

OECD QSAR Toolbox の 概要とその活用方法

2017年1月30日

(独)製品評価技術基盤機構

化学物質管理センター

青柳 智子

発表内容

1. QSAR Toolboxの概要
2. QSAR Toolboxの操作手順
3. QSAR Toolboxの活用事例

1. QSAR Toolboxの概要

QSAR Toolboxとは？

- ✓ OECD QSARグループ(「QSAR Toolbox Management Group」)において、開発が進められている。
- ✓ 2008年3月に初公開され、最新版Ver. 3. 4が2016年7月に公開。
- ✓ QSAR Toolboxの大きな特徴は、評価対象物質及び類似物質の情報を容易に収集・比較できること。
- ✓ フリーソフトウェア (OECDのHP上にて公開。ユーザー登録が必要。)

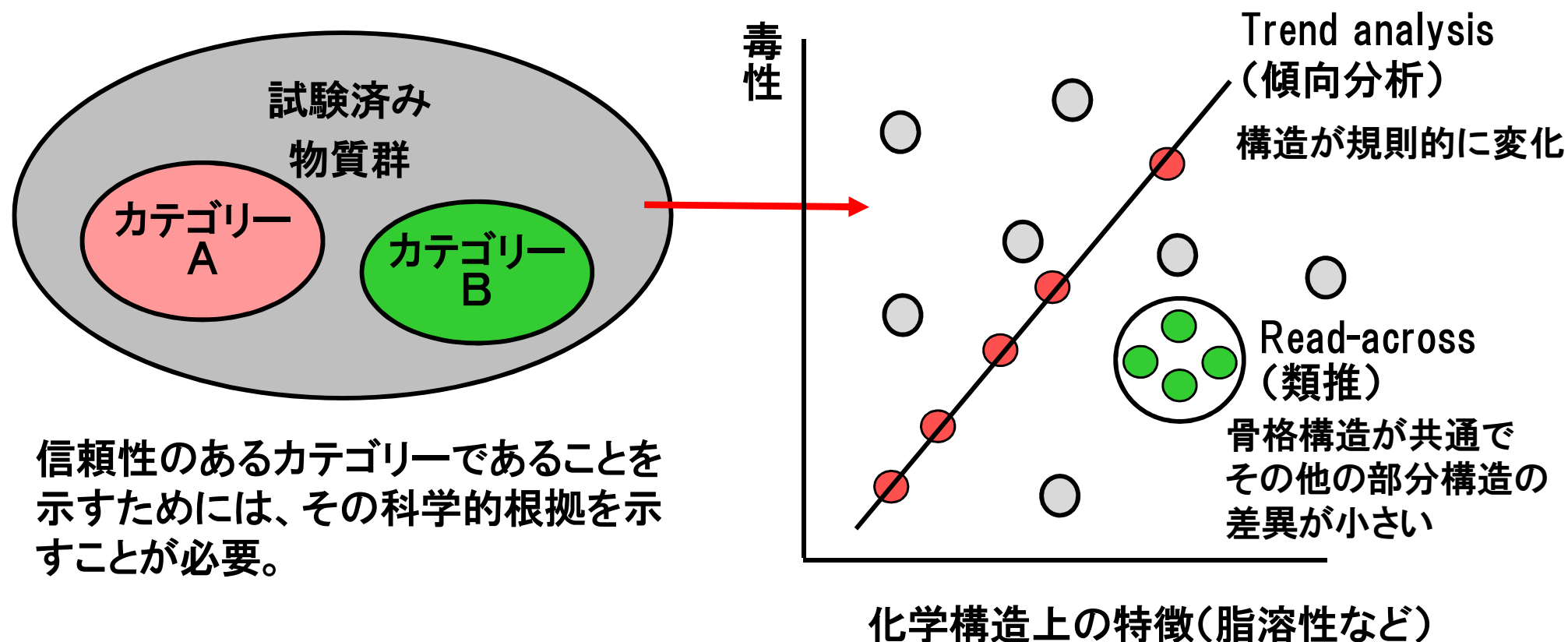
QSAR Toolboxの開発の経緯

- ✓ 2005年頃の開発当初は、各種QSARモデルを集めたライブラリの構築を計画。
- ✓ 開発メンバー間における議論において、QSARモデルの予測結果のみでは行政利用における判断根拠が不十分であるとの認識が高まる。
- ✓ 最終的には、カテゴリーアプローチを支援するためのソフトウェアとして、カテゴリー化の根拠を第三者に明確に示す機能が主体のシステムとして2008年に公開。
- ✓ 2008年に初版、2010年にVer.2、2012年にVer.3公開。

“for Grouping chemicals into categories”

(参考)カテゴリーアプローチとは？

化学物質管理分野において未試験の化学物質の有害性を推定する手段として国際的に推奨されている手法。カテゴリーとは、化学構造が類似し、化学構造上の特徴に対し毒性が規則的なパターンを示す又は類似する物質のグループ*。傾向分析(Trend analysis)や類推(Read-across)によるデータギャップ補完を行う。



QSAR Toolboxの機能概要

- ✓ 蛋白結合やDNA結合などの反応様式に基づき、毒性発現の原因となる部分構造を認識する機能(プロファイラー)と、各国から提供された物理化学的性状、反復投与毒性などの各種エンドポイントの実測試験データのデータベースが実装されている。
- ✓ ユーザーは、プロファイラーにより毒性発現の原因となる共通の部分構造を有する物質群(カテゴリーの候補)を効率よく認識できると共に、それらの物質群の実測試験データを基に毒性発現の傾向を解析することにより、カテゴリーを構築しデータギャップ補完を行うことができる。

QSAR Toolboxでできること

✓ 評価対象物質に対して…

- 実測試験データ(物化性状、環境中運命、生態毒性、ヒト健康影響、代謝データ)の有無を確認できる。
- 実測試験データが見つからない場合には、Profilerを用いたカテゴリーの作成、類似物質の実測試験データの検索、QSARソフトウェアを用いた推計値を算出することができる。
- 代謝物の推定、代謝物に対する毒性評価などを実施できる。
- 評価結果をPDFファイルなどで出力できる。

✓ その他

- ユーザー(インハウス)データを、DBとしてシステムに取り込める。
- DBに格納されたデータのReference情報を確認できる。

最新版(Ver.3.4)の仕様

公開日: 2016年7月5日

公開サイト: <http://www.qsartoolbox.org/>

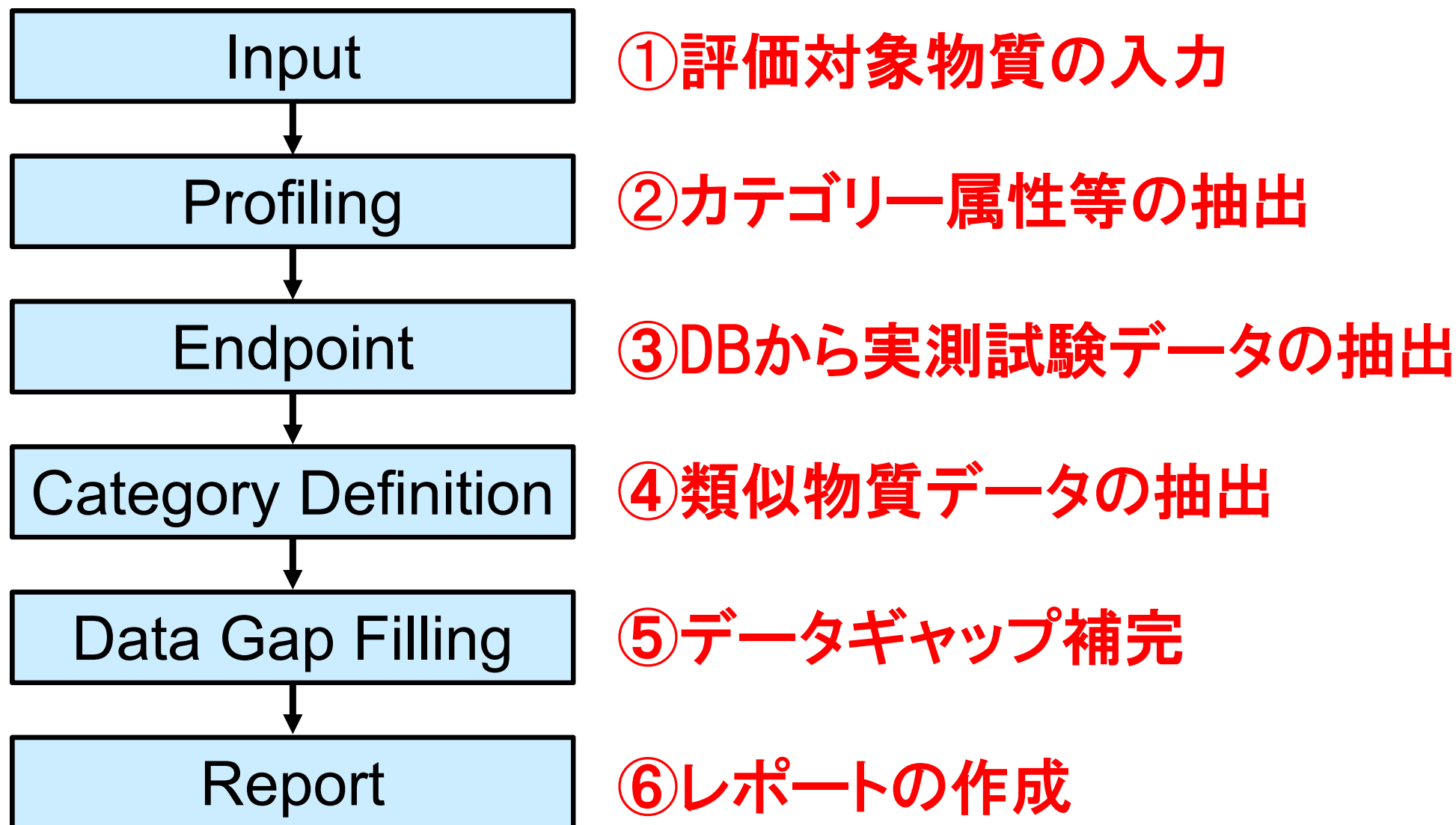
公開形態: サーバ版及びスタンドアロン版(共に無料)

動作環境:

Minimum system requirements	
OS:	Windows XP
CPU:	Core 2 duo at 1.8 GHz or equivalent AMD CPU
RAM:	At least 3GB of RAM
HDD:	14 GB free hard drive space
File system:	NTFS
Recommended system requirements	
OS:	Windows 7 64 bit or newer
CPU:	I5 at 2.4GHz or faster processor or equivalent AMD CPU
RAM:	6 GB of RAM
HDD:	20 GB free hard drive space
File system:	NTFS

2. QSAR Toolboxの操作手順

QSAR Toolboxの操作手順



操作画面

QSAR Toolbox 3.0.0.995 [Document_1]

Document: Single Chemical, Chemical List

Filter endpoint tree...

Documents: Document_1

① Input: 評価対象物質の入力
② Profiling: カテゴリ属性等の抽出
③ Endpoint: 実測試験データの抽出
④ Category Definition: 類似物質のデータの抽出
⑤ Data Gap Filling: データギャップ補完
⑥ Report: レポートの作成

Document_1

① Inputモジュール (評価対象物質の入力)

QSAR Toolbox 3.1.0.21 [Document]

Document

Single Chemical

Chemical List

Document

Documents

Filter endpoint tree...

1 [target]

C(=O)CCCCCC

CH₃

Substance Identity

Physical Chemical Properties

Environmental Fate and Tra...

Ecotoxicological Information

Human Health Hazards

Create Apply

1 Document

単一物質の入力

物質リストの入力

評価対象物質の入力方法

✓ QSAR Toolboxでは、主に3つの方法で検索したい物質を入力することが可能。

① CAS番号

② 物質名

③ 構造入力

検索対象の物質のデータがデータベースに登録されている場合のみ検索可能

検索対象の物質の分子構造をエディタで描画する

② Profilingモジュール (カテゴリー属性等の抽出)

プロファイラー

Profiling methods

- Ionization at pH = 1
- Ionization at pH = 4
- Ionization at pH = 7.4
- Protein binding by OASIS v1.1
- Protein binding by OASIS v1.1
- Protein binding potency
- Superfragments
- Toxic hazard classification by Cramer (original)
- Toxic hazard classification by Cramer (with extension)
- Ultimate biodeg

Endpoint Specific

- Acute aquatic toxicity classification by Verhaar
- Acute aquatic toxicity MOA by OASIS
- Aquatic toxicity classification by ECOSAR
- Bioaccumulation – metabolism alerts

Metabolism/Transformations

Documented

- Observed Mammalian metabolism
- Observed Microbial metabolism
- Observed Rat In vivo metabolism
- Observed Rat Liver 59 metabolism

Simulated

- Autoxidation simulator

Filter endpoint tree...

1 [target]

Structure

Substance Identity

Physical Chemical Properties

Environmental Fate and Tra...

Ecotoxicological Information

Human Health Hazards

Profile

Protein binding by OASIS v1.1

- Schiff base formation
- Schiff base formation >> Schiff...
- Schiff base formation >> Schiff...

プロファイラーに対する属性
(該当するカテゴリー)

実装されているプロファイラー(全54種類)

✓ OECDに参加している国(米国、ドイツ、イタリア、EUなど)や研究者(ブルガス大学、T.W.Schultz)などがプロファイラーを提供。プロファイラーの属性例は次のとおり。

- 分解速度(微生物による分解、加水分解)
- タンパク質(またはDNA)結合性の官能基の有無
- 代謝データの有無(微生物、Ratの*vivo*またはS9、哺乳類の*vivo*または*vitro*)
- 代謝物の構造推定(代謝シミュレータ)
- 毒性の構造アラート(Ames、小核試験、反復投与毒性、発がん性)

プロファイラー例 (タンパク質結合の構造アラート)

Protein binding by OECD (General Mechanistic) - Profiling Scheme Browser


Advanced

Protein binding by OECD - Category definitions

- Protein binding by OECD
 - Acylation
 - Direct Acylation Involving a Leaving group
 - Acetates
 - Acyl halides (including benzyl and carbamoyl derivatives)**
 - Anhydrides
 - Azides
 - Dialkyl phosphonates
 - Phosphonic acid halides
 - Sulphonyl halides
 - Isocyanates and Related Chemicals
 - Carbodiimides
 - Dithiocarbonimidic acid esters
 - Isocyanates
 - Isothiocyanates
 - Ketenes
 - Thiocyanates-Acylation
 - Ring Opening Acylation
 - alpha-Lactams
 - beta-Lactones-Acylation
 - Cyclopropanones
 - Thio-lactones
 - Michael addition
 - Acid imides
 - Acid imides-MA
 - Polarised Alkenes
 - Polarised alkene - aldehydes
 - Polarised alkene - amides
 - Polarised alkene - cyano
 - Polarised alkene - esters
 - Polarised alkene - ketones

Profile Description

Structural alert: Acyl halides (including benzyl and carbamoyl derivatives)



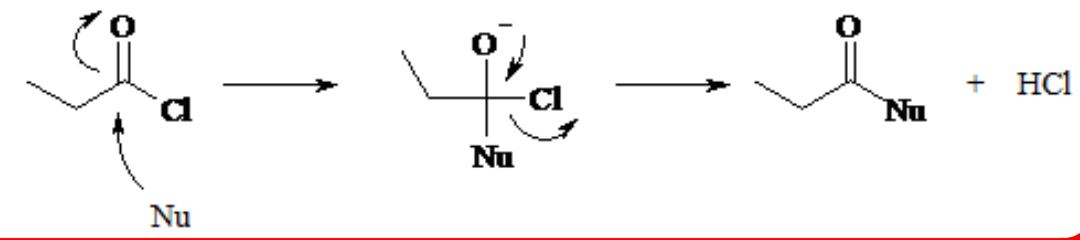
R = any carbon, nitrogen
X (leaving group) = halogen, azide
Y = oxygen, sulphur

アラート構造の条件

メカニズムに関する情報(カテゴリーの根拠)

Mechanism

An acylation mechanism involving nucleophilic attack at the carbonyl (or sulfinyl) has been suggested as being responsible for the activity of these chemicals (Enoch et al 2009, Gerner et al 2004, Hulzebos et al 2005, Roberts et al 2007).



17

(参考)QSAR Toolbox ver.3.4のプロファイラー例

分類	プロファイラー名 (提供者)	概要
Pre defined	Database Affiliation (ブルガス大学)	ToolboxのDBへの属性
	Inventory Affiliation (ブルガス大学)	各国インベントリへの属性
	OECD HPV Chemical Categories (OECD)	OECDHPVプログラムのカテゴリー
	Substance type (ブルガス大学)	単体、混合物、高分子、構造不定の分類
	US-EPA New Chemical Categories (US EPA)	USEPAの新規物質のカテゴリー
General Mechanistic	BioHC half-life (Biowin) (US EPA)	石油炭化水素の生分解半減期
	Primary biodeg (Biowin4) (US EPA)	初期分解時間
	Biodeg probability (Biowin1/2/5/6/7) (US EPA)	良分解性の確率
	Biodeg probability (Biowin3) (US EPA)	究極分解時間
	DNA binding by OASIS v.1.1 (ブルガス大学)	DNA結合
	DNA binding by OECD (ECHA,OECD)	DNA結合
	DPRA Cysteine peptide depletion (T.W.Schultz)	システインペプチドとの反応性(皮膚感作性)
	DPRA Lysine peptide depletion (T.W.Schultz)	リジンペプチドとの反応性(皮膚感作性)
	Estrogen Receptor Binding (T.Schultz)	エストロゲン受容体結合
	Hydrolysis half-life(Ka/Kb,ph7/8) (Hydrowin) (US EPA)	加水分解半減期
	Hydrolysis half-life(pH6.5-7.4) (ブルガス大)	加水分解半減期
	Ionization at pH=1/4/7.4/9 (ChemAxon)	イオン化度
	Protein binding by OASIS v1.1 (ブルガス大学,L'Oreal, ExxonMobil,P&G,Uniliver,国際化粧品原料安全研究機関, Dow Chemical, デンマーク国立食品研)	蛋白結合
	Protein binding by OECD (ECHA,OECD)	蛋白結合
	Protein binding potency (T.W.Schultz)	蛋白結合(グルタチオンとの反応性)
	Super fragment extraction module (BioByte)	極性基の近接作用による超フラグメント
Toxic hazard classification by Cramer (original/with extensions) (ブルガス大)	経口投与の有害性クラス	
Ultimate biodeg (ブルガス大)	生分解半減期	

(参考)QSAR Toolbox ver.3.4のプロファイラー例

分類	プロファイラー名 (提供者)	概要
Endpoint Specific	Acute aquatic toxicity classification by Verhaar (ブルガス大)	水生生物急性毒性の分類
	Acute aquatic toxicity MOA by OASIS (ブルガス大)	水生生物急性毒性のモードオブアクション
	Aquatic toxicity classification by ECOSAR (US EPA)	水生生物毒性ケミカルクラス
	Bioaccumulation-metabolism (US EPA)	代謝速度を算出する際のフラグメント
	Bioaccumulation-metabolism half-lives (US EPA)	代謝半減期
	Biodegradation fragments(BioWIN MITI) (US EPA)	生分解性を算出する際のフラグメント
	Carcinogenicity(genotox and nongenotox>alerts by ISS (伊国衛研、JRC)	発癌性構造アラート
	DNA alerts for AMES,MN and CA by OASIS v.1.1 (ブルガス大学)	DNA構造アラート(AMES試験、小核試験、染色体異常試験)
	Eye irritation/corrosion Exclusion rules by BfR (独リスク評価研)	眼刺激性/腐食性除外ルール
	Eye irritation/corrosion Inclusion rules by BfR (独リスク評価研)	眼刺激性/腐食性適用ルール
	in vitro mutagenicity(Ames test>alerts by ISS (伊国衛研、JRC)	エームス試験構造アラート
	in vivo mutagenicity(Micronucleus>alerts by ISS (伊国衛研、JRC)	小核試験構造アラート
	Keratinocyte gene expression (T.Schultz)	ケラチノサイト遺伝子発現(皮膚感作性)
	Oncologic Primary Classification (US EPA)	発癌性の分類
	Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS v1.1 (ブルガス大学)	蛋白結合(皮膚感作性)
	rtER Expert System ver.1 (US EPA)	鱒エストロゲン受容体
Skin irritation/corrosion Exclusion rules by BfR (独リスク評価研)	皮膚刺激性/腐食性除外ルール	
Skin irritation/corrosion Inclusion rules by BfR (独リスク評価研)	皮膚刺激性/腐食性適用ルール	
Empiric	Chemical elements (ブルガス大)	元素
	Groups of elements (ブルガス大)	元素のグループ(アルカリ金属等)
	Lipinski Rule Oasis (ブルガス大)	リピンスキールール
	Organic functional groups (/nested) (ブルガス大)	部分構造(/官能基を除外)
	Organic functional groups (US EPA)	部分構造(KOWWINのフラグメント)
	Organic functional groups,Norbert Haider (checkmol) (ウィーン大)	部分構造
	Tautomers unstable (ブルガス大学)	不安定なトートマー
Toxicological	Repeated Dose HESS (NEDO/METI)	反復投与毒性のカテゴリー

③ Endpointモジュール (DBから実測試験データの抽出)

データベース

Endpoint

選択したデータベースから
実測試験データを抽出

Structure:

- Cell(s)
- Development
- Enzyme(s)
- Feeding Behavior
- Genetics
- Growth
 - EC10
 - EC25
 - EC50
 - IGC50
 - 48 h
 - Protozoa
 - Ciliophora
 - Ciliatea
 - Tetrahymena pyriformis* (1/1) M: 152 mg/L

- LOEC
- MATC
- NOEC

実装されているデータベース(全62種類)

- ✓ OECDに参加している国(日本、米国、ドイツ、イタリア、EUなど)や研究者(ブルガス大学、Fraunhofer研究所、リバプールJM大学)などが提供。主要なエンドポイントは次のとおり。
 - 物化性状(沸点、融点、分配係数、解離定数など)
 - 環境運命・輸送(生分解性、生物蓄積性、光分解速度、加水分解速度など)
 - 生態毒性(水生生物、陸生生物)
 - ヒト健康影響(急性毒性、変異原性、皮膚感作性、反復投与毒性など)

(参考)QSAR Toolbox ver.3.4のデータベース(1)

	データベース名 (提供者)	主な試験; 対象物質等	物質数
物 化 性 状	Chemical Reactivity COLIPA (欧州化粧品工業会)	ペプチド反応性	359
	ECHA CHEM (ECHA)	沸点, 融点, 分配係数, 解離定数, 水溶解度他; REACH届出データ	6895
	Experimental pKa (リバプールJM大)	解離定数	14715
	GSH Experimental RC50 (Unilever, 国際QSAR財団、 テネシー大学)	グルタチオン反応性	1469
	Phys-chem EPISUITE (SRC)	沸点, 融点, 分配係数, 解離定数, 水溶解度	25990
環 境 運 命 ・ 輸 送	Bioaccumulation Canada (カナダ環境省)	生物蓄積(水生生物); カナダDSL	499
	Bioaccumulation fish CEFIC LRI (CEFIC)	生物蓄積(水生生物); Gold Standard DB	539
	Bioconcentration NITE (NITE)	生物蓄積(水生生物); 化審法既存点検データ	767
	Biodegradation in soil OASIS (ブルガス大)	生分解(土壌)	215
	Biodegradation NITE (NITE)	生分解(汚泥); 化審法既存点検データ	1373
	Biota-Sediment Accumulation Factor (US EPA)	生物相-底質濃縮係数	311
	ECHA CHEM (ECHA)	生分解(汚泥,土壌), 光分解, 生物蓄積 (水生生物), 土壌吸着係数, ヘンリー定数, 加水分解半減期他; REACH届出データ	6895
	ECOTOX (US EPA)	生物蓄積(水生生物、陸生生物)	8093
	Hydrolysis rate constant OASIS (ブルガス大)	加水分解速度定数	341
	kM database Environment Canada (カナダ環境省)	kM: 代謝変換速度定数	702
Phys-chem EPISUITE (SRC)	光分解性, 生物濃縮(水生生物), 土壌 吸着係数, ヘンリー定数	25990	
生 態 毒 性	Aquatic ECETOC (ECETOC)	生態毒性(水生生物)	734
	Aquatic Japan MoE (国環研)	生態毒性(水生生物); 化審法既存点検データ	464
	Aquatic OASIS (ブルガス大)	生態毒性(水生生物)	2390
	ECHA CHEM (ECHA)	生態毒性(水生生物, 陸生生物, 堆積物); REACH届出データ	6895
	ECOTOX (US EPA)	生態毒性(水生生物、陸生生物)	8093

(参考)QSAR Toolbox ver.3.4のデータベース(2)

	データベース名 (提供者)	主な試験; 対象物質等	物質数
ヒト健康影響	Acute Oral Toxicity database (ChemIDPlus DB)	急性毒性(LD50)	10154
	Bacterial mutagenicity ISSSTY (伊国衛研)	遺伝子突然変異	7367
	Carcinogenic Potency Database (UCバークレー)	発癌性	1530
	Carcinogenicity&mutagenicity ISSCAN (伊国衛研)	発癌性	1148
	Cell Transformation Assay ISSCTA (伊国衛研)	細胞形質転換試験	368
	Dendritic cells COLIPA (欧州化粧品工業会)	樹状細胞成熟	262
	Developmental & Reproductive Toxicity (DART, P&G)	生殖毒性、発生毒性	716
	Developmental toxicity ILSI (ILSI)	発生毒性	193
	ECHA CHEM (ECHA)	急性毒性, 発生毒性, 遺伝毒性, 免疫毒性, 神経毒性, 反復投与毒性, 生殖毒性, 感作性他, REACH届出データ	6895
	Estrogen Receptor Binding Affinity OASIS (ブルガス大)	エストロゲン受容体結合	1460
	Eye Irritation ECETOC (ECETOC)	眼刺激性	128
	Genotoxicity OASIS (ブルガス大)	遺伝子突然変異、染色体異常	7930
	Human Half-Life(J A Arnot)	ヒトにおける総排出及び生体内変換の半減期	1105
	Keratinocyte gene expression Givaudan (Givaudan)	角化細胞遺伝子発現	323
	Keratinocyte gene expression LuSens	角化細胞遺伝子発現	79
	Micronucleus ISSMIC (伊国衛研, スイス衛生局)	小核試験	564
	Micronucleus OASIS (ブルガス大)	小核試験	557
	MUNRO non-cancer EFSA (欧州食品安全機関)	反復投与毒性	610
	Rep Dose Tox Fraunhofer ITEM (独Fraunhofer研)	反復投与毒性	615
	Repeated Dose Toxicity HESS (NEDO, 経産省)	反復投与毒性; 化審法既存点検データ他	686
Rodent Inhalation Toxicity Database (国際QSAR財団)	急性吸入毒性(げっ歯類)	206	
Skin Irritation (蘭国衛研, ECVAM, ECETOC, リバプールJM大)	皮膚刺激性	354	

(参考)QSAR Toolbox ver.3.4のデータベース(3)

	データベース名 (提供者)	主な試験; 対象物質等	物質数
ヒト健康影響	Skin sensitization (Unilever; P&G, ExxonMobil, OECD)	皮膚感作性	1242
	Skin sensitization ECETOC (ECETOC)	皮膚感作性	39
	ToxCastDB (US EPA)	50%活性化濃度	1858
	Toxicity Japan MHLW (国衛研)	急性毒性, 遺伝子突然変異, 染色体異常, 小核試験; 化審法既存点検データ	252
	ToxRefDB US-EPA (US EPA)	反復投与毒性, 発生毒性, 生殖毒性; 農薬	406
	Yeast estrogen assay database (テネシー大)	エストロゲン受容体遺伝子発現	213
	ZEBET database(独連邦消費者健康保護・獣医学研究)	in vitro細胞毒性(IC50)、急性毒性	362

④ Category Definition モジュール (類似物質データの抽出)

プロファイラー

類似物質

選択したプロファイラーに対し評価対象物質と同じカテゴリーに属する物質が類似物質として認識され、その実測試験データが抽出される

Structure	1 [target]	2	3	4
<ul style="list-style-type: none"> [-] Growth <ul style="list-style-type: none"> [+] EC10 (1/1) [+] EC25 (1/1) [+] EC50 (8/22) <ul style="list-style-type: none"> [+] 48 h <ul style="list-style-type: none"> [-] Protozoa <ul style="list-style-type: none"> [-] Ciliophora <ul style="list-style-type: none"> [-] Ciliata <ul style="list-style-type: none"> <i>Tetrahymena pyriformis</i> (73/73) M: 152 mg/L [+] LOEC [+] MATC [+] NOEC [+] NOEL [+] Undefined Endpoint [+] Histology [+] Hormone(s) (1/2) [+] Immobilisation (6/6) [+] Immunological (2/4) [+] Intoxication (14/74) [+] Morphology (3/7) [+] Mortality (87/942) M: 17.8 mg/L, 9.79 ... M: >10 mg/L, >10 ... M: 4.65 mg/L, 4.6 ... M: 12 mg/L, 8.86 m... 				

⑤ Data Gap Filling モジュール (データギャップ補完) (1)

QSAR Toolbox 3.1.0.21 [Document]

QSAR TOOLBOX

Input Profiling Endpoint Category Definition **Data Gap Filling** Report

The OECD QSAR Toolbox for Grouping Chemicals into Categories
Developed by LMC, Bulgaria

Data Gap Filling Method

- Read-across
- Trend analysis
- (Q)SAR models

Target: Endpoint

Ecotoxicological Information Aquatic Toxicity Growth IGC50 48 h
Protozoa Ciliophora Ciliata Tetrahymena pyriformis

Filter endpoint tree...

Structure

- Growth
 - EC10 (1/1)
 - EC25 (1/1)
 - EC50 (8/22)
 - IGC50
 - 48 h
 - Protozoa
 - Ciliophora
 - Ciliata
 - Tetrahymena pyriformis (73/73)
 - LOEC (1/5)
 - MATC (1/5)
 - NOEC (6/13)
 - NOEL (1/1)
 - Undefined Endpoint (2/10)
 - Histology (4/14)
 - Hormone(s) (1/2)
 - Immobilisation (6/6)
 - Immunological (2/4)
 - Intoxication (14/74)
 - Morphology (3/7)
 - Mortality (87/942)

1 [target]	2	3	4
M: 152 mg/L	M: 59.4 mg/L	M: 10.9 mg/L	M: 114 mg/L

対象とするエンドポイントについて
類似物質の試験データから予測

⑤ Data Gap Filling モジュール (データギャップ補完) (2)

QSAR Toolbox 3.1.0.21 [Document]

QSAR TOOLBOX

Input Profiling Endpoint Category Definition **Data Gap Filling** Report

The OECD QSAR Toolbox for Grouping Chemicals into Categories
Developed by LMC, Bulgaria

Filling
Apply

Data Gap Filling Method

- Read-across
- Trend analysis
- (Q)SAR models

Target Endpoint

Ecotoxicological Information Aquatic Toxicity Growth IGC50 48 h Protozoa Ciliophora Ciliata Tetrahymena pyriformis

Filter endpoint tree... 1 [target] 2 3 4

Structure

Tetrahymena pyriformis (73/74)

<chem>CCCCCCCC=O</chem>	<chem>O=C1C=CC=CC=C1</chem>	<chem>O=C1C=CC=CC=C1</chem>	<chem>CCCCCCCC=O</chem>
M: 152 mg/L T: 73.7(18.4;294) m	M: 59.4 mg/L	M: 10.9 mg/L	M: 114 mg/L

Descriptors Prediction Adequacy Cumul. freq. Statistics Residuals

Trend analysis prediction of IGC50, making a linear approximation, based on 72 values from 72 analogue chemicals, Observed target value: 152 mg/L, Predicted target value: 73.7 mg/L, Model equation: $IGC50 = -2.61 + 0.412 * \log Kow, \log(1/mg/L)$

Descriptor X: log Kow

Accept prediction
Return to matrix

- Select/filter data
- Selection navigation
- Gap filling approach
- Descriptors/data
- Model/(Q)SAR
- Calculation options
- Visual options
- Information

必要に応じてサブカテゴリー化する。

⑥ Reportモジュール

The screenshot displays the QSAR Toolbox 3.1.0.21 software interface. The title bar reads "QSAR Toolbox 3.1.0.21 [Document]". The main menu bar includes "Input", "Profiling", "Endpoint", "Category Definition", "Data Gap Filling", and "Report", with the "Report" button highlighted by a red rectangle. Below the menu bar is a toolbar with icons for "Create", "Print", "Close", "Save as", "Register", "Unregister", "Update", "Clone", and "Design".

The interface is divided into several panels:

- Available data to report:** Shows a list of predictions, including "[1] 04.02.2013 19:51 [T]: 73.7(18.4;294) mg/L; Estimat".
- Available report templates:** Lists templates under "Standard (predefined)" and "Custom (user defined)". The "Standard (predefined)" section includes "QSAR Toolbox Prediction Report (TPRF v.3.1)".
- Prediction [1]:** The main content area displays the report content, starting with "Prediction of IGC50 for hexanal" and "1 / 29". The main heading is "QSAR Toolbox prediction for single chemical".

The report content includes the following text:

The template of the current report is based on "GUIDANCE DOCUMENT ON THE VALIDATION OF (QUANTITATIVE) STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS MODELS" published by OECD (September, 2007) and "GUIDANCE ON INFORMATION REQUIREMENTS AND CHEMICAL SAFETY ASSESSMENT / CHAPTER R.6: QSARS AND GROUPING OF CHEMICALS" published by ECHA (May, 2008).

The report provides information about the target substance, chemical characteristics used for the grouping, the resulting boundaries of the group of chemicals (applicability

The status bar at the bottom shows the file path: "128 Schiff base formation<AND>Schiff base formation >> Schiff base formation wi".

3. QSAR Toolboxの活用事例

HESSとは

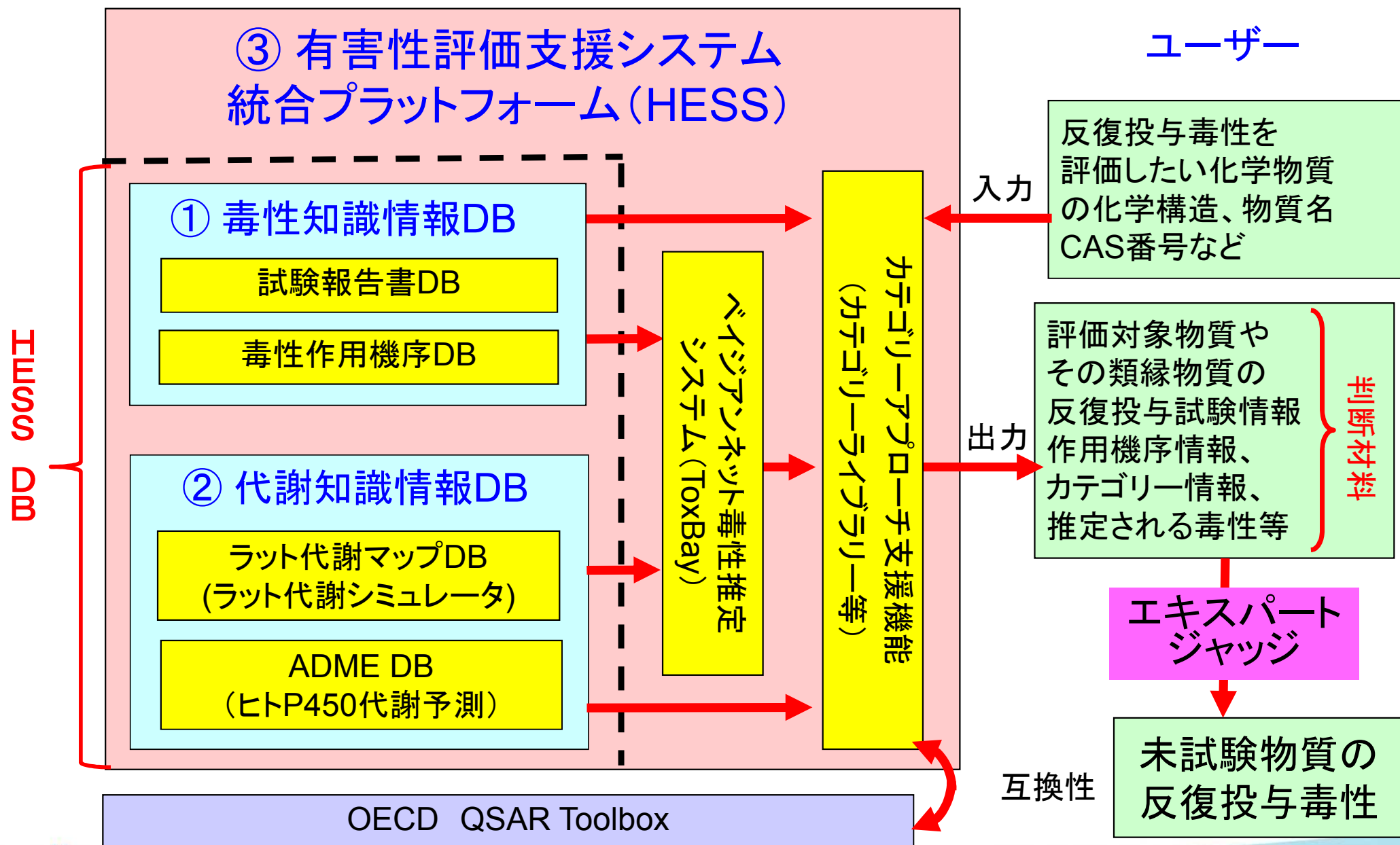
- ✓ NEDO/経済産業省委託事業により、NITE及び富士通株式会社が受託・開発。
- ✓ 平成23年度から無料でNITEのHP上に公開。

概要: 化学物質のリスク評価におけるヒト健康影響の評価に際し、安全性試験データがない化学物質に対し、類似化学物質の反復投与毒性試験データやその他の既知見を用いて、カテゴリアプローチ等の手法により反復投与毒性を推定できるよう必要となる判断材料を評価者(専門家)に提供するデータベース及び評価支援システム。

- **専門家の判断をサポートするためのシステム**
- **毒性、病理の専門家の主導によるシステム**
- **国際的に利用されるシステム(OECDと連携)**

URL : <http://www.nite.go.jp/chem/qsar/hess.html#download>

HESSの構成



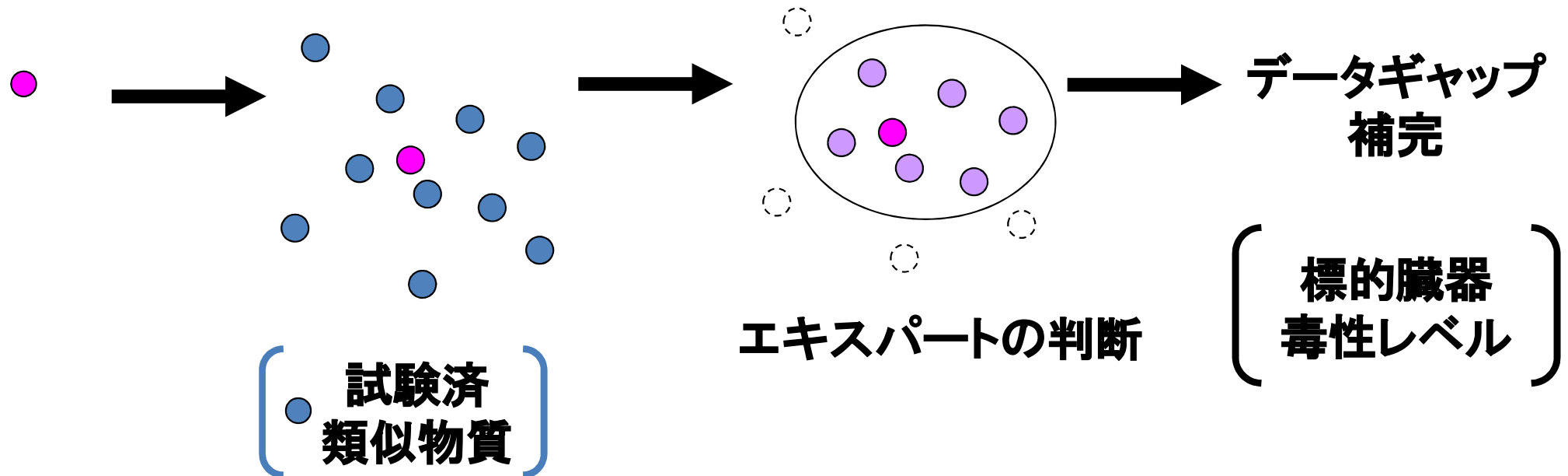
反復投与毒性のカテゴリーアプローチ

未試験
物質

試験済の類似物質
を収集

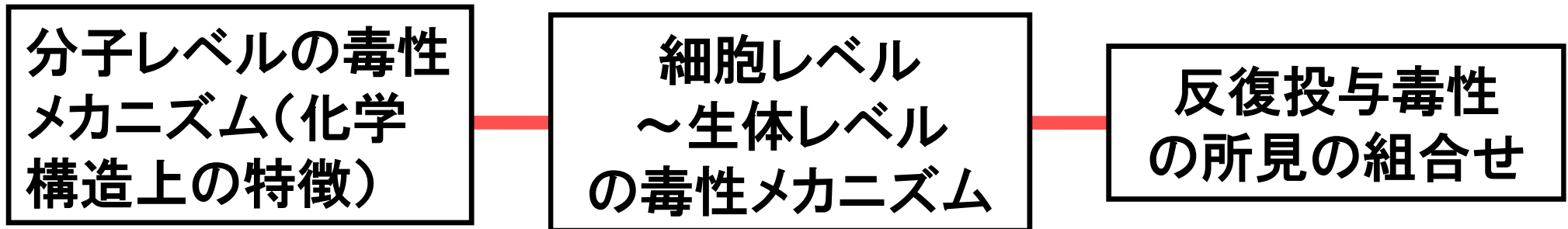
カテゴリー化

毒性予測



HESSカテゴリー作成の方針

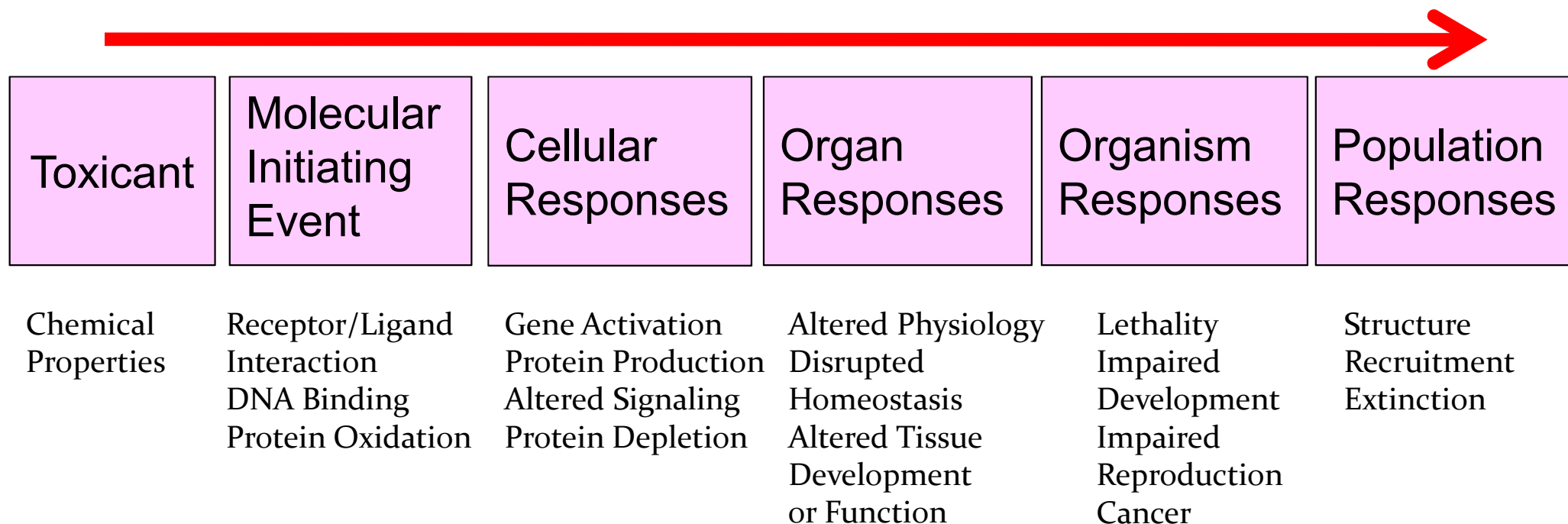
反復投与毒性におけるAdverse Outcome Pathwayを下記のように定義し、共通のAOPが想定できる物質群をカテゴリーとして捉える*。



- ✓ 毒性・病理専門家の知見を基に、発現毒性の類似性を検討。
- ✓ HESS DB開発で集積・整理された詳細な情報をAOP作成の根拠として活用。

*Hayashi, M. and Sakuratani, Y. 2012. 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.

(参考) Adverse Outcome Pathway (AOP)*



AOPとは、分子レベルのトリガーとなる反応から、細胞レベル、生体レベルのメカニズムを経て、最終的な毒性発現に至るまでの経路を示したもの。現バージョンのツールボックスで対応できていない有害性発現メカニズムが複雑なエンドポイントについては、AOPに基づいてカテゴリー作成するコンセプトがOECDから提案され、最近、活発的に議論がなされている。

*OECD. 2011. 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.

HESSのカテゴリー作成の手順

- ① **特定の毒性における作用機序の調査及びAOPの作成**
特定の物質群に対し特定の毒性傾向が知られている物質を調査し（文献情報）、AOPを作成する。
- ② **反復投与毒性試験データとの比較**
当該試験条件における毒性強度の構造依存性（官能基、脂溶性等）を確認。
- ③ **カテゴリー領域の定義**
②において強く毒性が発現することが認められた構造領域を定義。

作成した反復投与毒性カテゴリー (1)

Category (effect)	Number of category members	LOEL for target effect (mg/kg/day)	Reliability ranking
Azobenzenes (Hemolytic anemia)	2	0.6±5.7	B
Imidazole-2-thione derivatives (Thyrotoxicity)	2	5.5±5.8	B
Diphenyl disulfides (Hemolytic anemia)	1	30	B
Hydrazines (Hemolytic anemia)	2	20±127	B
Acrylamides (Neurotoxicity)	2	21±111	B
Oximes (Hemolytic anemia)	3	23±7	B
Aliphatic nitriles (Hepato toxicity)	4	33±46	B
Nitrobenzenes (Hemolytic anemia)	12	54±82	A
Hydroquinones (Hepatotoxicity)	2	55±64	B
p-Aminophenols (Renal toxicity)	2	63±476	B
Phenyl Phosphates (Lipidosis of adrenocortical cells)	4	70±34	C
Anilines (Hemolytic anemia)	18	72±40	A
4,4'-Methylenedianilines/Benzidines (Hepatobiliary toxicity)	5	75±156	B
Aliphatic/Alicyclic hydrocarbons (Alpha 2u-globulin nephropathy)	6	76±100	C
Aromatic Hydrocarbons (Hepato toxicity)	9	83±51	C
N-Alkyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (Hemolytic anemia)	2	100	B

作成した反復投与毒性カテゴリー (2)

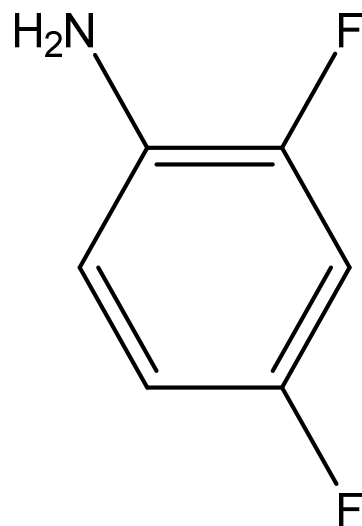
Category (effect)	Number of category members	LOEL for target effect (mg/kg/day)	Reliability ranking
Halobenzenes (Renal toxicity)	9	101±79	A
Nitrobenzenes (Hepato toxicity)	12	108±96	C
Ethyleneglycol Alkylethers (Hemolytic anemia)	5	110±192	A
Organophosphates (Neurotoxicity)	7	116±98	A
Anilines (Hepato toxicity)	18	146±70	C
Aliphatic amines (Mucous membrane irritation)	6	148±202	C
Halobenzenes (Hepato toxicity)	9	151±129	A
Benzene or Naphthalene sulfonic acid (Less susceptible)	13	223±355	C
Ethyleneglycol Alkylethers (Testicular toxicity)	2	231±2077	B
Nitrobenzenes (Testicular toxicity)	4	237±278	C
p-Alkylphenols (Hepatotoxicity)	7	250±381	A
o-/p-Aminophenols (Hemolytic anemia)	3	254±606	B
Benzain sulfonamide (Toxicity to urinary system)	2	310±2414	B
Nitrophenols/Halophenols (Mitochondrial dysfunction)	13	314±218	C
Phenols (Mucous membrane irritation)	25	405±231	C
Halogenated Aliphatic Compounds (Hepato toxicity)	17	533±756	C
Phthalate esters (Testicular toxicity)	3	886±1466	C

カテゴリーの信頼性のランク付け

信頼性ランク	A	B	C
メカニズム情報	Molecular Initiating Event からの毒性発現のメカニズムが説明されているもの。	Molecular Initiating Event からの毒性発現のメカニズムが説明されているもの。	Molecular Initiating Event からの毒性発現のメカニズムは説明されていないが、特定の構造的特徴を持つ物質に対し特定の毒性を発現することが文献等で報告されているもの。
構造領域	反復投与毒性試験データが多くの物質に対し得られており、反復投与毒性試験データを根拠に毒性が発現する構造領域を定義することが可能であるもの	反復投与毒性試験データが多くの物質に対し得られておらず、反復投与毒性試験データを根拠に毒性が発現する構造領域を定義することはできないが、in vitro試験等の別の試験の文献情報を根拠に毒性が発現する構造領域を定義できるもの	反復投与毒性試験データが多くの物質に対し得られており、反復投与毒性試験データを根拠に毒性が発現する構造領域を定義することが可能であるもの

OECD QSAR Toolboxの操作実演

データ収集及び 反復投与毒性の予測

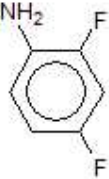


対象物質: CAS:367-25-9
2,4-ジフルオロアニリン

- ✓ データ収集: HESS及びECHA CHEMデータベースを用いたデータ収集
- ✓ 反復投与毒性の予測: HESSのカテゴリーアプローチを用いたRat反復投与毒性試験LOELの予測

評価対象物質の入力

The screenshot displays the QSAR Toolbox software interface. The main menu bar includes options for Input, Profiling, Endpoint, Category Definition, Data Gap Filling, and Report. The 'Input' button is highlighted with a red box and a circled '1'. Below the menu bar, the 'CAS#' field is highlighted with a red box and a circled '2'. A search dialog box titled 'Search by CAS #' is open, showing the input '367-25-9' and a 'Search' button. A yellow callout bubble points to the input field with the number '367259'. The search results table is shown below the dialog box, with the first entry selected. The table columns are Selected, CAS, Smiles, Depiction, Names, CAS/Name, 2D/Name, and CAS/2D. The first entry is '1. Yes' with CAS '367-25-9', Smiles 'Nc1ccc(F)', and a depiction of a benzene ring with an amino group and two fluorine atoms. The 'Names' column contains a list of categories: 1: High C, 2: DS, 3: EC, 4: EC, 5: EII, 6: Ge, 7: Ph, 8: RE, 2: High C, 1: Ac, 2: NT. The 'CAS/Name' and '2D/Name' columns also contain category names like '1: Ba', '1: EC', '2: RE', '3: Ph', '4: EII', '5: DS', '6: Ba', '7: Ge', '8: EC', '1: TS', '2: NT'. The 'CAS/2D' column contains 'High C'.

Selected	CAS	Smiles	Depiction	Names	CAS/Name	2D/Name	CAS/2D
1. Yes	367-25-9	Nc1ccc(F)		1: High C 2: DS 3: EC 4: EC 5: EII 6: Ge 7: Ph 8: RE 2: High C 1: Ac 2: NT	1: Ba 1: EC 2: RE 3: Ph 4: EII 5: DS 6: Ba 7: Ge 8: EC 1: TS 2: NT	High C	

カテゴリー属性等の抽出

QSAR Toolbox 3.4.0.17 [Document]

QSAR TOOLBOX

Input Profiling Endpoint Category Definition Data Gap Filling Report

Profiling Schemes

Apply New View Delete

Profiling methods

Select All Unselect All Invert About

- Eye irritation/corrosion Inclusion rules by BfR
- in vitro mutagenicity (Ames test) alerts by ISS
- in vivo mutagenicity (Micronucleus) alerts by ISS
- Keratinocyte gene expression
- Oncologic Primary Classification
- Protein binding alerts for Chromosomal aberration by OASIS
- Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS v1.4
- Respiratory sensitisation
- Retinoic Acid Receptor Binding
- rER Expert System ver. 1 - USEPA
- Skin irritation/corrosion Exclusion rules by BfR
- Skin irritation/corrosion Inclusion rules by BfR

Empiric

- Chemical elements
- Groups of elements
- Lipinski Rule Oasis
- Organic Functional groups
- Organic Functional groups (nested)
- Organic functional groups (US EPA)
- Organic functional groups, Norbert Haider (checkmol)
- Tautomers unstable

Toxicological

- Repeated dose (HESS)

Metabolism/Transformations

Select All Unselect All Invert About

Documented

- Observed Mammalian metabolism
- Observed Microbial metabolism
- Observed Rat In vivo metabolism
- Observed Rat Liver S9 metabolism

Simulated

- Autoxidation simulator
- Autoxidation simulator (alkaline medium)
- Dissociation simulation
- Hydrolysis simulator (acidic)
- Hydrolysis simulator (basic)

Structure

1 [target]

Anilines (Hemolytic)
Anilines (Hepatotoxic)

Structure Identity
Physical Chemical Properties
Environmental Fate and Transport
Ecotoxicological Information
Human Health Hazards
Profile
Toxicological
Repeated dose (HESS)

評価対象物質はアニリンの溶血性貧血及び肝毒性カテゴリーに該当することを確認。
→クリックし、溶血性貧血のカテゴリーレポートを確認。

QSAR Toolbox 3.0.0.291 alpha [Document_1]

QSAR TOOLBOX

Input Profiling Endpoint Category Definition Data Gap Filling Report

Profiling Profiling Schemes

Apply New View Delete

The OECD QSAR Toolbox for Grouping Chemicals into Categories developed by LMC, Bulgaria

カテゴリーレポート

Repeated dose (HESS) (Toxicological) - Profiling Scheme Browser

Advanced

Repeated dose (HESS) - Category definitions

- Repeated dose (HESS)
 - 2-Imidazolidinethiones (Thyrototoxicity) Rank B
 - 4,4'-Methylenedianilines/Benzidines (Hepatobi)
 - Acrylamides (Neurotoxicity) Rank C
 - Aliphatic amines (Mucous membrane irritation)
 - Aliphatic nitriles (Hepato toxicity) Rank A
 - Aliphatic/Alicyclic hydrocarbons (Alpha 2u-glob)
 - Anilines (Hemolytic anemia with methemoglobi**
 - Anilines (Hepato toxicity) Rank C
 - Azobenzenes (Hemolytic anemia with methem)
 - Benzene/Naphthalene sulfonic acids (Less sus)
 - Benzenesulfonamides (Toxicity to Urinary Sys)
 - Diphenyl Disulphides (Hemolytic anemia with n)
 - Ethyleneglycol Alkylethers (Hemolytic anemia)
 - Ethyleneglycol Alkylethers (Testicular toxicity)
 - Halobenzenes (Hepato toxicity) Rank C
 - Halobenzenes (Renal toxicity) Rank C
 - Halogenated Aliphatic Compounds (Hepato to)
 - Hydrazines (Hemolytic anemia with methemog)
 - N-Alkyl-N'-phenyl-p-phenylenediamine (Hemol)
 - Nitrobenzenes (Hemolytic anemia with methem)
 - Nitrobenzenes (Hepato toxicity) Rank C
 - Nitrobenzenes (Testicular toxicity) Rank C
 - Nitrophenols/Harophenols (Energy metabolism)
 - o-/p-Aminophenols (Hemolytic anemia with me)

Profile Description

Anilines (Hemolytic Anemia with methemoglobinemia) Rank A

1. Toxicity Information

The toxicant of methemoglobinemia induced by anilines is considered to be N-hydroxyl anilines that are metabolites of anilines in the liver^{1,2}. The hemolytic anemia induced by anilines is considered to be related to the oxidation of erythrocyte by N-hydroxyl anilines^{3, 4}.

- 1) Anilines are metabolized in hepatocytes by oxidases such as P450 to N-hydroxyl anilines.
- 2) N-hydroxyl anilines react with hemoglobin (HGB) in erythrocyte to produce nitrosoaniline and methaemoglobin (Met-HGB). As a result, increase of the concentration of methaemoglobin (Met-HGB) is observed in hematological examination.
- 3) Erythrocytes are degenerated (peroxidation of lipid membrane etc.) by reactive oxygen species (ROS) produced in the above reaction³.
- 4) Phagocytosis of degenerate erythrocytes mainly in the spleen

Profiling methods

Select All Unselect All Invert

Carcinogenicity (genotox and nongenotox)
 Eye irritation/corrosion Exclusion rules by B
 Eye irritation/corrosion Inclusion rules by B
 in vitro mutagenicity (Ames test) alerts by
 in vivo mutagenicity (Micronucleus) alerts b
 Oncologic Primary Classification
 Skin irritation/corrosion Exclusion rules by B
 Skin irritation/corrosion Inclusion rules by B

Empiric

Chemical elements
 Groups of elements
 Lipinski Rule Oasis
 Organic Functional groups
 Organic functional groups (US EPA)
 Organic Functional groups(nested)
 Organic functional groups, Norbert Haider
 Tautomers_unstable

Toxicological

Repeated dose (HESS)

Metabolism

Select All Unselect All Invert

Documented

Observed Liver metabolism
 Observed Mammalian metabolism
 Observed Microbial metabolism

Simulated

Autoxidation simulator
 Dissociation simulation
 Hydrolysis (Acidic) Simulator

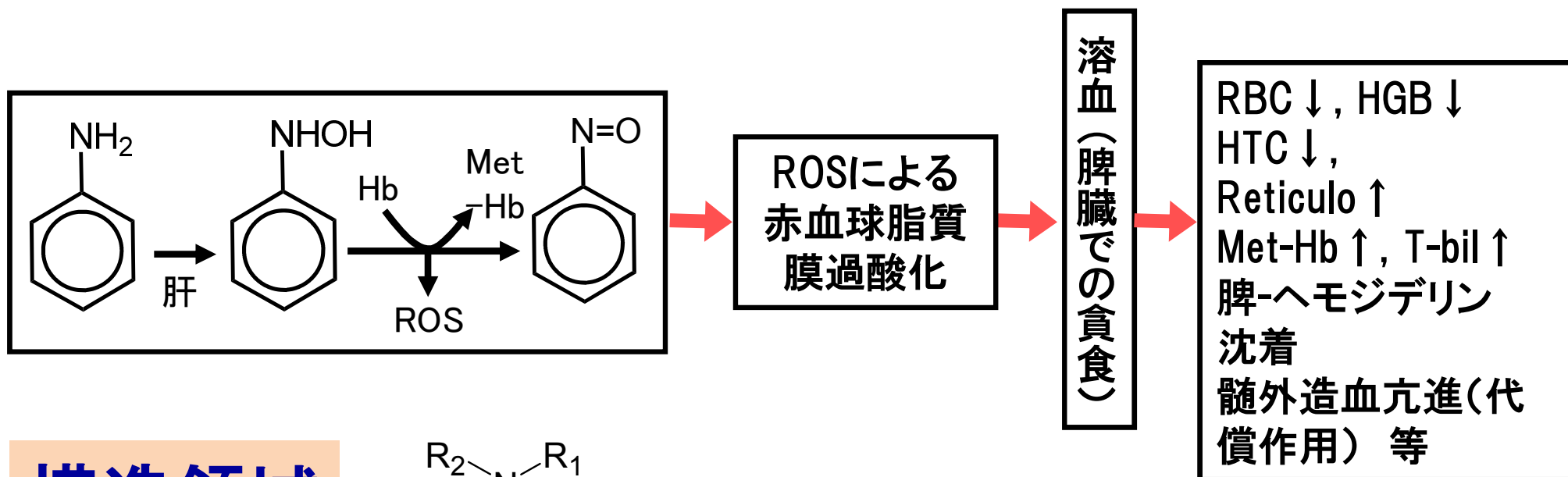
カテゴリーレポートには、カテゴリー(今回の場合はアニリンの溶血性貧血)の作成根拠である毒性メカニズム、文献情報、試験済みの物質の情報などが記載されている。 ※HESSのカテゴリーライブラリーは、ECHAがREACH届出物質の評価等において活用している。

(例)アニリン類の溶血性貧血カテゴリー

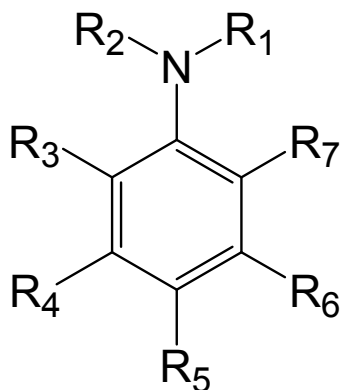
AOP

分子→細胞→生体レベルの毒性メカニズム

関連する
反復投与毒性所見



構造領域



R₁, R₂ = H, methyl or ethyl.

R₃ ~ R₇ = H, alkyl, halo, alkoxy, NO₂ or NH₂.

実測試験データの抽出

① “Endpoint”を選択する。

② “Databases”の中から、検索に使用するデータベースを選択する。
(今回は、“Human Health Hazards”の下にある“Repeated Dose Toxicity HESS”及び“ECHA CHEM”を選択する。)

③ “Gather”をクリック。

④ “Data”というポップアップが表示され、「選択したデータベースからのみデータを引用します」という意味のメッセージが表示され、“OK”をクリック。

QSAR TOOLBOX

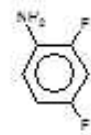
Databases

Select All Unselect All Invert About

- Physical Chemical Properties
- Environmental Fate and Transport
- Ecotoxicological Information
- Human Health Hazards
 - Acute Oral Toxicity database (ChemIDPlus)
 - Bacterial mutagenicity ISSSTY
 - Carcinogenic Potency Database (CPDB)
 - Carcinogenicity&mutagenicity ISSCAN
 - Cell Transformation Assay ISSCTA
 - Dendritic cells COLIPA
 - Developmental & Reproductive Toxicity (D)
 - Developmental toxicity ILSI
 - ECHA CHEM
 - ECOTOX
 - Estrogen Receptor Binding Affinity OASIS
 - Eye Irritation ECETOC
 - Genotoxicity OASIS
 - Human Half-Life
 - Keratinocyte gene expression Givau
 - Keratinocyte gene expression LuSer
 - Micronucleus ISSMIC
 - Micronucleus OASIS
 - MUNRO non-cancer EFSA
 - Rep Dose Tox Fraunhofer ITEM
 - Repeated Dose Toxicity HESS
 - Rodent Inhalation Toxicity Database
 - Skin Irritation
 - Skin sensitization

1 [target]

Structure



Substance Identity
 Physical Chemical Properties
 Environmental Fate and Transport
 Ecotoxicological Information
 Human Health Hazards
 Profile

- Toxicological
 - Repeated dose (HESS)

Information

There are no experimental data available for the chemicals of interest.

OK

Anilines (Hemolytic...
Anilines (Hepatotox...)

“No data found”と表示され、選択したDBには“2, 4-ジフルオロアニリン”の反復投与毒性の実測試験データがないことがわかった。そこで、以降の手順において類似物質の試験データを用いてデータギャップ補完を試みる。

類似物質データの抽出

①

The screenshot shows the QSAR Toolbox 3.4.0.17 interface. The 'Category Definition' menu item is highlighted with a red box and a circled '1'. The 'Define' button in the top toolbar is also highlighted with a red box and a circled '3'. In the 'Grouping methods' list on the left, 'Repeated dose (HESS)' under the 'Toxicological' category is highlighted with a red box and a circled '2'. The main window displays a table of results for 71 similar substances, with the first four columns showing chemical structures and the remaining columns showing numerical values for various toxicity endpoints. A red bracket highlights the 'Repeated dose (HESS)' row in the table, with a red arrow pointing to a yellow callout box containing instructions.

類似物質の抽出結果

類似物質(71物質)

各所見に対する値

① “Category Definition”を選択する。
 ② “Grouping methods”の中の
 “Toxicology”の下にある“Repeated
 dose(HESS)”を選択する。
 ③ “Define”をクリック。

データギャップ補完

① “Data Gap Filling”を選択する。

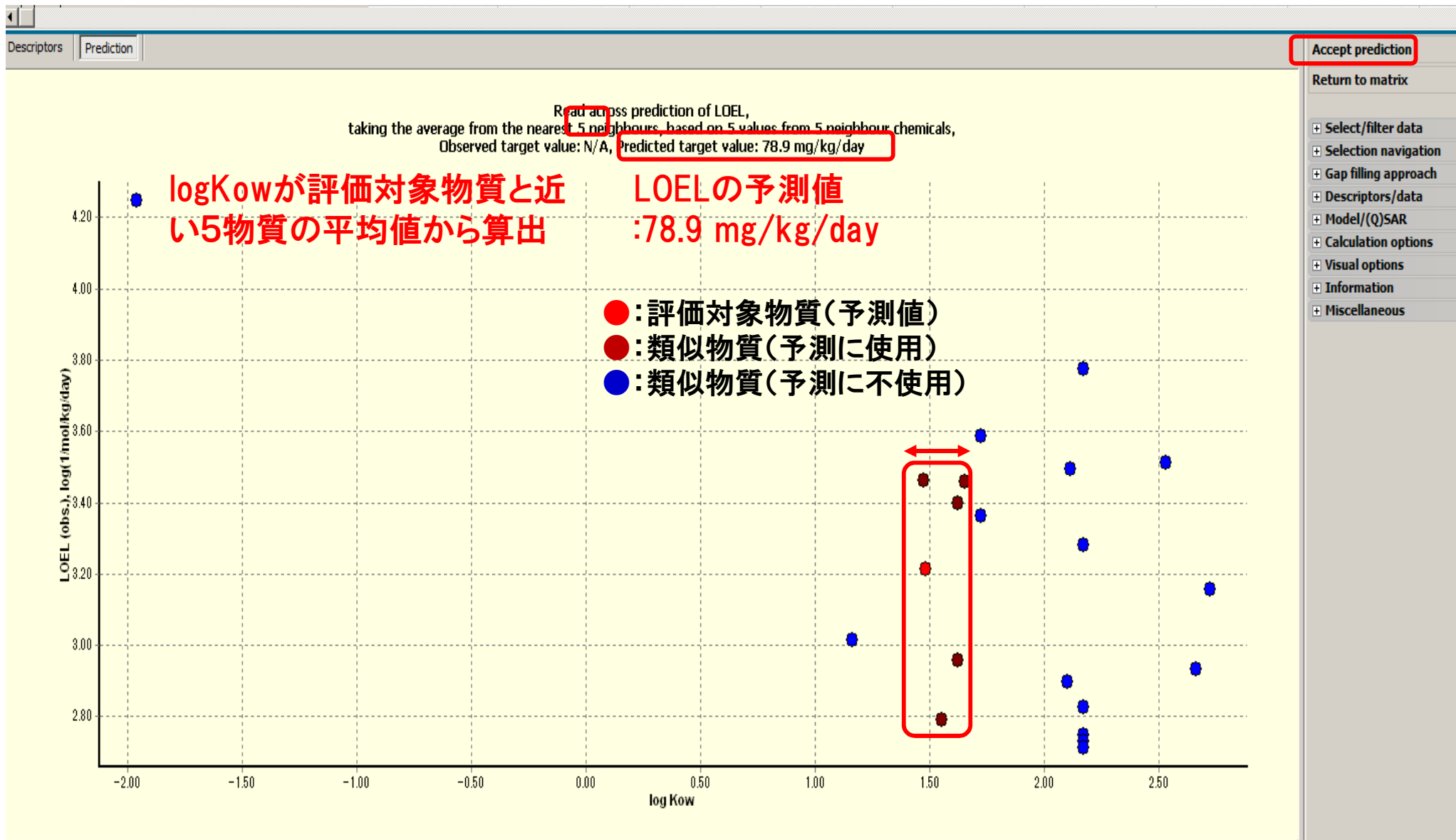
② 予測したいエンドポイントのセルを選択する。(今回はRATのLOEL。)

③ “Read across”を選択。

④ “Apply”をクリック。

Structure	1 [target]	2	3
<chem>Nc1ccc(F)c(F)c1</chem>	<chem>Nc1ccc(Cl)cc1</chem>	<chem>CC(=O)c1ccccc1</chem>	
Physical Chemical Properties			
Environmental Fate and Transport			
Ecotoxicological Information			
Human Health Hazards			
Acute Toxicity	(15/78)	M: 1E3 mg/kg, >4...	M: 1.35E3 mg/kg
Chronic Toxicity	(1/2)		
Reproductive Toxicity	(3/5)	M: 10 mg/kg bw/da...	M: 365 mg/kg bw
Developmental Toxicity	(16/87)	M: (Not converted: ...	M: (Not convertec
Genotoxicity	(12/37)		M: not irritating, r
Immunotoxicity	(2/2)		M: 0.3 mg/m³ air
Neurotoxicity	(6/11)	M: 10 mg/kg bw/da...	M: 31.3 mg/kg bw
Respiratory Toxicity	(21/95)	M: 160 mg/kg/day, ...	M: 10 mg/kg/day
Skin Sensitization	(1/1)		
Systemic Toxicity	(3/10)		
Target Endpoint			
Human Health Hazards Repeated Dose Toxicity LOEL Rat			

予測に使用する類似物質の確定と予測結果



予測の信頼性は毒性強度の分布に依存する。→利用目的に応じて指標を考慮。

レポートの作成

① “Report”を選択する。

② “Prediction”の中の対象のデータを選択する。

③ “Create”をクリック。

Available data to report

Prediction [1]
redictions [1] 28.12.2016 18:17 [R]: 78.9(31.9; 195) mg/kg/day; Estimation for LOEL f

Available report templates

- Standard (predefined)
 - QSAR Toolbox Prediction Report (TPRF v.3.4)
- Custom (user defined)
 - Editable copy of QSAR Toolbox Prediction Report (TPRF v.3.4)

QSAR Toolbox prediction for single chemical

... of the current report is based on "GUIDANCE DOCUMENT ON THE USE OF (QUANTITATIVE) STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS MODELS" (OECD (September, 2007) and "GUIDANCE ON INFORMATION ON CHEMICAL SAFETY ASSESSMENT / CHAPTER R.6: QSARS AND CHEMICALS" published by ECHA (May, 2008). ... provides information about the target substance, chemical characteristics, grouping, the resulting boundaries of the group of chemicals (applicability, type of data gap filling approach that was applied (read-across, trend analysis, QSAR models), the predicted result(s) and in the Annex information about the category members or training set and test set chemicals. ... The chemicals are ordered by the distance to the target substance within the descriptors space. Only chemicals with experimental data are listed as category...

参考情報

QSAR Toolbox トレーニング資料

- ✓ Toolboxは、評価の目的やエンドポイントにより活用方法は様々。目的に適した活用方法を各自で検討可能。

OECD QSAR ToolboxのHP

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm>

Guidance Documents and Training Materials for Using the Toolbox

The manuals of the QSAR Toolbox can be downloaded from the following table:

Title
IUCLID 5 Import/Export via Webservices (PDF) version 1.1; February 2011
Guidance document for using the OECD (Q)SAR Application Toolbox to develop chemical categories according to the OECD Guidance on Grouping of Chemicals (PDF) 2009
Database Import Wizard (PDF) version 1.0; April 2011
Tips and tricks (PDF) version 1.1; February 2011
Strategies for grouping chemicals for data gap filling for acute aquatic toxicity endpoints (PDI) version 1.1; July 2013
Strategies for grouping chemicals to fill data gaps to assess genetic toxicity and genotoxic carcinogenicity (PDF) version 1.1, July 2013

Training materials for the Toolbox are also available below. This material can be freely used for training purposes.

Training material
Tutorial 1 Step-by-step example on how to predict the skin sensitisation potential approach of a chemical by read across based on an analogue approach (PDF) Video tutorial (for beginners) (May 2015)
Tutorial 2 Step-by-step example of how to predict aquatic toxicity for an untested target chemical by the trend analysis approach (PDF) (for beginners) (May 2015)

NITEのHP上に公開

- ・QSAR Toolboxユーザーマニュアル（NITE仮訳）

<http://www.nite.go.jp/data/000083129.pdf>

- ・ユーザー（インハウス）データをDBとしてシステムに取り込む方法（NITEがマニュアル化）

<http://www.nite.go.jp/data/000055487.pdf>



OECD QSAR Toolbox 活用 マニュアル

～ データのインポートと構造検索 ～

Ver. 1.0

nite

平成26年9月

独立行政法人 製品評価技術基盤機構

免責事項

本マニュアルを使用したことにより、直接的、間接的に発生した損害、損失については、いかなる責任も負いかねます。

ご清聴ありがとうございました