必要がある。

クラスター9 (アルキルクロリド)

このクラスターの物質についてリードアクロスを行った研究はない。ケーススタディの候補となるかについては適合性をさらに精査する必要がある。

クラスター10 (ニトロ芳香族類)

先行研究で AOP を作成した際に、グルタチオン枯渇に関連する酸化ストレスを引き起こしうるニトロ芳香族物質を捕捉できるアラートを3 つ特定した。これらのアラートは、グルタチオン枯渇 AOP の作成に寄与した物質クラスターを含め、データセット内のニトロ芳香族物質の大きなクラスターを同定することができた。これらのニトロ芳香族物質は発生毒性、生殖発生 の両方において、さまざまな活性を示す。置換基のパターンが活性を決定することがあるため、これらの物質の活性カテゴリーを定義することができる可能性がある。ただし、このクラスターの物質は肝臓や血液などの一般毒性を示す可能性がある。その場合、高用量では他毒性の影響が出るため、NOAEL 算出を主目的とした一般・生殖発生毒性併合試験は低用量でしか実施されておらず、精巢毒性が顕在化していないことも考えられる。この点を明らかにするためにはさらに詳細な調査を行う必要がある。

反復投与毒性ケーススタディ候補物質群の

同定

先行研究で、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 10 のクラスターを抽出した。今年度は低毒性予測の事例研究の新たな対象としてエチレンおよびプロピレングリコールアルキルエーテル類を検討した。

エチレングリコールアルキルエーテルについては、化学構造、特に鎖長と毒性の間により相関性があり、低毒性を示すと考えられる構造領域は、グリコールエーテルの単位が 2 または 3、アルキル基鎖長は 1~4 であった。上記の構造領域内において logP 値および膜透過性パラメータである P_{eff} 値に大きな差異はなかった。主に末端のアルコールがカルボン酸に代謝される。グリコールエーテルの単位が 1 のときは血液、精巣において低用量から毒性影響が現れる。この理由は、主要代謝物（アルコキシ酢酸）が活性体であるためとされている。

プロピレングリコールアルキルエーテルの場合、低毒性を示すと考えられる構造領域は、直鎖型、分岐型いずれもプロピレングリコールエーテルの単位が 1~3、アルキル基鎖長は 1~4 であった。上記の構造領域内において logP 値および P_{eff} 値に大きな差異はなかった。プロピレングリコールエーテルの単位が 1 のときも低用量から毒性影響は観察されず、この理由は活性代謝物であるアルコキシ酢酸が生成されないためである（表 2）。

生理学的薬物動態（PBK）モデルの構築を検討するため、鎖長の異なるエチレングリコールアルキルエーテル 2 物質について、膜透過性、タンパク結合、肝クリアランスの

パラメータ値を *in vitro* 試験により測定を試行した。

D. 考察

本研究は、生殖発生毒性及び反復投与毒性を対象としてリードアクロスを実施し、NAM により精緻な予測を実現することを検討した。

生殖発生毒性に関しては、先行研究で構築していた AOP ネットワークとデータセットから、ケーススタディに用いる候補物質を探索し、生殖発生毒性に関連すると考えられる 10 の物質クラスターを同定した。

各クラスターを検討した結果、クラスター 3（ペルオキシエステル）、クラスター 10（ニトロ芳香族類）がケーススタディの候補として最も有望と考えられる。どちらのクラスターも全体の物質数が多く、陽性物質、陰性物質数も十分にあり、これまでにリードアクロス研究が報告されていないためである。クラスター 1 も候補となる可能性があるが、このクラスターを用いる場合は、エストロゲン受容体活性に関する解析に慎重を期す必要がある。

同定したクラスターの多くは雄性生殖毒性、グルタチオン枯渇 AOP に関連している。来年度以降、ケーススタディを進める際には、既存の精巣毒性 AOP を対象とするか、グルタチオン枯渇と発生毒性を結び付ける新規 AOP の作成を行い、これを対象とするか、検討する必要がある。また、クラスター解析や文献から得られた情報を基に、評価目的に適合する NAM 手法の探索、選別を進めた。

反復投与毒性については、昨年度抽出した低毒性物質群のうち、エチレンおよびプ

ロピレングリコールアルキルエーテル類を対象に、化学構造、物理化学性状、代謝、毒性データを解析した。本解析において定義された構造領域特に鎖長領域においては体内への吸収に大きな差はなく、親物質は毒性が弱いカルボン酸代謝物に速やかに代謝された結果、毒性影響は低くなると考えられた。グリコールエーテル 1 単位の場合は鎖長のわずかな違いが毒性に大きな影響を与える例外ケースであり、全体として両クラスターはリードアクロスの適用可能性は高い。ただし、定義された構造領域を超える鎖長を持つ物質への外挿を行うためにはさらなる情報収集と正当化が必要であり、注意を要する。PBK モデルの構築を想定して試行的に *in vitro* ADME 活性試験を実施したが、試験の実施または分析が困難な物質があることが判明した。来年度は、NAM として他の *in vitro* 試験を調査し、その有用性、本物質群への適用性などを明らかにし、データの取得を進める。

E. 結論

令和 6 年度は、生殖発生毒性については、OECD IATA Case Studies プロジェクトに提出するケーススタディに供する物質クラスターを探索した。先行研究で作成した AOP ネットワークとその際に使用したデータセットを探索し、さらに文献調査を行った結果、クラスター3 とクラスター10 の 2 つのクラスターをケーススタディ候補物質として同定することができた。アラート構造や MIE の情報から、これらが関係する AOP を推定することができた。この情報を基に、評価目的に適合する NAM 手法の探索、選別を進めている。

反復投与毒性については先行研究で検討してきた類似の代謝機構を有する可能性のある低毒性物質のクラスターから 2 つを対象に解析を行い、リードアクロスの適用可能性を検討した。グループ化の信頼性向上に資する NAM として、体内への吸収、代謝物の構造予測と代謝速度が候補として考えられた。

R7 年度以降は、NAM 手法の選別とデータ取得を進め、それらの組合せによりそれぞれの毒性エンドポイントを予測するケーススタディを実施し、NAM を活用した統合的アプローチの優位性を検証し、他の事例に展開できるように留意点を取りまとめることを目指している。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamamoto S, Yoshida K, Matsumoto M, Yamada T. Construction and evaluation of an open-source database for inhalation-based physiologically based kinetic modeling of selected categories for industrial chemicals. *J. Toxicol. Sci.* 2025; 50: 57-68.

Hirose N, Hasegawa S, Umamo T, Murata Y, Iso T, Inoue K, Yamada T, Masumura K, Matsumoto M: Summary information of human health hazard assessment of existing chemical substances (X). *Bull. Natl Inst. Health Sci.* 2024; 142: 63-70.

Ninomiya Y, Watanabe H, Yamagishi T, Maruyama-Komoda T, Yamada T, Yamamoto H. Prediction of chronic toxicity of pharmaceuticals in *Daphnia magna* by combining ortholog

prediction, pharmacological effects, and quantitative structure-activity relationship. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2024; 282: 116737.

2. 学会発表

古濱彩子, 亀山暁子, 杉山圭一, 山田隆志, 小野敦. 食品健康影響評価における OECD (Q)SAR アセスメントフレームワーク(QAF)に基づく変異原性評価法の検討. 日本薬学会第 145 年会 (福岡, 2025.3.29)

Yamada T, Maruyama-Komoda T, Jojima K, Yamazoe Y, Masumura K. Extracting hepatotoxicity-related insights by expert-driven comprehensive analysis on animal toxicity data: Towards new approach methodologies-based risk assessment. Society of Toxicology 64th Annual Meeting (Orlando, FL, USA, 2025.3.20)

山田隆志. (Q)SAR 予測の信頼性をどのように評価するか? : OECD (Q)SAR 評価フレームワーク(QAF)の概要. 日本動物実験代替法学会第 37 回大会 (宇都宮, 2024.12.1)

Yamada T, Maruyama-Komoda T, Jojima K, Yamazoe Y, Masumura K. Multifaceted data analysis on animal toxicity database for extracting hepatotoxicity-related insights: Towards improved safety

assessment integrating new approach methodologies. 13th Annual Meeting of the American Society for Cellular and Computational Toxicology (Research Triangle Park, NC, USA, 2024.10.28)

Ono A, Akahori Y, Ambe K, Yoshinari K, Yamada T. Evaluation of the Caco-2 permeability assay as NAM, New approach methodologies, for in vivo repeated dose toxicity NOAEL assessment. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2024) (Copenhagen, Denmark, 2024.9.11)

Hayashi T, Fukushima A, Akahori Y, Kawamura T, Yamada T, Hirose A. Identification of chemical categories of E&Ls having PDEs below the proposed threshold of toxicological concern for non-genotoxic chemicals via intravenous (TTCiv). 58th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2024) (Copenhagen, Denmark, 2024.9.10)

Yamada T, Maruyama-Komoda T, Jojima K, Yamazoe Y, Masumura K. Extracting hepatotoxicity-related insights through analysis on animal toxicity database - Towards improving in silico prediction accuracy. 58th Congress of the European Societies of Toxicology

(EUROTOX 2024) (Copenhagen,
Denmark, 2024.9.9)

山田隆志, 丸山(薦田)多恵子, 広瀬明彦.

医薬品の生態毒性評価を支援するデータベースと in silico 予測手法の開発. 第51 回日本毒性学会学術年会 (福岡, 2024.7.5)

廣田衛彦, 豊田明美, 畑尾正人, 笛木修,
山田隆志, 伊藤晃成, 小野敦. パネルディスカッション「化粧品の安全性保証の新たな考え方: Next Generation Risk Assessment (NGRA) の行政利用に向けたチャレンジ」.第 49 回日本香粧品学会 (東京, 2024.6.29)

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

表 1 データセットから同定された生殖発生毒性に関連する可能性がある物質クラスター

クラスター	名称	発生毒性 分類	精巣毒性 分類	アッセイデータに 基づく MIE 仮説数	Derek アラートに基づく 仮説
1	アルキルフェノール	陽性 11 陰性 7	陽性 3 陰性 12	8	Glutathione (GSH) decrease, Mitochondrial dysfunction
2	フタル酸エステル	陽性 3 陰性 7	陽性 4 陰性 5	4	Testicular toxicity
3	ペルオキシエステル	陰性 3 陽性 5		0	Glutathione (GSH) decrease
5	アルキル酸	陽性 2 陰性 2	陰性 2	3	Glutathione (GSH) decrease
7	クミルペルオキシド	陽性 3 陰性 1	陰性 1	2	Glutathione (GSH) decrease
8	ベンゼンプロパン 酸誘導体	陽性 2 陰性 4	陰性 2	1	Glutathione (GSH) decrease, Mitochondrial dysfunction
9	アルキルクロリド	陽性 1 陰性 1	陽性 1 陰性 5	0	Mitochondrial dysfunction
10	ニトロ芳香族類	陽性 14 陰性 35	陽性 13 陰性 69	0	Glutathione depletion

表 2 データセットから同定された反復投与毒性試験における低毒性の可能性がある物質クラスター

クラスター	名称	構造領域		備考
		エーテル (数)	アルキル基 (炭素数)	
1	エチレングリコール アルキルエーテル	2~3	1~4	エーテル数 1 の場合、活性代謝 物であるアルコキシ酢酸が生成
2	プロピレングリコー ルアルキルエーテル	1~3	1~4	