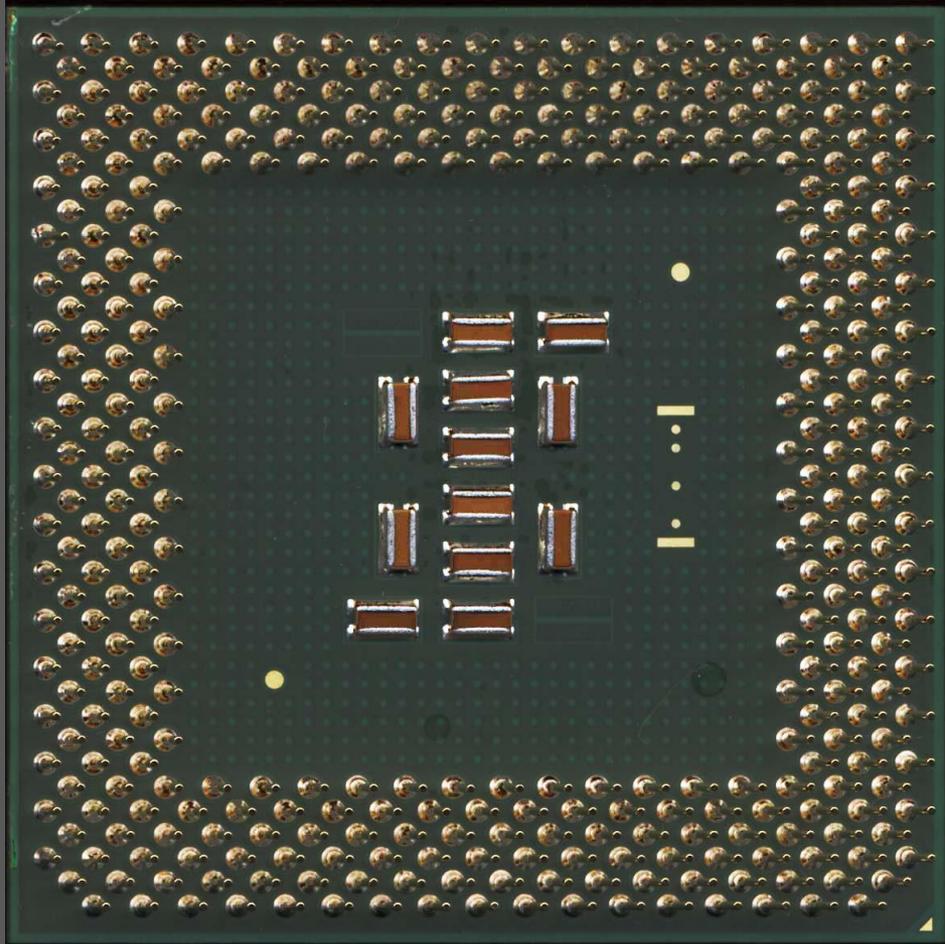


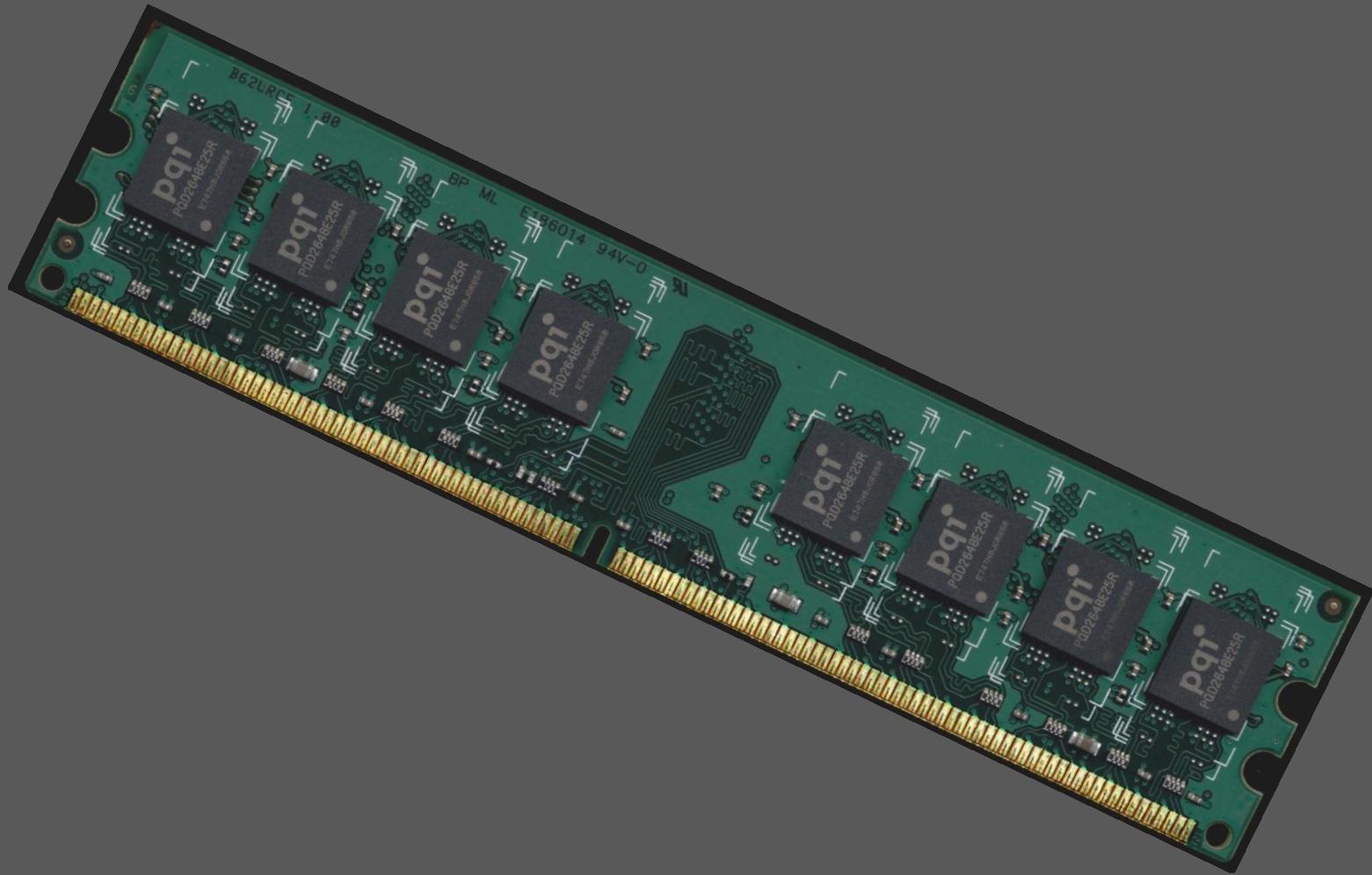
反復投与毒性試験の*in silico*評価 —NEDO/METIプロジェクトを終えて—

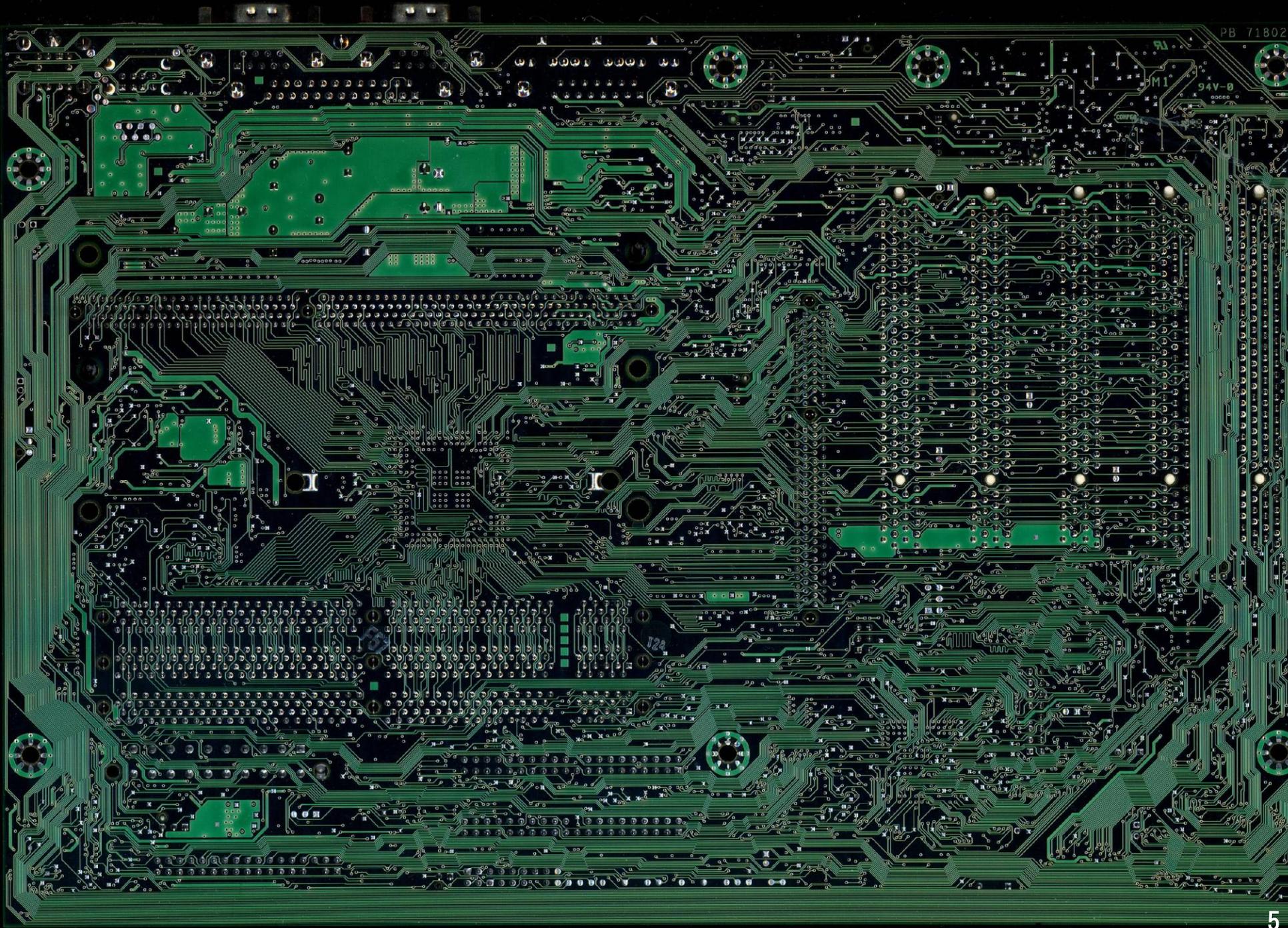
公益財団法人
食品農医薬品安全性評価センター
理事長

林 真









PB 71802

94V-0

M1

I

I

結論-1

- **特定の分野での *in silico* 評価は可能 (e.g., genotoxicity)**
- **SAR/QSAR のみでの反復投与毒性の評価は現時点では無理**
- **反復投与毒性の *by in silico* 評価を可能にするには、代謝情報、作用機序情報の組み込み、カテゴリカル手法が必須**

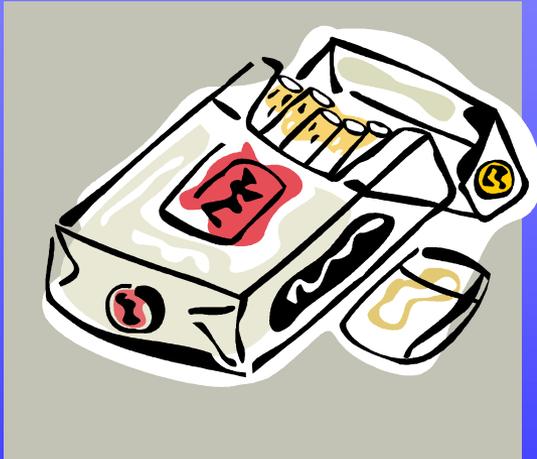
結論-2

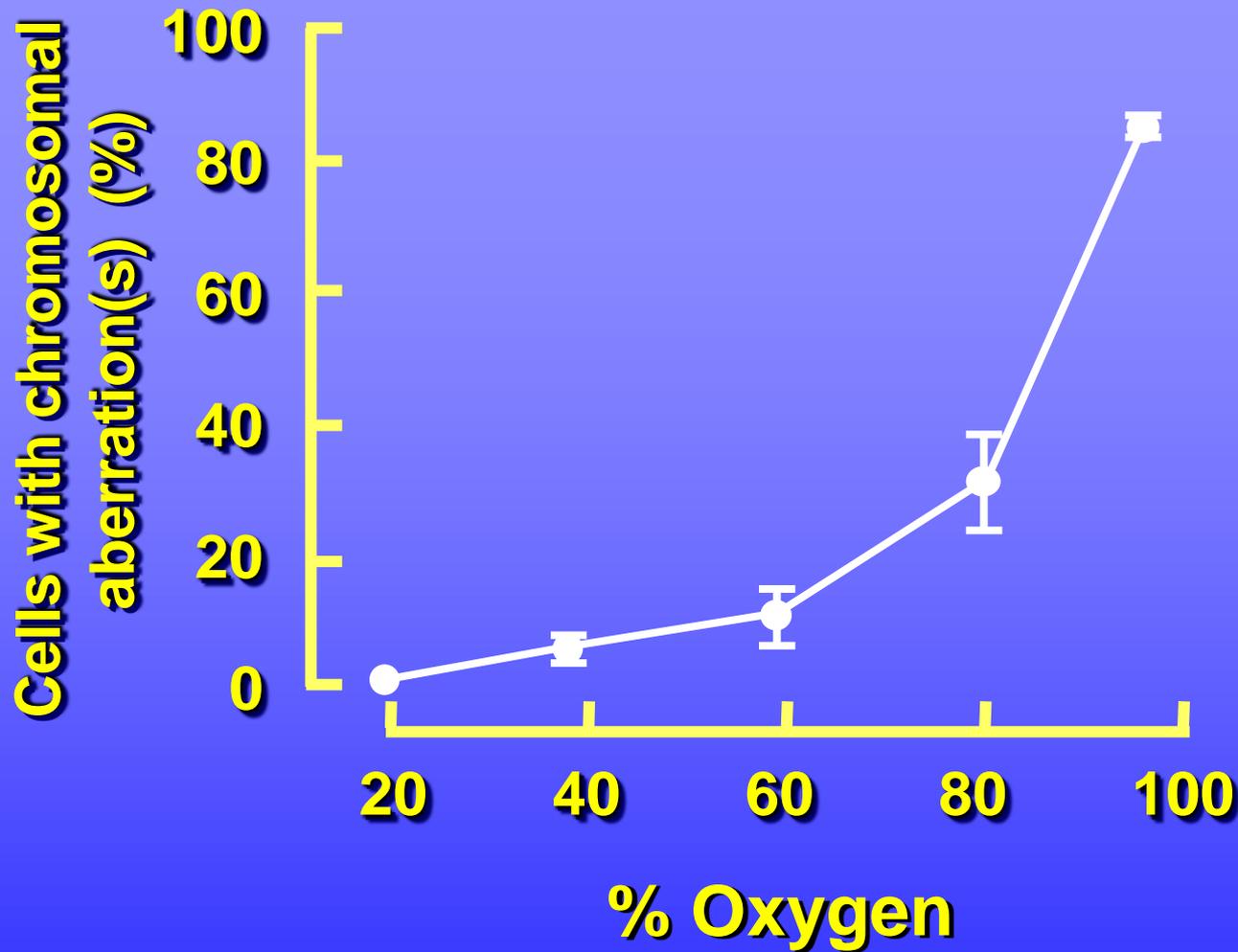
- また、カテゴリーアプローチや Adverse-Outcome-Pathway (mechanistic) が必須
- *In silico* 評価はハイスループットであり、動物福祉, 3R's, の観点からも問題ない
- *In silico* アプローチのみがヒトに対する安全性評価を直接チャレンジすることが出来る

本日のトピックス

- Hazard の同定 vs risk 解析
- ヒトに対する安全性を動物を使わずに評価
 - *In vitro* assays
 - Omics/new technology
 - Threshold/TTC
 - *In silico*
- *In silico* によるげっ歯類反復投与試験へのアプローチ
 - NEDO/METI プロジェクト／化審法
 - Rat 28-日反復投与毒性試験データベースの構築
 - 今後の安全性評価

ハザード vs リスク





J.E. Sturrock and J.F. Nunn (1978): Chromosomal damage and mutations after exposure of Chinese hamster cells to high concentrations of oxygen, *Mutat. Res.*, 57, 27-33.

構造活性相関による 有害背評価手法開発

Hazard Evaluation Support
System (HESS) Integrated
Platform

全体の目標

目標・指標

化学物質の既知の反復投与毒性試験データや関連する毒性作用機序，代謝等を体系的に整理した情報に基づき，肝臓等への毒性を化学構造から評価するための判断材料となる情報や，代謝物，代謝経路の情報，最小影響量の範囲等の予測情報を利用者が効率よく参照可能な機能を備えた有害性評価支援システム統合プラットフォームを開発し，公開する。

全体の目標

目標・指標

なお、開発に当たって、OECD (Q)SARプログラムへ提供するなど国際活動への貢献を行うとともに、OECD (Q)SAR Application Toolbox への統合も念頭に置いた汎用性の高いものとする。

28日間反復投与毒性試験

目的: 動物に被検物質を一定期間毎日反復投与したときに現れる生体の機能及び形態の変化を観察することにより, 被検物質の毒性を明らかにすることを目的とする.

齧歯類(原則ラット)

28日間投与

14日間回復

体重・摂餌量・摂水量・一般状態

↑
検査

↑
検査

検査項目: 血液形態学的検査
血液生化学的検査
神経学的検査
尿検査

病理学的検査 臓器重量
剖検所見
組織学的検査

無影響量(NOEL)
No Observable Effect Level

化審法における*in silico* 評価の利用開発

	分解度試験	濃縮度試験	生態毒性試験
担当機関	NITE	NITE	国環研
化審法物質試験データ数 (2011年6月時点公表済)	1487物質	833物質	644物質
主な <i>in silico</i> モデル	BIOWIN, CERIモデル, CATABOL	BIOWIN, CERIモデル, Baseline Model カテゴリーアプローチ	ECOSAR, KATE, TIMES
	Ames試験	染色体異常試験	反復投与毒性試験 /生・反併合試験
担当機関	国立衛研	国立衛研	国立衛研
化審法物質試験データ数 (2011年6月時点公表済)	257物質	266物質	256物質
主な <i>in silico</i> モデル	DERECK, MultiCase AdmeWorks, TIMES	DERECK, MultiCase, AdmeWorks, TIMES	HESS (当プロジェクトで開発)

研究開発項目①： 毒性知識情報データベースの開発

目標・指標

公開されている主要な反復投与毒性試験データ(化審法の既存化学物質安全性点検データ, OECDのSIAR等)や毒性作用機序の情報が搭載され, 化学構造上の特徴や物理化学的性状から有害性の類推等の判断材料として必要とされる情報を検索できる「毒性知識情報データベース」を開発する.

研究開発項目②: 代謝知識情報データベースの開発

目標・指標

主にラットの肝臓における代謝知識情報データベースの開発を完了する。約800種の化学物質について文献，報告書を精査することにより，第1相反応（酸化等の反応）及び第2相反応（グルクロン酸抱合，硫酸抱合等）を含め，基礎となる約500の代謝反応を網羅し，部分構造等の化学構造から代謝物，代謝経路を推定する代謝知識情報データベースを開発する。

研究開発項目③: 有害性評価支援システム 統合プラットフォームの開発

目標・指標

毒性知識情報データベース及び代謝知識情報データベースを連携し、毒性予測モデルを組み込み、化学構造を入力すると、代謝物情報や、親物質・代謝物の有害性情報、類似化合物の検索及び解析結果や、肝臓への毒性を中心とした予測結果が表示される有害性評価支援システム統合プラットフォームを開発し、公開する。また、ユーザー独自の情報をデータベースに追加することにより、より精度の向上につながる機能を備えたものとする。開発に当たっては、国際調和・貢献を考慮し、OECD (Q)SAR Application Toolboxとの互換性を確保した仕様とし、カテゴリー化の機能に関しては、OECDで検討されているカテゴリーアプローチの方法論に準拠したものとする。

開発方針

- ・ 専門家の判断をサポートするためのシステムを構築する(システムが判断を下すのではない).
- ・ 動態, 毒性, 病理そして総合的なリスク評価を行う専門家が主導的な役割を果たす(システムの専門家主導ではない).
- ・ 国際的に利用されるものを目指す(OECD (Q)SAR Application Toolboxの開発者をメンバーに加え, OECDと連携しつつ研究開発を実施).

成 果 (1)

反復投与毒性を対象とした世界初の予測システムである有害性評価支援システム統合プラットフォーム(HESS*)とこれに付属するデータベースシステム(HESS DB)を開発し公開した。

HESS DBは反復投与毒性試験報告書(500物質)の詳細情報, 及び, これと関連する毒性作用機序や代謝・動態に関する情報を体系立ててデータベース化すると共に高度な検索機能を備えた。

HESSは, 未試験物質の反復投与毒性の予測を支援する機能(カテゴリーアプローチ及びベイジアンネットワーク)やHESS DBに搭載された情報を効率良く参照するための機能を備えた。

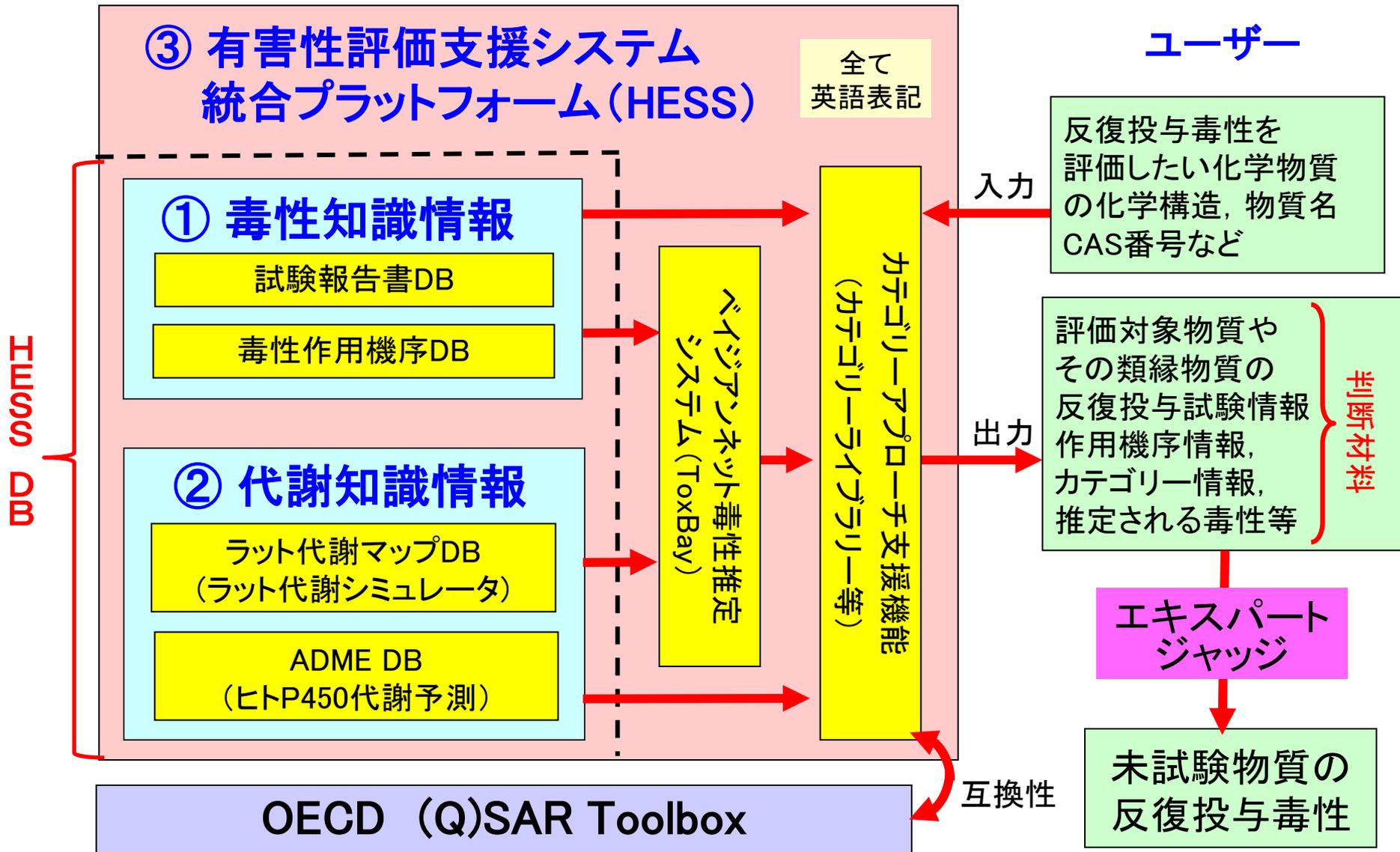
成 果 (2)

HESSは、OECD (Q)SAR Toolbox Management Groupと関係しつつ開発を進め、HESSの一部は、OECD からの要望により、OECD (Q)SAR Toolboxへ統合された。

カテゴリーアプローチの手法確立に関するOECDのワークショップにおいて、反復投与毒性のカテゴリー化の実例をケーススタディとして提供し、高い評価を受け、当該活動の発展に貢献した。

欧州化学品庁(ECHA)にHESS試用版のトライアルユーザのモニターを依頼し、その評価結果を基にHESS正式版を完成させた。現在HESSは、ECHAによりREACH届出物質の評価に活用されている。

開発システムの構成



NITEのウェブサイトからスタンドアロン版を無料で公開

[試験報告書DBの開発]

<反復投与毒性試験報告書の収集と整理>

- 既存点検『28日反復投与毒性試験報告書』(厚労省・経産省)
- 既存点検『反復・生殖併合試験報告書』(厚労省・経産省)
- 米国NTP関連の報告書『短期試験関連, 長期試験関連』
- OECD/EUのSIDS関連
- 農薬抄録, 食品添加物・動物薬関連の報告書
- 学術論文 (信頼性の高いジャーナルに掲載されたもの)

質の良いデータを使用

ラットの経口投与試験報告書
計**1246報**を収集・整理した



・充実したデータセットを持つ, 信頼性・透明性の高い, **502物質**の試験報告書をデータベース入力データとして選定した.

[試験報告書DBの開発]

<データベース入力項目の設定>

- 反復毒性試験の基本的項目を網羅している、化審法『**28日間反復試験**』を基に、様々な反復投与試験報告書の入力が可能で、国際的使用も視野に入れた**入力項目**を設定。すべて英文とした。
- 項目ごとの試験データの比較を可能にする為、**詳細な試験結果項目**を設定。



- ・ **様々な条件** (投与期間や投与ルートなど) の反復投与毒性試験報告書に対応できる**データ項目の設定**による、**汎用性の高い**データベース設計。
- ・ **詳細な試験データ項目**により、**試験項目ごとの比較**を容易にした。
- ・ **【共通フォーマット】**により、試験機関ごとの**異なった試験結果の入力**が容易になった。

[試験報告書DBの開発]

〈データの抽出と入力2〉

- 報告書に記載されている毒性所見の有意差マークのほか、本プロジェクトの**毒性・病理専門家の意見**や**既存点検時の化学物質審議会判定**に基づく、**有意差マーク(フラグ)**を付与するなどして、**毒性学的な注意喚起**を図った。

血液学		特記事項																
Chem.No. 49																		
Report.No. 50																		
Study.No. 50																		
		投与群																
DOSE		T0				T1				T2				T3				
mg/kg		0				30				100				300				
匹数 [M/F]		M:5 F:5				M:5 F:5				M:5 F:5				M:5 F:5				
性別	検査項目	mean	SD	mean	SD	sgnif	F1	F3	mean	SD	sgnif	F1	F3	mean	SD	sgnif	F1	F3
Male	HCT	%	42.5	0.9	40.7	1.4	*		41.8	0.8				40.0	0.6	**		▼
	HGB	g/dL	14.5	0.4	13.7	0.5	*		14.3	0.4				13.6	0.3	**		▼
	Met-Hgb	%	0.6	0.3	0.6	0.3			0.7	0.1				1.1	0.4			
	Heinz body																	
	RBC	$\times 10^9/\text{mm}^3$	7.36	0.25	6.88	0.32	*		7.07	0.20				6.90	0.25	*		▼
	MCV	μm^3	57.8	2.3	59.2	1.8			59.2	0.9				58.0	1.5			
	MCH	pg	19.7	0.7	19.9	0.5			20.2	0.3				19.7	0.4			
	MCHC	%	34.1	0.2	33.7	0.4			34.1	0.2				34.0	0.4			
	Reticulocyte	%	36	9	40	9			36	4				67	19	**		▲
	PLT	$\times 10^9/\text{mm}^3$	1157	133	1110	117			1088	92				1463	76	**		▲
	WBC	$\times 10^9/\text{mm}^3$	12.8	5.0	14.3	4.1			10.2	1.6				16.4	1.7			
	Differential leukocyte counts																	
	NEUT	%	17	11	21	16			12	7				18	8			
	Stab																	
	Seg																	
	LYMPH	%	80	12	74	17			85	7				76	7			
	MONO	%	2	1	2	1			1	1				2	2			



・本プロジェクト独自の判断【フラグ】を採用することにより、さらに**有意な毒性の検索**が容易に可能なデータベースとした。

[試験報告書DBの開発]

〈シソーラスの開発〉

- データの検索を正確に行えるよう、データベースに入力する病理所見について、専門家が同義語を分類し関連付けることにより、用語の統一を行い、シソーラスを作成した。

報告書記載の病理所見用語の統一を行い、DB化した全報告書(13機関)について全83臓器・11302所見のシソーラスを作成

- ・ 同義語を関連付けることにより、データベースでの所見ごとの検索作業を正確かつ容易に行うことが可能。

hypertrophy of centrilobular hepatocyte

hypertrophy, hepatocyte, centrilobular

hypertrophy of hepatocyte, ground glass appearance in the central zone

肝臓・小葉中心
肝細胞・肥大

[毒性作用機序DBの開発]

〈化審法既存化学物質の毒性作用機序情報の収集・整理1〉

化学構造, 官能基などに着目して物質を選抜し, 作用機序情報を収集

* 対象臓器・・・肝臓, 腎臓, 神経など / * 機序情報・・・分子, 細胞, 臓器レベル

多岐にわたる情報を効率的に整理する必要

反復毒性試験で発現した毒性をベースに物質を選抜し, 作用機序を体系的に収集・整理する.

データベース化
カテゴリー作成のための判断材料を提供

[毒性作用機序DBの開発]

〈化審法既存化学物質の毒性作用機序情報の収集・整理2〉

■ 反復投与毒性試験報告書

- 化審法28日間反復経口投与毒性試験報告書(157物質分)
- 化審法反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験報告書(116物質分)
- NTP Technical Reports on the Toxicity Studies(48物質分)

計321物質分

■ 毒性発現物質の選抜

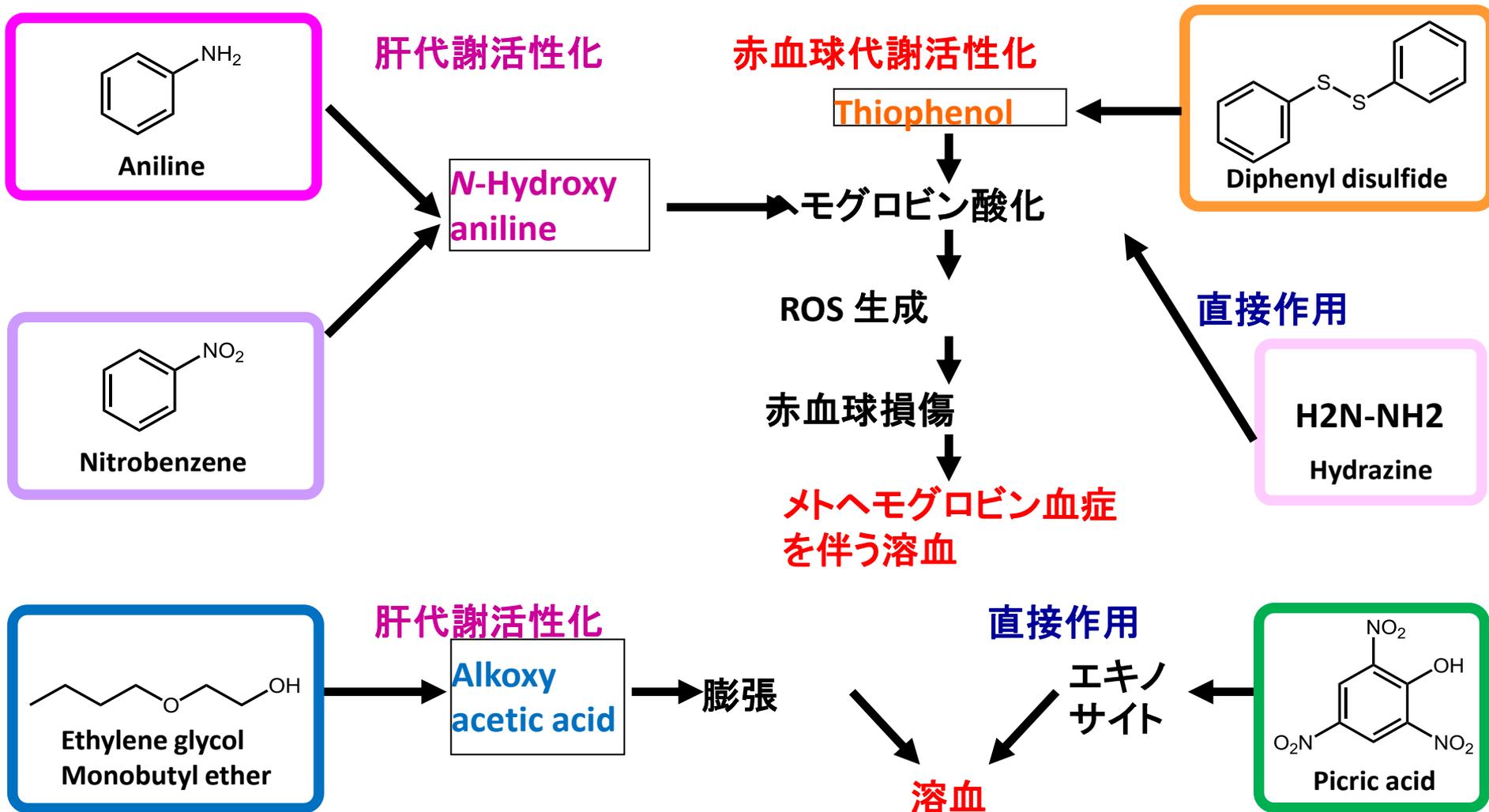
- 溶血 (RBC ↓, Hb ↓, Hct ↓, Ret ↑, 脾臓, 肝, 腎ヘモジデリン沈着)
- 肝毒性(変性・壊死)
- 腎毒性(変性・壊死)
- その他 膀胱, 精巣, 神経毒性

■ 文献検索

- 検索用語: 物質名 + 臓器/毒性 など
- 検索エンジン: PubMed, Google Scholar, DTP, TOXNET

[毒性作用機序DBの開発]

〈溶血性物質の作用機序にもとづく分類〉



[毒性作用機序DBの開発]

〈データベース化の方針〉

- 収集した文献情報は規格化されていないので、毒性発現の経路に基づき作用機序を整理できるような項目を設定する。また、どのような材料を用いてどのような実験を行ったかを整理できるような項目を設定する。
- 可能な限り類似物質の毒性作用機序情報を取り込む。
- 論文において検証された結果と、著者の推測は、区別して記載する。
- 論文中の記述はそのままコピーせず、キーワードを用いて簡略化して記載する。

毒性作用機序DBの開発]

〈設定したデータ項目〉

〈化学物質に関する情報〉

- Chem. No.
- CAS
- Chemical name
- Structure

報告書DBと
のリンクに必
要な情報

〈実験に関する情報〉

- Cell line/ Species
- Experimental design
- *in vitro* / *in vivo* / *ex vivo*
- Concentration / dose employed

〈レファレンス情報〉

- Reference

〈要約〉

- Key words
- Summary

本DBの
主要な情報

〈その他追加情報〉

- Effective concentration/ Dose
- Related compounds studied
- Additional information
- Authors' proposal (opinion)

〈作用機序に関する情報〉

- Possible chemical reaction /metabolism
- Possible toxicant
- Possible interaction with bio-molecule
- Effects
- Target cell/ tissue/ organ etc.

〈備考〉

- Remark
- Related references

例：酢酸アリルの毒性作用機序情報

Silver EH, Murphy SD. Effect of carboxylesterase inhibitors on the acute hepatotoxicity of esters of allyl alcohol. Toxicol Appl Pharmacol. 1978; Aug;45(2):377-89.

キーワード	化学反応/ 代謝	トキシ カント	標的分子との 相互作用	エフェクト
肝・代謝活性化	酢酸アリルの加水分解	—	—	血中ALT上昇

機序の要約

- ラットにおいて、酢酸アリルで誘導される肝毒性は、カルボキシルエステラーゼ阻害剤の前処理により抑制される。
- 酢酸アリルの加水分解物であるアリルアルコールを投与すると肝毒性が誘発する。

試験された他の化合物

桂皮酸アリル, フェノキシ酢酸アリル

追加情報

- 桂皮酸アリル, フェノキシ酢酸アリルとも、肝毒性を誘発し、カルボキシルエステラーゼ阻害剤の前処理により抑制される。

[毒性作用機序DBの開発]

<毒性作用機序解説>

Mechanistic information on allyl ester-induced hepatotoxicity

[Summary]

Repeated administration of allyl esters such as allyl acetate, allyl hexanoate and diallyl phthalate primarily causes hepatotoxicity, including periportal hepatocyte hyperplasia, hepatocyte necrosis and bile duct hyperplasia. These allyl esters are hydrolyzed to allyl alcohol, which is easily oxidized to the reactive metabolite, acrolein, in the liver. Acrolein appears to be responsible for hepatotoxicity. Hence, allyl esters that are predictably metabolized to allyl alcohol produce hepatotoxic effects.

[Hepatotoxic pathway induced by allyl acetate]

In rats, allyl acetate is shown to be hydrolyzed to allyl alcohol (Kaye, 1973, Silver and Murphy 1978). Hydrolysis of allyl acetate to allyl alcohol is required for allyl acetate-induced hepatotoxicity a theory is supported by the evidence that allyl acetate-induced hepatotoxicity was prevented by pre-treatment with carboxylesterase inhibitors (Silver and Murphy, 1978).

Allyl alcohol is readily oxidized to acrolein by alcohol dehydrogenase (Serafini-Cessi, 1972 Patel *et al.*, 1980; Atzori *et al.*, 1989). Acrolein is a reactive substance and appears to cause hepatotoxicity through various biochemical and cellular effects in the liver (Ghilarducci and Tjeerdema, 1995). Acrolein readily forms a conjugate with glutathione (GSH), acrolein-GSH adduct (Ohno *et al.*, 1985; Adams and Klaidman, 1993), followed by GSH depletion (Ohno *et al.*, 1985 Silva and O'Brien, 1989), oxygen radical formation (Silva and O'Brien, 1989; Adams and Klaidman 1993), and lipid peroxidation (Silva and O'Brien, 1989; Watanabe *et al.*, 1992). Acrolein is also capable of reacting with sulfhydryl groups of macromolecules nonenzymatically via a Michael addition, and reaction with critical intracellular sulfhydryl groups is proposed as a component of the cytotoxicity of acrolein (Cooper *et al.*, 1992; Kehrer and Biswal, 2000). Oxidative stress subsequent to the loss of GSH may be associated with mitochondrial dysfunction (Watanabe *et al.*, 1992 Arumugam *et al.*, 1999). Direct action of acrolein on mitochondria is possible (Sun *et al.*, 2006), but seems unlikely at low doses due to the presence of abundant cellular GSH. The hepatotoxic pathway is illustrated in Fig. 1. The mechanism of bile duct hyperplasia induced by allyl acetate and allyl alcohol is less well understood.

(アリルエステルの肝毒性メカニズム)

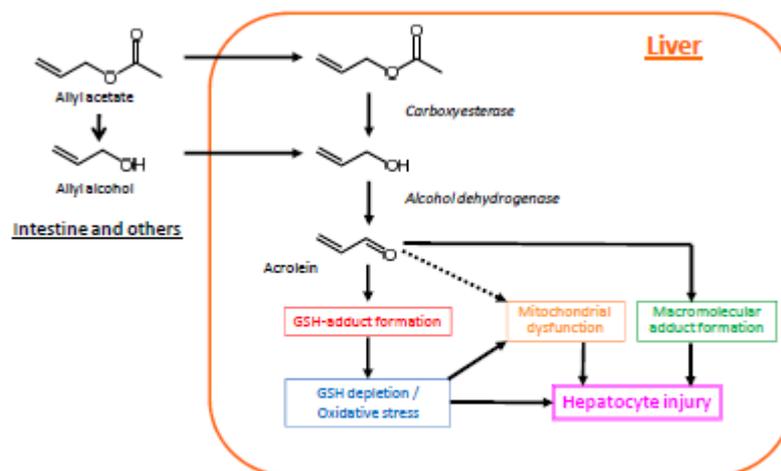


Fig.1 Hepatotoxic pathway induced by allyl acetate.

ある程度コンセンサスが得られている毒性作用機序を簡潔に要約

代謝知識情報データベースの開発

主にラットの肝臓における代謝知識情報データベースの開発を完了する。約800種の化学物質について文献、報告書を精査することにより、第1相反応(酸化等の反応)及び第2相反応(グルクロン酸抱合、硫酸抱合等)を含め、基礎となる約500の代謝反応を網羅し、部分構造等の化学構造から代謝物、代謝経路を推定する代謝知識情報データベースを開発する。

<代謝関連情報掲載論文の調査と収集>

- 代謝関連情報掲載論文

- Google Scholar による検索を実施

調査物質数	DB掲載 物質数(内数)	DB掲載 論文数
145	61	112

- 代謝関連情報の生物種ごとの内訳

	ヒト	ラット	その他 哺乳動物	その他 生物種
論文数	18	77	47	2

※重複あり

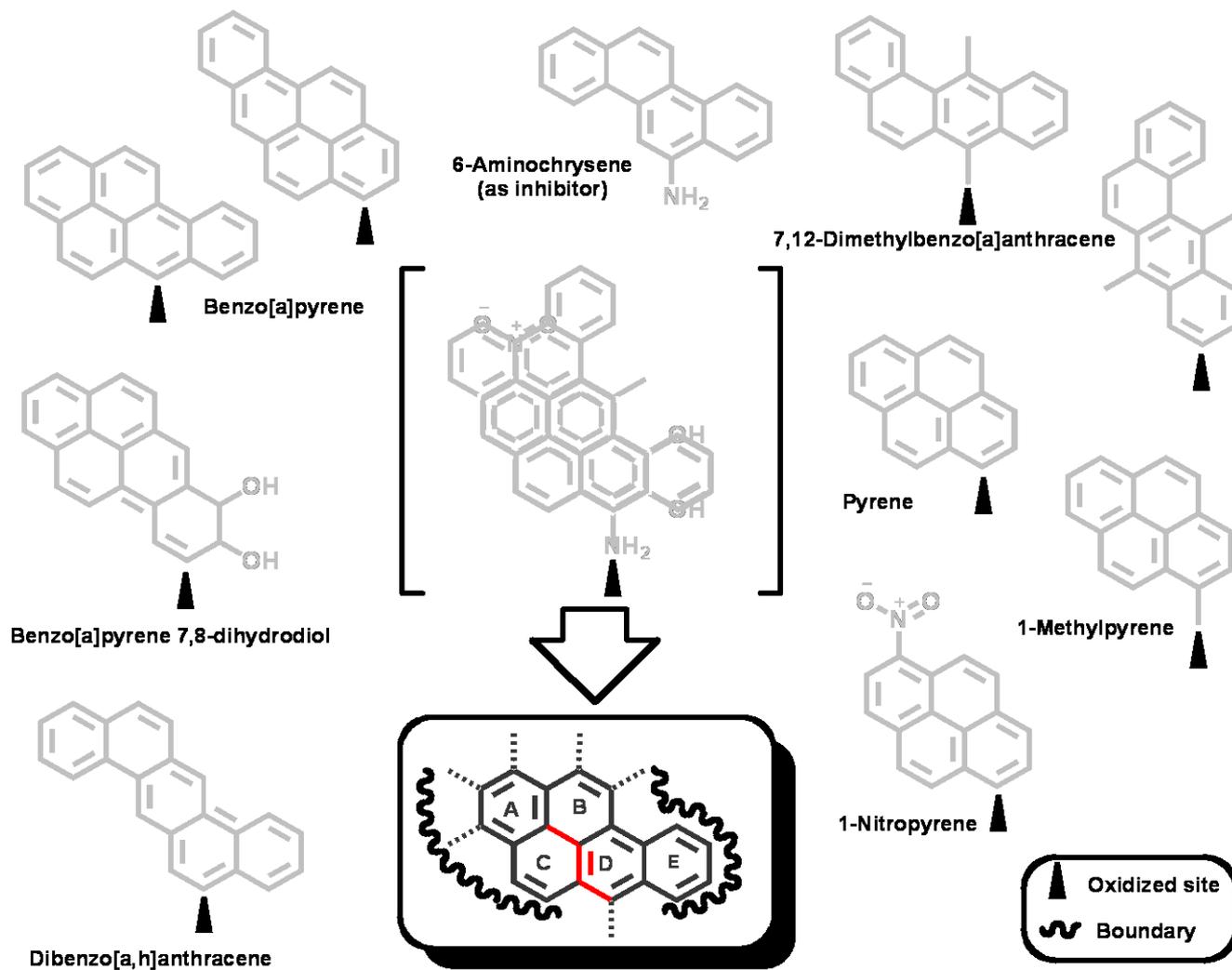


基質の構造による代謝予測手法でヒトの
代謝物質を予測し、情報を拡充する

<代謝予測モデルの構築 - CYP2E1代謝予測手法>

- 多環炭化水素様の**テンプレート**に当てはめる。
---サイズ, 形状の適合
- テンプレート**占有**を**スコア**として計数する。
- テンプレート上の**特異点のスコア**を付加する。
- 合計**点数の高い配置**が, **優先的に酵素と反応する**と判断する。これにより, **酸化(還元)部位**が特定される。
- 同点または2点以内の差で複数の配置が適合する場合, **合計点数の順に複数の代謝物が生成する**と判断する。
- ヘム接近部位で起こる反応を, **有機化学的(電子密度等)な考慮**の元, **生成物を予測**する。

〈ヒトCYP2E1代謝予測テンプレートの構築〉



A core space of CYP2E1 active site was extracted from polycyclic aromatic hydrocarbons substrates and inhibitor. Arrows indicate the major site of the oxidation (interaction with heme - oxygen). Assumed space boundary is shown as chain.

<List of 125 chemicals associated with CYP2E1>

Acetaminophen, Acetone, Acetonitrile, 2-Acetylbenzothiophene, Acrylonitrile, S-adenosyl-l-methionine, Ametryne, 6-Aminochrysene, Amino[a]carboline, 3-Amino-1,2,4-triazole, Aniline, 2-Anisidine, Anisole, Anthracene-9-carboxaldehyde, 9-Anthraldehyde, Arachidonic acid, Atrazine, Benzo[a]pyrene, Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol, 2,2'-Bipyridine, 1,3-Butadiene, *t*-Butylacetylene, N-Butylaniline, *t*-Butyl methyl ether, 4-*tert*-Butyltoluene, Caffeine, Carbamazepine, 4-Chloroaniline, 2-Chloro-4-toluidine, 4-Chloro-2-toluidine, Chlorzoxazone, Coumarin, 4-Cyclopropylanisole, 4-Cymene, 2-Cresol, Dacarbazine, cis-Crotononitrile, Dapsone, Deprenyl, Diallylsulfone, 2,4-Diaminoanisole, 2,4- and 2,6-Diaminotoluene, Dibenzo[a,h]anthracene, 1,2- and 1,4-Dichlorobenzene, 1,2-Dichloro-1-fluoroethane, 1,1-Dichloro-2,2,2-trifluoroethane, Diethyl ether, N,N-Diethylthiocarbamate, 2,5-Difluoroaniline, 2,3- and 2,6-Dimethylaniline, 7,12-Dimethylbenzo[a]anthracene, 2,6-Dimethylnaphthalene, Dimethylsulfoxide, 1,3-Dinitrobenzene, Enflurane, Estragole, Ethosuximide, Ethylbenzene, Ethyl isocyanide, Ethylmorphine, 1-Ethylpyrene, Flutamide, Furan, Genistein, 1,1,2,3,3,3-Hexafluoropropyl methyl ether, 13-Hydroperoxy-9,11-octadecadienoic acid, 3-Hydroxypyridine, Isoflurane, Isoprene, Isoquinoline, Lauric acid, (R)-(+)-Menthofuran, 7-Methoxy-4-trifluoromethylcoumarin, 3-Methylacetanilide, Methylamino[a]carboline, 2- and 4-Methylanisole, Methyleugenol, N-Methylformamide, 3-Methylindole, 6-Methylnorharman, 4-Methylpyrazole, 1-Methylpyrene, 4-Methyltriazole, Nabumetone hydroxyimine, Naphthalene, 2- and 4-Nitroanisole, Nitrobenzene, 6-Nitrochrysene, 4-Nitrophenol, 1-Nitropyrene, N-Nitrosobenzylmethylamine, N-Nitrosodimethylamine, N-Nitrosodiethylamine, N-Nitrosodipropylamine, N-Nitrosodiamylamine, N-Nitrosoethylmethylamine, 2-, 3- and 4-Nitrotoluene, Norharman, Oleic acid, 13-Oxo-9,11-tridecadienoic acid, Pargyline, Phenanthrene, Phenethyl isothiocyanate, Phenylacetylene, 5-Phenyl-1-pentyne, Propofol, 2-n-Propyl-quinoline, Pulegone, Pyrene, Quinoline, Safrole, Styrene, 4-Vinylcyclohexene, 1,2,3,5-Tetrachlorobenzene, Theobromine, Theophylline, Toluene, 2-Toluidine, Tranylcypromine, 1,2,4-Trichlorobenzene, 1,1,2-Trichloro-2-fluoroethane, 2,2,2-Trifluoroethanol, 1,2,4-trimethylbenzene, Urethane, Vinylcarbamate, 1,2-, 1,3- and 1,4-Xylene.

緑で示した化学物質(78物質)・・・CYP2E1テンプレートの構築および検証に使用
黒で示した化学物質(47物質)・・・CYP2E1テンプレートの検証のみに使用

<CYP2E1代謝予測モデルによる予測結果>

■ 部位の予測

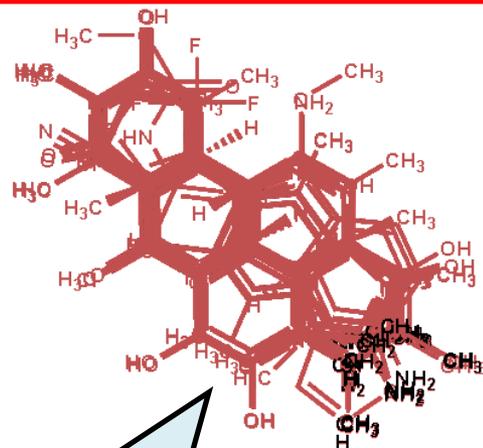
調べたCYP2E1に関連する物質(125)のうち、すべての物質の代謝部位を予測できた。

■ 順位の予測

特定の代謝経路のみ測定されている物質については確定できないが、代謝プロファイルがほぼ確かな物質については、特定の2種の部分構造(ortho-hydroxy/aminotoluene)をもつ物質以外は、代謝部位だけでなく順序が合致していた。

<ヒトCYP1A2テンプレートの構築>

Superposition of chemical structures



First step

⇒ Overlapping of oxidation sites (Black)

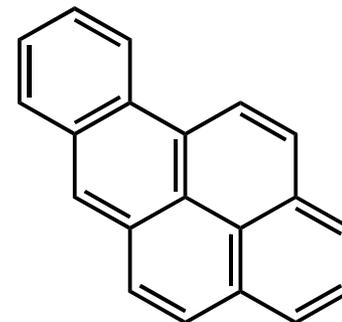
Second step

⇒ Overlapping of whole structures (Brown)

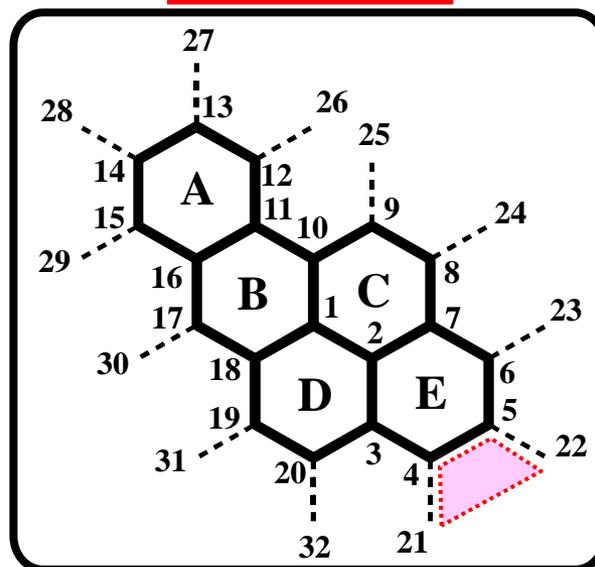
Summarization



Core structure



Template



Benzo[a]pyrene-like shape

＜本手法の利用の効果＞

- 体内解毒能, 蓄積性
 - 代謝物が有害事象に関連する可能性の判断
 - 実験動物データのヒトへの外挿の信頼性
 - 有害事象の発生機序の考察
- これらを支援する有力なツールとなる.

〈代謝関連情報DBの開発:まとめ〉

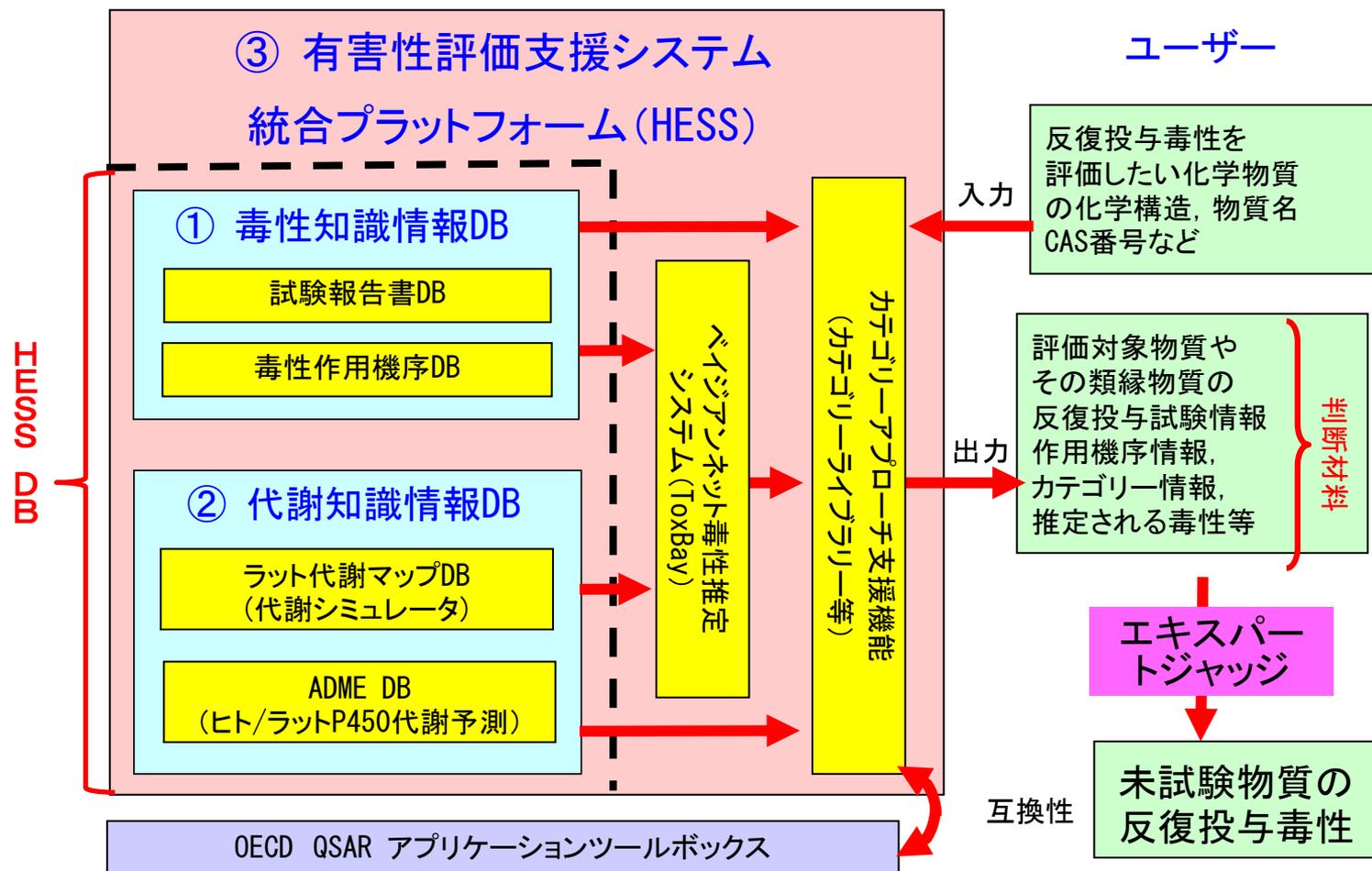
- ヒトへの毒性影響を予測する手がかりを得るため、種差の検討に必要な**代謝・動態情報**に的を絞ったDBを構築.
 - ヒトの薬物代謝酵素とその基質構造に着目した**代謝予測モデル**を構築.
 - 予測モデルを報告書DBに含まれる化合物に適応.
(ポリマーおよび無機化合物を除く)
 - CYP2E1 : 470物質に対して予測を実施し、385物質を基質候補と判定.
 - CYP1A2 : 470物質に対して予測を実施し、246物質を基質候補と判定.
- ⇒470物質中**403物質の予測代謝物を得た.**

ベイジアン・ネットワークを活用した 反復投与毒性予測手法の開発

毒性知識情報データベース及び代謝知識情報データベースを連携し、毒性予測モデルを組み込み、化学構造を入力すると、代謝物情報や、親物質・代謝物の有害性情報、類似化合物の検索及び解析結果や、肝臓への毒性を中心とした予測結果が表示される有害性評価支援システム統合プラットフォームを開発し、公開する。また、ユーザー独自の情報をデータベースに追加することにより、より精度の向上につながる機能を備えたものとする。

「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」

実用的な *in silico* 評価手法が確立されていない反復投与毒性について、*in silico* 評価手法の確立及び評価支援システムを開発することが目的。



関西学院大学での取り組み戦略

- 基本活性構造の抽出（鍵と鍵穴の関係）
 - 開発医薬品での実績
 - Dopamine agonistの場合
 - D1, D2, Dauto agonist 407種から8種のD1 BAS
 - HESS DBはすべて合わせても500化合物
 - 活性構造の抽出結果からは新発見の期待薄
 - 多種の毒性間の関係も重要
 - 専門家への示唆を重視
- ➔ベイジアンネットによる評価システム

診断定義とBAS発掘結果および類似BAS統合

診断	ノード名	診断定義	BAS数 (subBAS数)
溶血性貧血	anemia	赤血球減少 and ヘモグロビン減少	15(18)
肝細胞毒性	liver	GOT上昇またはGPT上昇	20(25)
酵素誘導	LEI	肝細胞肥大	38(30)
脂肪肝	LCM	全コレステロール上昇	31(28)
前胃粘膜上皮刺激性	ulcer	前胃粘膜潰瘍	19(23)
精巣毒性	testis	精巣重量減少	10(12)
腎臓	kidney	全尿素窒素上昇	15(20)
甲状腺毒性	thyroid	甲状腺重量減少	2(2)

計150(158)

類似BASの統合

- 酸性基のないハロゲン化物→貧血, 肝コレステロール代謝異常
- SMARTS構造記述, 疎水性logP, 分子量MWの範囲を調整
- 58種のBASカテゴリーを設定

ToxBayシステム

The screenshot shows the ToxBay web application interface. The main area displays a network graph with nodes and edges. The nodes are color-coded, and the edges are also color-coded. The interface includes a top navigation bar, a left sidebar with a list of categories and endpoints, and a bottom section for BN inference results and conflict analysis. Red callout boxes with white text point to various features:

- [0]connect
- [1]Input SMILES
- help
- [2]estimate/input logP, MW
- [1]net structure no color
- [1]node note by mouse over
- [4]BN inference
- [3]diagnostics
- [6]probability by click
- [3]endpoints
- [5]link color by local conflict
- [5]node color by probability
- [5]conflict analysis
- [6]CPT by double clicking node
- [3]categories

BN inference:
_cm_thr=0.0&cfgpath=D:\toxbay\bnfiles\BAS...
results:
{ "cA":0,"sA":0,"phthalate":0,"arom_phos":0,"oxime":0,"eW_PhOH2":0,"eW_PhOH1":0,"NNH2":0,"_cm":0.2325,"_0level":1,"_0cm":-0.341,"_0node0":"TWD","_1level":1,"_1cm":-0.888,"_1node0":"GPT","_2level":1,"_2cm":-1.121,"_2node0":"KWI" }

BN results
conflict measure: 0.2325
Conflicts:
(3) omit(KWI) evidences ==> conflict measure: -1.121
(2) omit(GPT) evidences ==> conflict measure: -0.888
(1) omit(TWD) evidences ==> conflict measure: -0.341

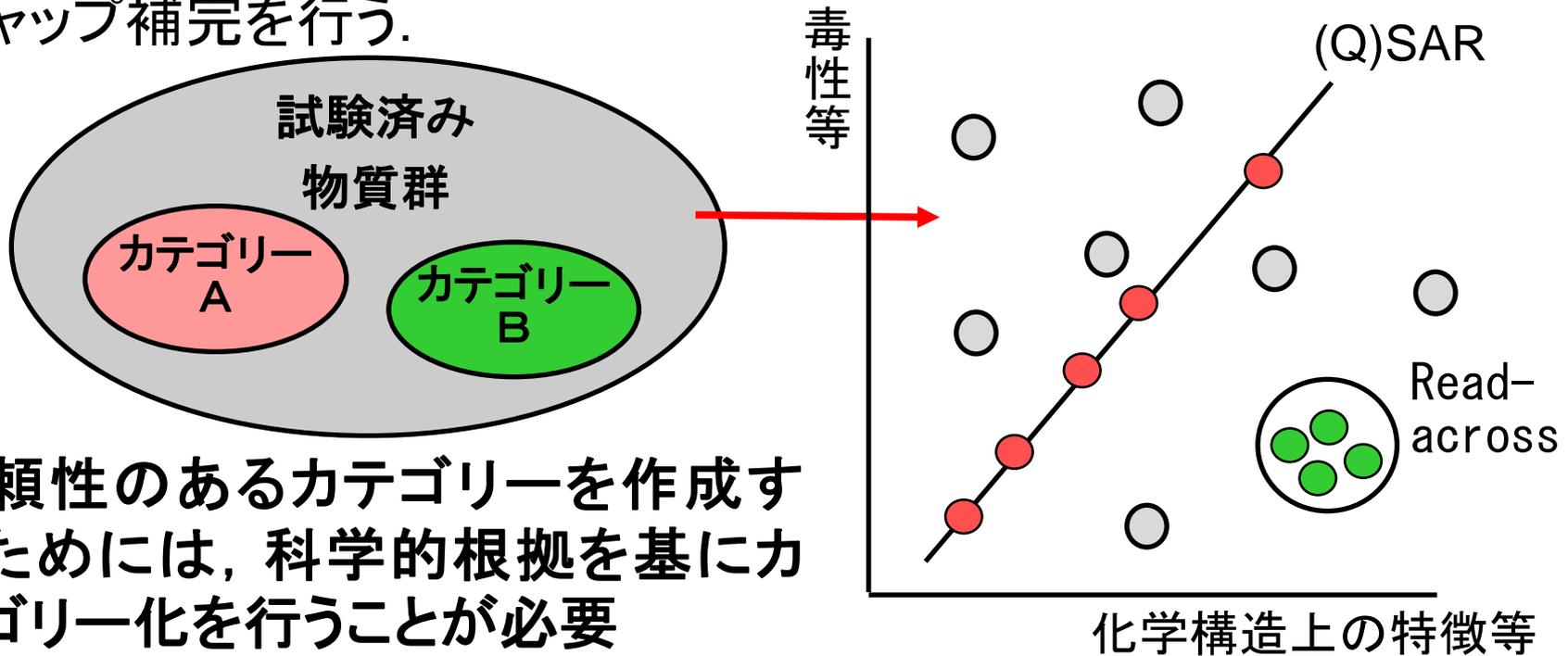
まとめ

- **ToxBayシステムをネットで公開**
- **評価困難な反復投与毒性のリスク評価可能**
- **矛盾にもとづき実験結果を評価可能**
- **試験済み化合物の事例を利用可能**
- **HESSシステム(OECD Application Toolbox)と連携**

反復投与毒性に関するカテ ゴリー化の手法確立

カテゴリーアプローチ*

カテゴリーとは、構造類似性により物理化学的及び毒性学的特性が類似又は規則的なパターンを示すと考えられる化学物質のグループ。構造活性相関[(Q)SARや類推(Read-across)によるデータギャップ補完を行う。



信頼性のあるカテゴリーを作成するためには、科学的根拠を基にカテゴリー化を行うことが必要

透明性の高い評価が可能なことから化学物質管理分野におけるデータギャップ補完手法の主流となっている。 → **複雑なエンドポイントへの拡張が課題**

*OECD. 2007. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 80, Guidance on grouping of chemicals.

反復投与毒性のカテゴリー作成の方針

反復投与毒性におけるAOP



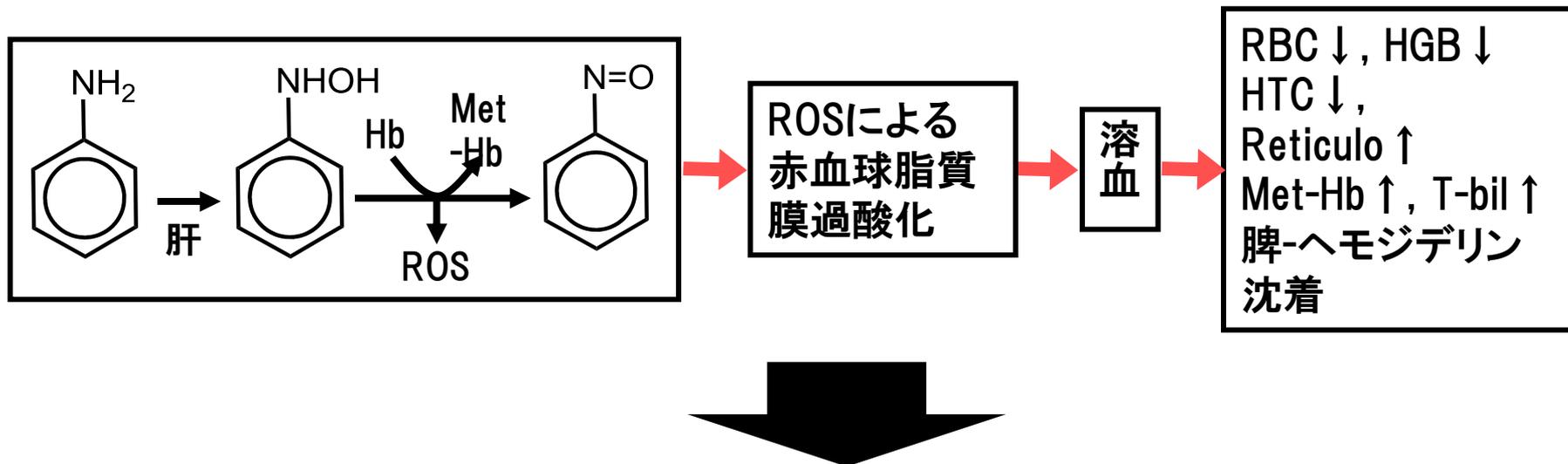
文献情報等から反復投与毒性における
既知のClass Effectに対するAOPを構築

- ① 化学構造上の特徴(反応性, 脂溶性)
 - ② 代謝情報, in vitro試験結果
 - ③ 反復投与毒性試験結果
- 等のエビデンスを検討し, 構築したAOPによる毒性発現
が想定できる物質をカテゴリーメンバーとして規定

アニリン類により誘発される 溶血性貧血に対するAOP

分子→細胞→臓器レベルの作用機序

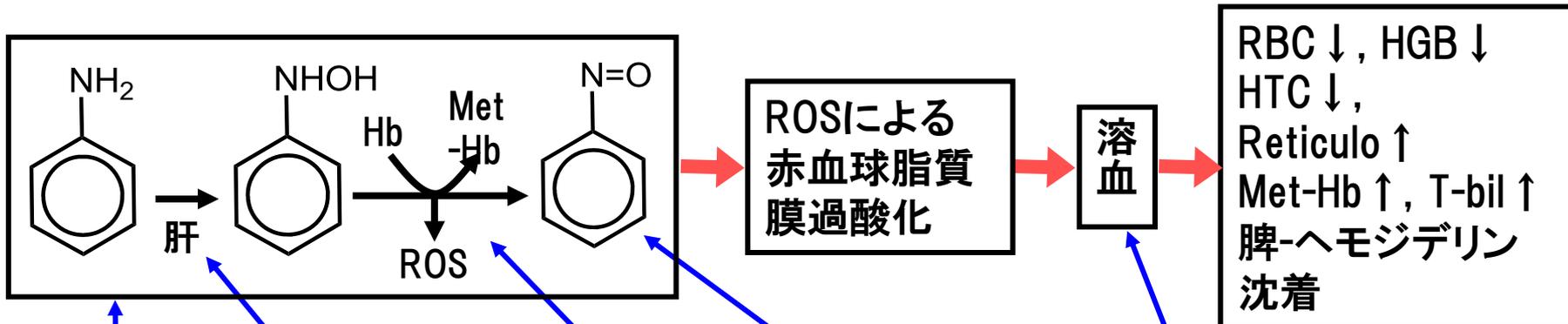
反復投与毒性
所見の組み合わせ



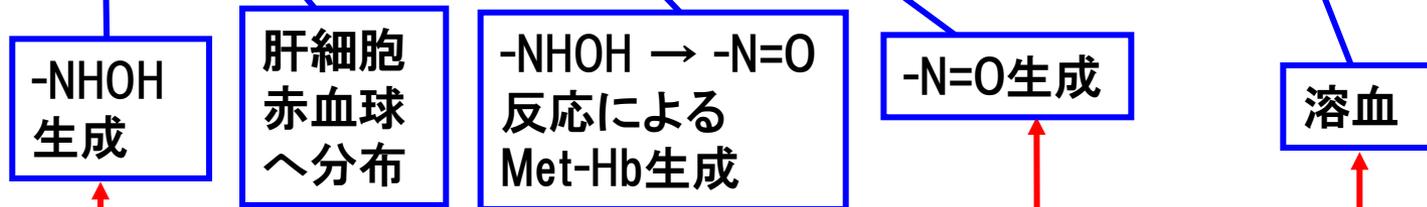
このAOPに基づき反復投与毒性試験において
低用量で溶血性貧血を誘発することが
想定できるアニリン類(カテゴリーメンバー)を調査

カテゴリーメンバーとしてのエビデンス

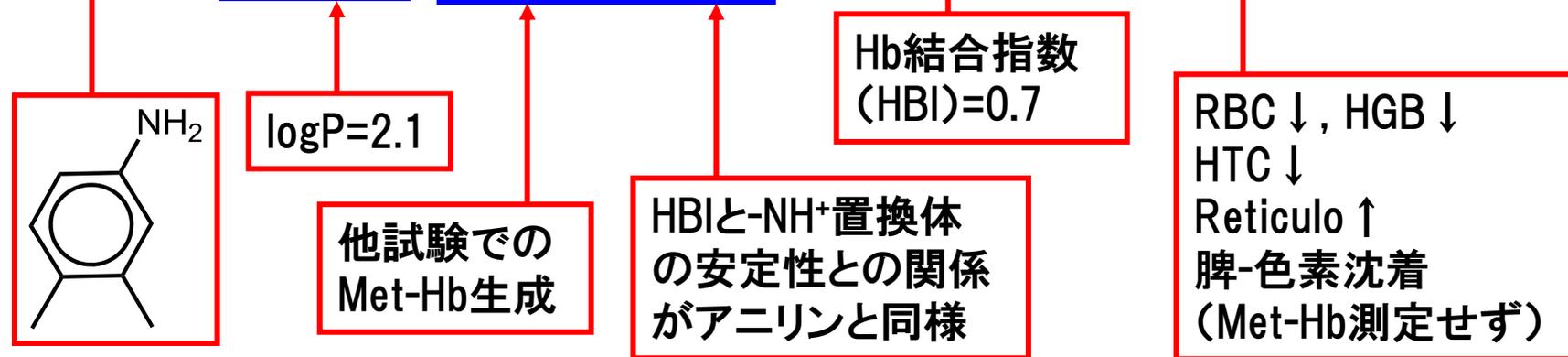
既知の経路



可能性



判断材料



種々の判断材料により、3,4-ジメチルアニリンは、上記のAOPにより溶血性貧血を誘発することが想定できる。

作成したカテゴリー (1)

カテゴリー (影響)	物質数	各影響の LOEL (mg/kg/day)	信頼性ラン ク ranking
Azobenzenes (溶血性貧血)	2	0.6±5.7	B
Imidazole-2-thione derivatives (甲状腺毒性)	2	5.5±5.8	B
Diphenyl disulfides (溶血性貧血)	1	30	B
Hydrazines (溶血性貧血)	2	20±127	B
Acrylamides (神経毒性)	2	21±111	B
Oximes (溶血性貧血)	3	23±7	B
Aliphatic nitriles (肝毒性)	4	33±46	B
Nitrobenzenes (溶血性貧血)	12	54±82	A
Hydroquinones (肝毒性)	2	55±64	B
p-Aminophenols (腎毒性)	2	63±476	B
Phenyl Phosphates (副腎脂質代謝障害)	4	70±34	C
Anilines (溶血性貧血)	18	72±40	A
4,4'-Methylenedianilines/Benzidines (胆管毒性)	5	75±156	B
Aliphatic/Alicyclic hydrocarbons (α 2u-グロブリン腎症)	6	76±100	C
Aromatic Hydrocarbons (肝毒性)	9	83±51	C
N-Alkyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (溶血性貧血)	2	100	B

作成したカテゴリー (2)

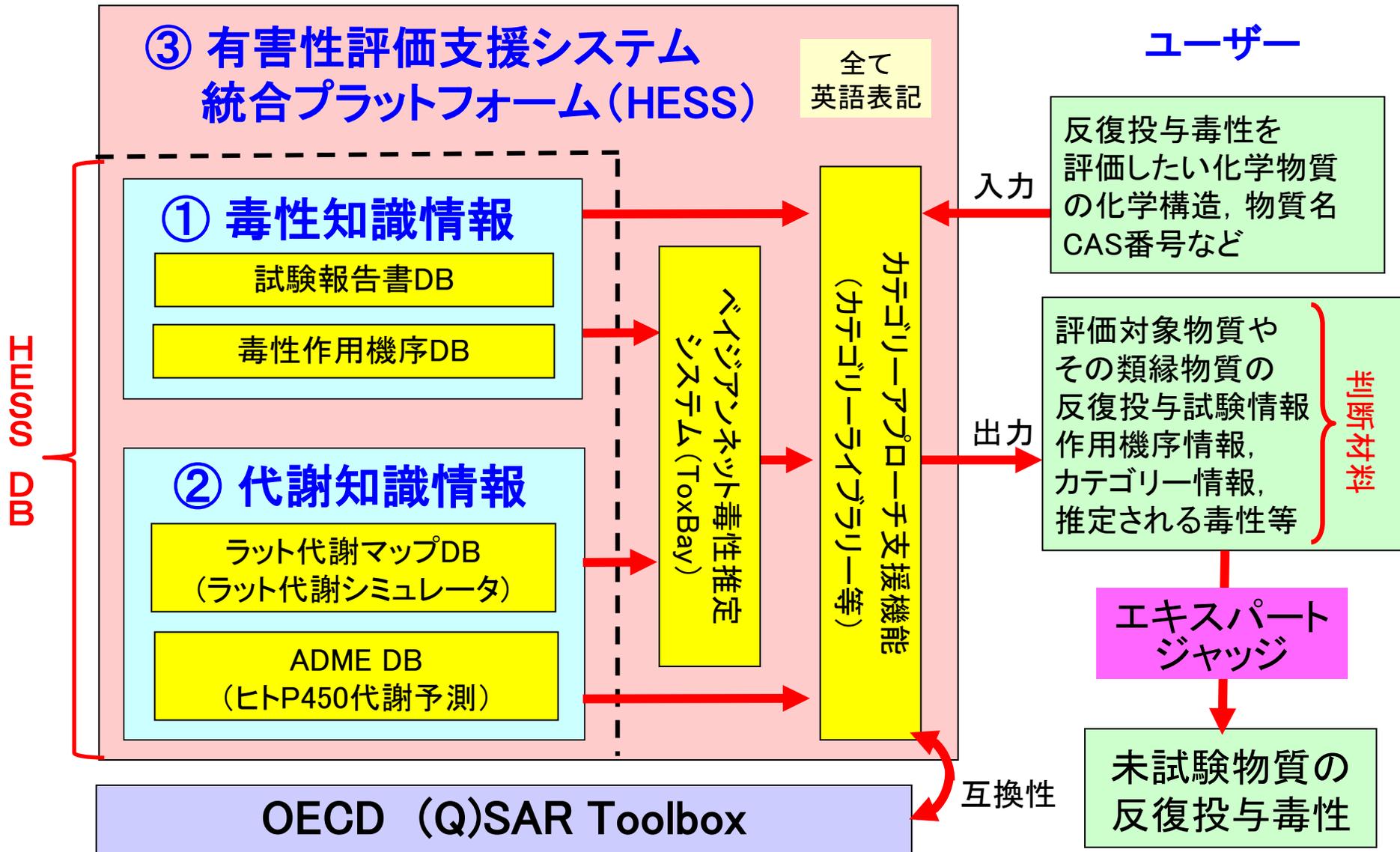
カテゴリー (影響)	物質数	各影響の LOEL (mg/kg/day)	信頼性ラン ク ranking
Halobenzenes (腎毒性)	9	101±79	A
Nitrobenzenes (肝毒性)	12	108±96	C
Ethyleneglycol Alkylethers (溶血性貧血)	5	110±192	A
Organophosphates (神経毒性)	7	116±98	A
Anilines (肝毒性)	18	146±70	C
Aliphatic amines (粘膜刺激)	6	148±202	C
Halobenzenes (肝毒性)	9	151±129	A
Benzene or Naphthalene sulfonic acid (Less susceptible)	13	223±355	C
Ethyleneglycol Alkylethers (精巣毒性)	2	231±2077	B
Nitrobenzenes (精巣毒性)	4	237±278	C
p-Alkylphenols (肝毒性)	7	250±381	A
o-/p-Aminophenols (溶血性貧血)	3	254±606	B
Benzain sulfonamide (尿路障害)	2	310±2414	B
Nitrophenols/Halophenols (ミトコンドリア機能障害)	13	314±218	C
Phenols (粘膜刺激性)	25	405±231	C
Halogenated Aliphatic Compounds (肝毒性)	17	533±756	C
Phthalate esters (精巣毒性)	3	886±1466	C

まとめ

反復投与毒性についてAOPに基づいた信頼性の高いカテゴリー化の実例を初めて示し、カテゴリー化の手法を確立した。この手法を基に500物質の反復投与毒性試験データを解析し33種類のカテゴリーを作成した。

OECD QSAR Toolboxをベースに、カテゴリーアプローチによるデータギャップ補完を反復投与毒性試験に適用できる有害性評価支援システム統合プラットフォーム(HESS)を開発し公開した。

開発システムの構成



NITEのウェブサイトからスタンドアロン版を無料で公開

特許・論文等件数

要素技術	論文数	論文の被引用度数	特許等件数（出願を含む）	特許権の実施件数	ライセンス供与数*1	取得ライセンス料	国際標準への寄与*2
研究開発項目①	10	8	0	0	215 (39)	0	0
研究開発項目②	4	6	0	0		0	0
研究開発項目③	12	23	0	0		0	3
計	26	47	0	0	215 (39)	0	3

*1 括弧内は、このうち海外機関のユーザへのライセンス供与数。

*2 OECDの(Q)SAR Toolbox開発, OECDのカテゴリーアプローチ手法開発, ECHAにおけるREACH届出物質の評価, に対する貢献として。

標準化*のシナリオ

		FY2011 (プロジェクト期間中)	FY2012	FY2013	FY2014	FY2015	
開発システムの公開			試用版公開	正式版公開 (ユーザ対応、定期的なデータ追加を実施)			
		OECD (Q)SAR ToolboxにHESSの一部を搭載					
開発システムの利用	化審法での利用			優先評価化学物質のリスク評価 におけるデータギャップ補完			
				システムへの新規化学物質 試験データの追加	新規物質審査用 参考情報の作成		
	REACHでの利用			試用版指摘点の改良	ECHAによる届出データの評価		
				事業者における システム使用の習熟	事業者による REACH届出データ作成への活用		
	新規物質 開発での 利用				開発新規物質候補の スクリーニング等への活用		

成果の公開方法

解決すべき問題点

成果の利用方法

*ここでいう標準化とは、規格を取得するものではなく、国内外の規制当局等での有害性判断に本プロジェクトの開発システムが日常的に利用されることである。

開発システムの公開

HESS及びHESS DBは、NITE化学物質管理センターのホームページから2012年6月に無料でスタンドアロン版を一般公開した。

<http://www.safe.nite.go.jp/kasinn/qsar/hess.html>

ベイジアンネット毒性予測システム(ToxBay)については、2011年12月にWebサービスによる形態で公開している。

<http://www.dm-lab.ws/ToxBay/index.php?ToxBay>

表. HESS及びHESS DBの登録ユーザー数の内訳 (2012年8月31日現在)

分類	組織数(ユーザー数)	
	国内	海外
化学系企業	88(115)	10(11)
その他の企業	21(21)	9(9)
試験受託機関	8(20)	1(1)
行政機関・大学	15(18)	10(12)
個人	3(3)	6(6)
業界団体	1(3)	1(1)
合計:	136(180)	37(40)

開発システムの運用

公開した開発システムに対する、ユーザーからの問い合わせ随時受け付けている。

基本的な操作方法を習得するための講習会を定期的
に実施している(2012年7月26日, 8月21日に実施. 今
後年度内に更に2回程度実施予定)。

また, 国内外の化学物質規制当局等での利用のため,
定期的なデータの追加(年2回程度)を行う予定として
いる。

国際貢献 (OECD)

カテゴリーアプローチの手法確立に関するOECDのワークショップにおける議論の題材として、本プロジェクトで開発したAOPに基づく反復投与毒性のカテゴリー化の実例を提供した*。本プロジェクトが提供したケーススタディは、AOPの有用性を示す実例として高い評価を受けた。

HESSのツリー構造による反復投与毒性のデータベースは、OECD (Q)SAR Toolbox ver.2に移植され、2010年10月に一般公開された**。また、HESSのカテゴリーライブラリーは、反復投与毒性に関する初めてのプロファイラーとしてOECD (Q)SAR Toolbox ver.3に移植され、2012年10月に一般公開される予定である。

PL , NITE-OECD 間でプロジェクト開発品のOECD (Q)Toolbox提供に関する書簡のやり取りを実施(2011年)

* Hayashi, M. and Sakuratani, Y. 2011. Hemolytic anemia induced by anilines and nephrotoxicity induced by 4-aminophenols. In: OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 138 , Report of the Workshop on Using Mechanistic Information in Forming Chemical Categories: Annex 8.

** <http://www.oecd.org/env/hazard/qsar>

国際貢献 (REACH)

プロジェクト実施期間の最終年度に、欧州のREACHにおける届出物質評価でOECD (Q)SAR Toolboxを活用している欧州化学品庁(ECHA)にHESS試用版のトライアルユースのモニターを依頼した。

ECHAからは、反復投与毒性において透明性の高い手法による評価が実現できたことや、カテゴリーライブラリーの科学的根拠の妥当性について高い評価を得ることができた。HESS正式版は、トライアルユースにおけるECHAの評価結果を反映し完成させた。

現在、HESSのカテゴリーライブラリーは、ECHAにおいてREACHの届出物質の評価に使用されている。

開発システムの利用方法

1) 化審法リスク評価での利用

2013年以降に指定される化審法優先化学物質のデータギャップ補完での利用が見込まれる。

2) 化審法新規審査での利用

他のエンドポイントと同様に審査参考資料としての利用が見込まれる。このためには新規物質のデータの導入が課題と考えられる。

3) REACHでの利用

既に開発システムの一部は、欧州化学品庁(ECHA)においてREACH届出物質の評価に利用されている。

4) 新規物質開発における利用

事業者が自らの所有する試験データの解析結果を用いて開発物質のスクリーニングに利用することが見込まれる。

波及効果

1) 社会への波及効果

未試験化学物質の有害性の推定と、これに基づく合理的な化学物質管理による、安全・安心な国民生活への波及。

2) 経済への波及効果

動物実験の低減による物質開発コストの削減効果。国際整合性のある評価手法を開発したことによる貿易障壁の低減への効果。

3) 他の研究分野への波及効果

開発手法の遺伝毒性、発癌性や生殖発生毒性など、他の有害性試験項目にへの応用等。

4) 国際連携への波及効果

本プロジェクトの活動がきっかけとなり、日本とECHAとの間に化学物質管理全体の技術協力に関するStatement of Intent (SOI) が締結された。

**ものを怖がらなさ過ぎたり、
怖がりすぎるのはやさしいが、
正当に怖がることはなかなかむづかし
い。**

寺田寅彦（近藤宗平）