

カテゴリーアプローチによる 反復投与毒性評価手法 及び評価支援システムの開発

NITE化学物質管理センター成果発表会2010

化学物質管理センター
安全審査課 櫻谷 祐企

発表内容

1. 背景と目的
2. 開発方針と開発体制
3. データベースの開発
4. 反復投与毒性のカテゴリー化の方法
論の確立

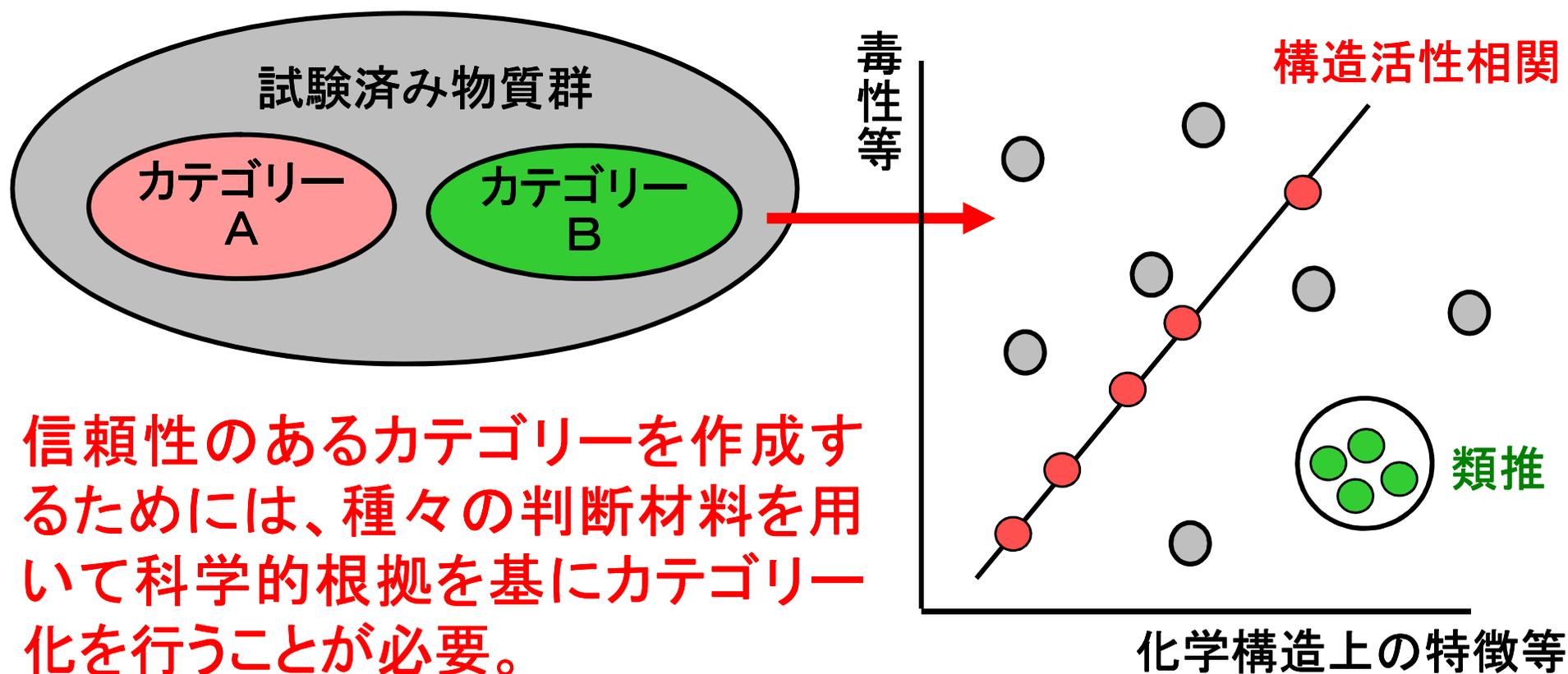
1 背景と目的

有害性情報が不明な化学物質に対する懸念が国際的にも高まっている。

しかしながら、有害性試験が実施できる物質数には限界がある。

類似化学物質の試験データを基に化学構造から有害性試験データを補完する手法として、カテゴリーアプローチや構造活性相関が活用されている。

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¹⁾。類推や構造活性相関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、種々の判断材料を用いて科学的根拠を基にカテゴリー化を行うことが必要。

1) OECD, “Manuals for investigation of HPV chemicals” (2007) Chap 3.2.

カテゴリーアプローチの評価手法や、カテゴリーアプローチに使用する化学物質の有害性試験データを国際的に共有化することが必要。

種々の有害性試験データのデータベースを備えた評価支援システムの「**OECD (Q)SAR Application Toolbox**」(**ツールボックス**)を開発し、無料で公開している²⁾。

※ツールボックスに搭載されているデータや評価モデルは、OECD加盟各国から提供されている。

2) www.oecd.org/env/existingchemicals/qsar

現状で、カテゴリーアプローチの方法論が確立されているのは、生態毒性、遺伝毒性、生物濃縮性等、一部のエンドポイントに限定されている。

対応エンドポイントの拡張は、OECDの次期バージョンのツールボックスにおける最重要課題とされている。

主要エンドポイントの中で、カテゴリーアプローチの方法論が確立されていないのは、**反復投与毒性試験**。

カテゴリーアプローチにより反復投与毒性を評価するための方法論の開発。

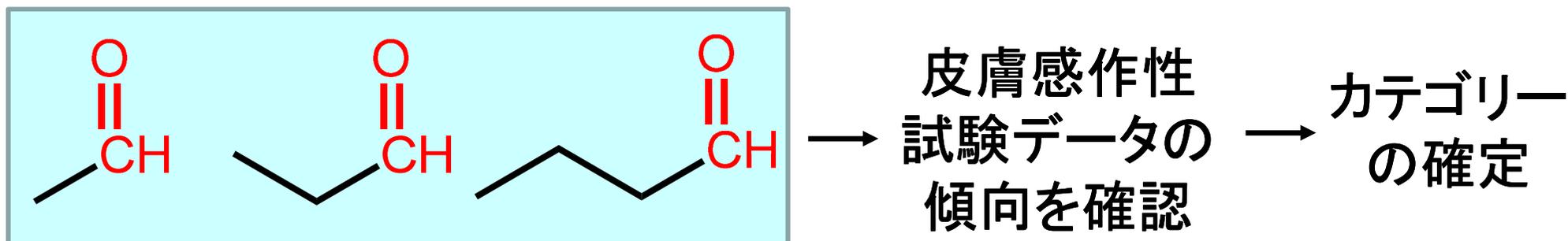
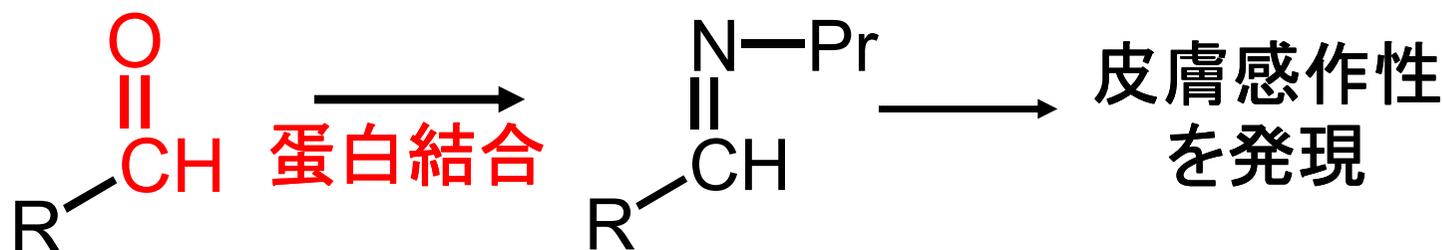
カテゴリーアプローチにより反復投与毒性を評価する際に必要となる判断材料を効率良く提供する評価支援システムの開発。

2 開発方針と開発体制

Toolboxにおける カテゴリー作成方法の例

有害性発現の原因となる開始反応を引き起こす特定の部分構造に着目し、カテゴリー作成を行う。

(例)

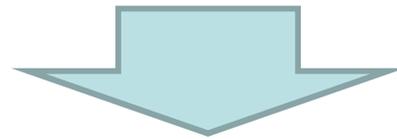


※多種多様な要因が混在する反復投与毒性の試験結果を化学構造と直接的に関連付けることは困難。

一般状態、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、臓器重量、剖検所見、病理組織所見等を様々な検査結果を基に専門家が毒性の内容を総合判断することにより無影響量(NOEL)、無毒性量(NOAEL)、標的臓器などが判断される。

毒性発現は、有害性の原因となる開始反応だけでなく、代謝、細胞レベル、生体レベルのメカニズムにも強く依存する。

各物質の反復投与毒性試験結果の詳細を物質間で比較・検討しつつ、既知見の作用機序や代謝の情報を手がかりに、類似物質を探していくことが必要。



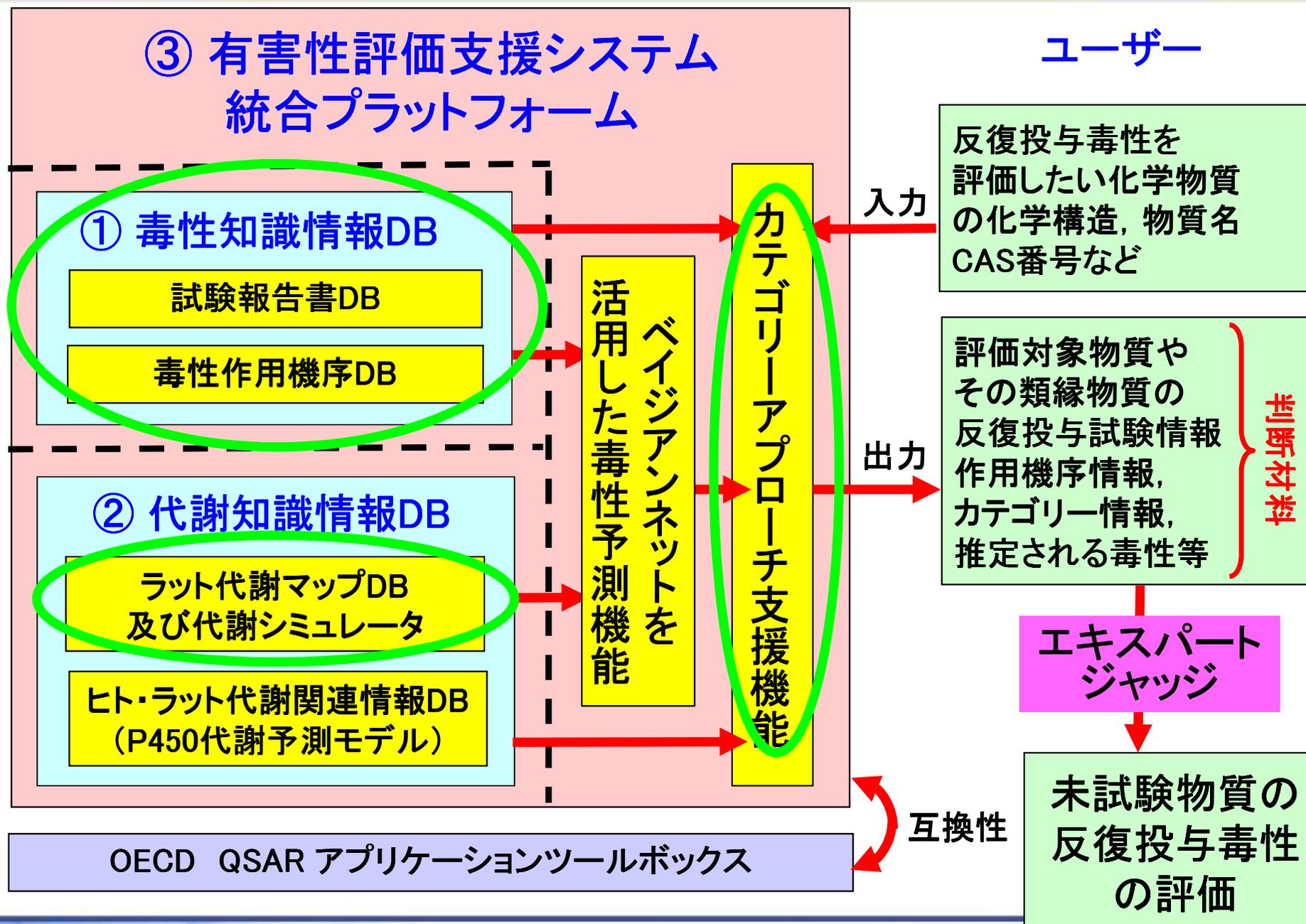
これらの詳細な判断材料を効率良く抽出でき、物質間で比較・検討しやすい形で評価者に提供するための支援システムが必要。

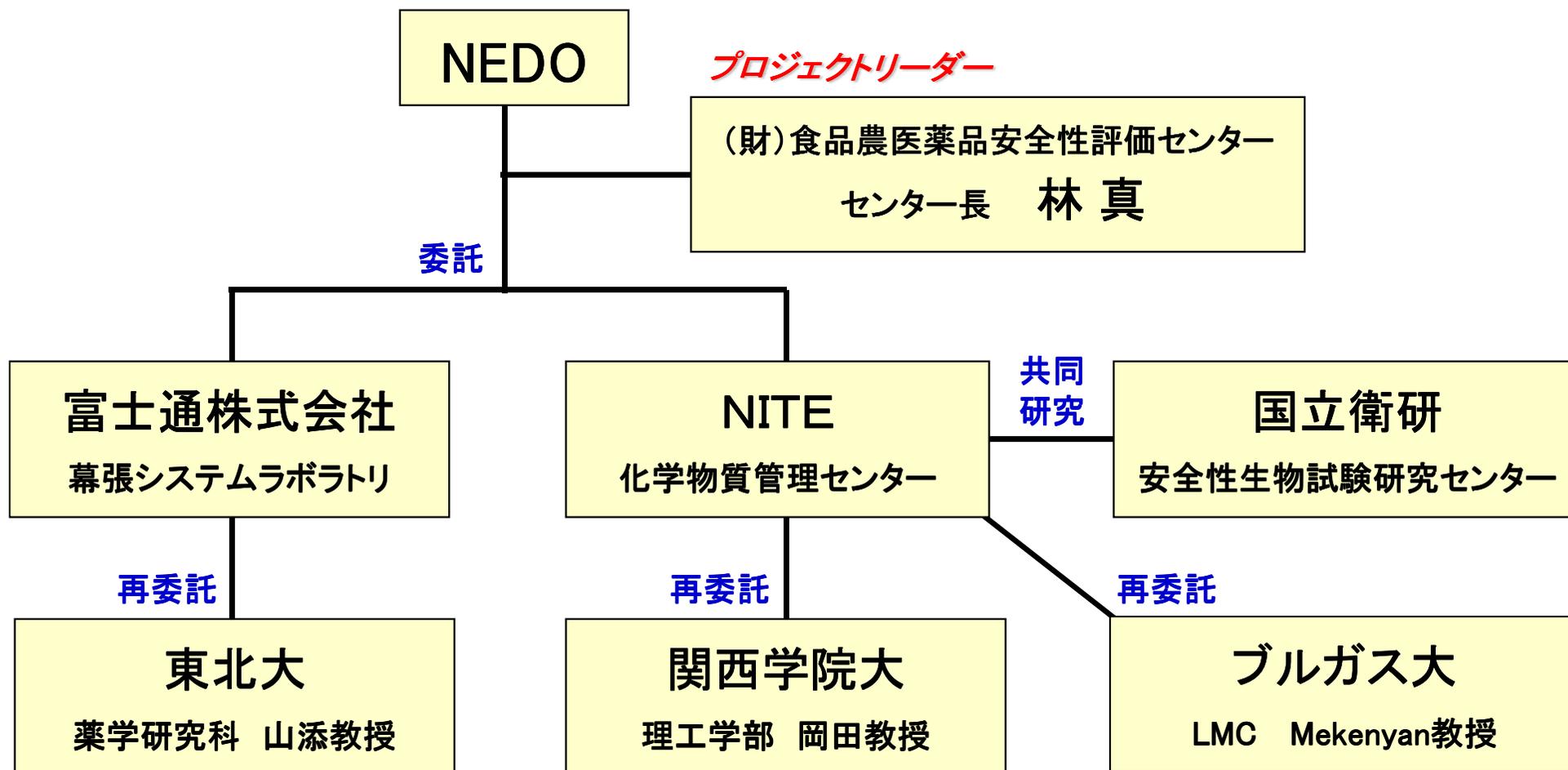
NEDO受託業務

「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」

実施予定期間: H19-H23

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、カテゴリー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を開発する。





プロジェクトの実施体制

- ・ 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 QSAR 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)

3 データベースの開発

反復投与毒性試験報告書
約500物質



毒性作用機序情報
約125物質

In vitro, ex vivo

シグナル伝達パスウェイ等



代謝マップ情報
約400物質

主にラット肝臓

約500物質の反復投与毒性試験の報告書の詳細をDB化

【1】化審法既存化学物質

① 28日間反復投与毒性試験

- ・ 厚労省（134物質）、NITE（27物質）

② 反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験

- ・ 厚労省（121物質）、経済産業省（23物質）

【2】その他

① 米国NTP短期毒性試験（46物質）

② 論文誌、その他（約150物質）

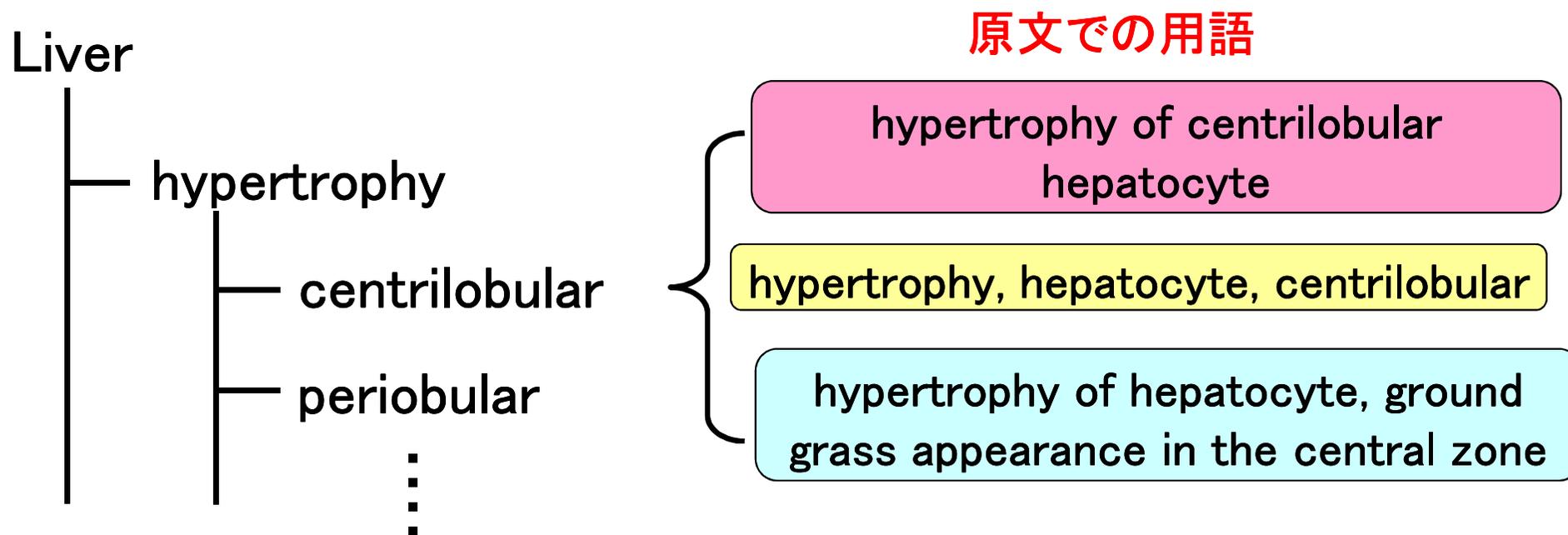
必要な物質の報告書が効率良く検索でき、その内容を物質間で容易に比較できることが必要

各種検査値や病理組織所見については、群別表をデータベース化(毒性学専門家が開発した**共通フォーマット**を使用)。

有意差マーク以外に、専門家により毒性学的と影響が認められた所見(審議会判定等)について**フラグ**を表示。

検査項目	単位	0 mg/kg		20 mg/kg				100 mg/kg				500 mg/kg			
		mean	SD	mean	SD	sgnif.	F	mean	SD	sgnif.	F	mean	SD	sgnif.	F
BUN	mg/dL	12.6	1.0	15.0	2.0			12.9	1.3			15.6	2.2	*	▲
Creatinine	mg/dL	0.52	0.04	0.53	0.02			0.48	0.04			0.47	0.04		
T.cholesterol	mg/dL	86	17	86	19			138	25	**	▲	212	15	**	▲
T.bilirubin	mg/dL	0.37	0.04	0.42	0.03			0.48	0.04	**	▲	0.59	0.08	**	▲

ラボ間での用語のばらつきに対応するため、**病理シソーラス** (病理学専門家による)を開発し、検索エンジンに反映。



これにより、特定の病理所見で有意差が認められた物質を検索することが可能。

例：3,5-キシリジンの毒性作用機序

文献情報 Cauchon D., Krishnan K. In vitro and in vivo evaluations of the methaemoglobinaemic potential of xylylidine isomers in the rat. J. Appl. Toxicol., 17(6): 397-404, 1997

毒性	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
血液毒性	3,5-Xylylidineの 代謝活性化	活性代謝物 (未同定)	ヘモグロビンを酸化	メトヘモグロビン 血症誘導

機序の要約

1. *In vitro*では3,5-xylylidine (0.06mM) は代謝活性化によりメトヘモグロビン産生を誘導する。
2. *In vivo*で3,5-xylylidineを4.8 mmol/kgで単回投与後、メトヘモグロビン血症が誘導される。
3. メトヘモグロビン生成に関わる活性代謝物は同定されていない。

試験された他の化合物

2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4-Xylylidines

追加情報

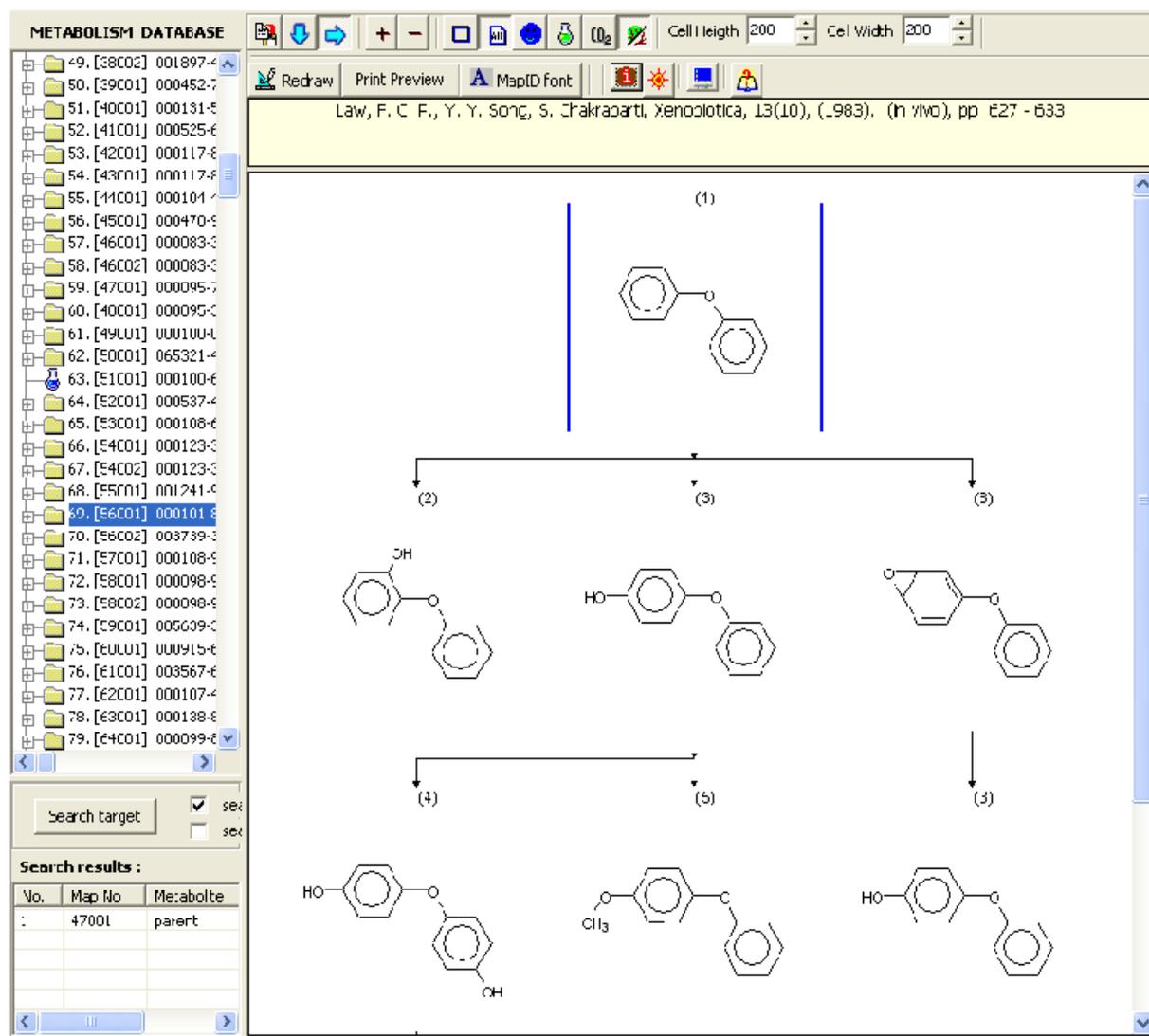
1. すべてのxylylidine異性体が代謝活性化によってメトヘモグロビン産生を誘導する(1mM)が、3,5-xylylidine以外は0.3mMではそのポテンシャルは低く、0.06mMではほとんどない。

カテゴリー作成の根拠に利用可能

各物質について、主としてラットの肝臓における代謝情報を原著論文から抽出し、**代謝マップ**を作成しデータベース化(約400物質600マップを収載済み)。



ラット肝ミクロソームを対象とした**代謝シミュレータ**を開発。



代謝物に毒性発現の原因となる物質はないか検討可能

4 反復投与毒性の カテゴリー化の方法論の確立

反復投与毒性試験報告書
約500物質

毒性作用機序情報
約125物質

In vitro, ex vivo
シグナル伝達パスウェイ等

代謝マップ情報
約400物質

主にラット肝臓

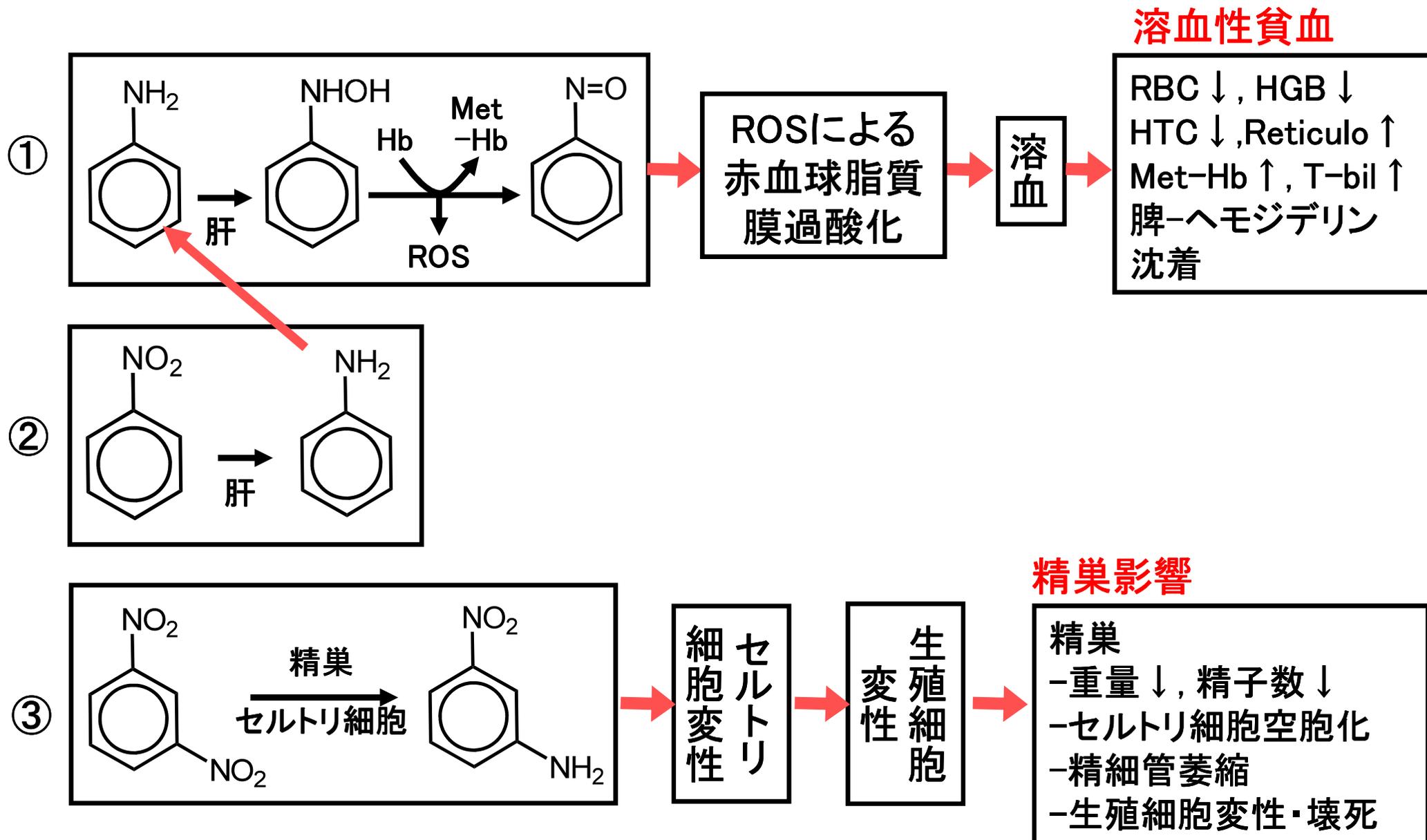
カテゴリーの作成

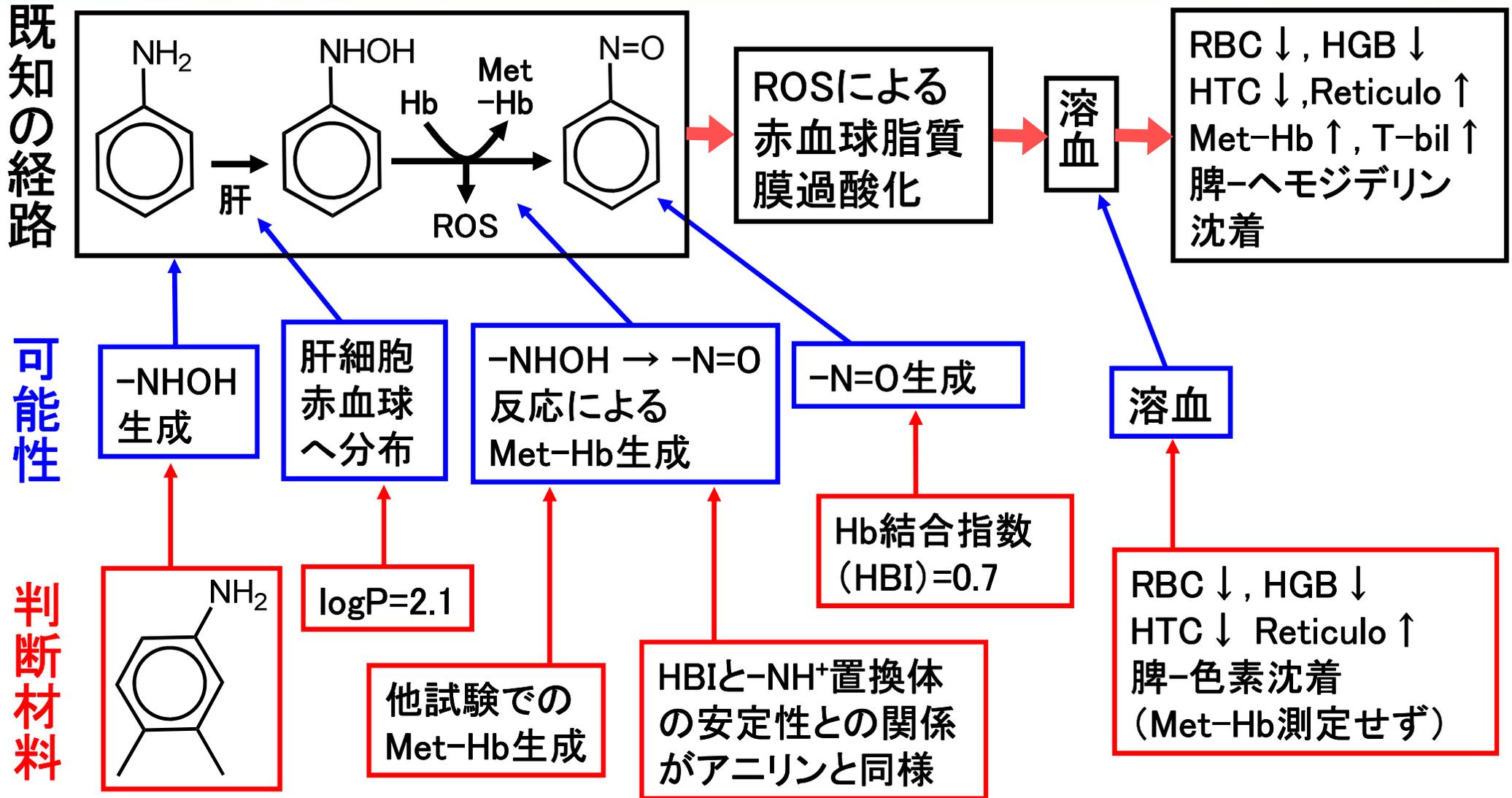
～科学的に根拠のあるカテゴリーを作成するために～

反復投与毒性について、下図のような**毒性発現経路**を考慮し、同様の**毒性発現経路**と推定される物質群をカテゴリーとして定義する。



反復投与毒性試験の最終的な結果とされているNO(A)EL、LO(A)ELや標的臓器だけでは、各試験で認められた**毒性学的影響の内容**を的確に表現できず、物質間で毒性の内容を比較すること(化学構造と毒性を関連付けること)は困難と考え、本研究では、反復投与毒性試験の結果を所見の組合せで表現することとした。

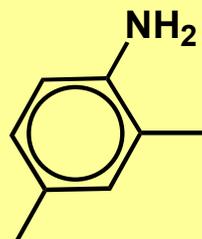
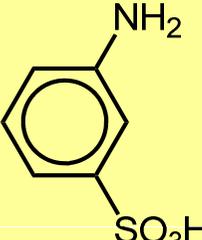
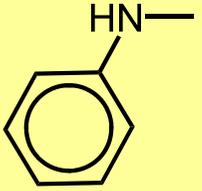




種々の判断材料により、3,4-ジメチルアニリンは、上記アニリンと同様の毒性発現経路を有すると推定できる。

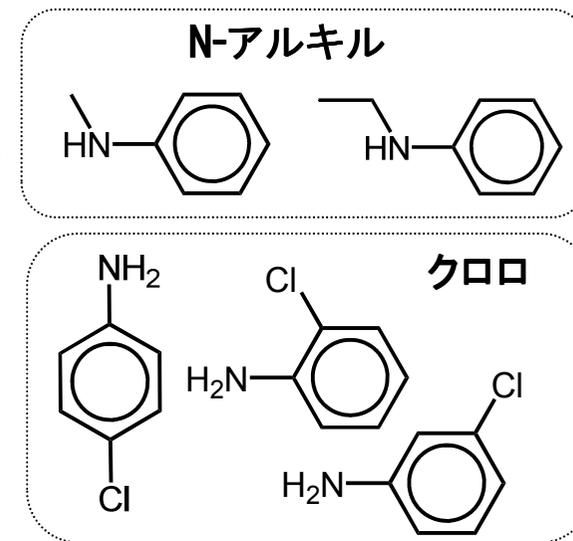
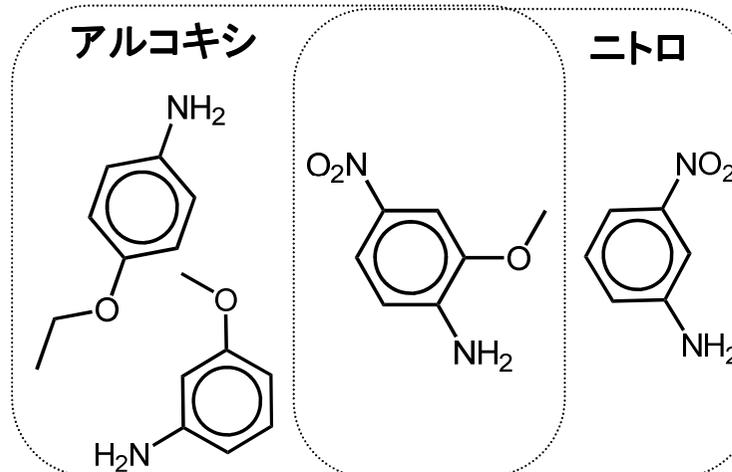
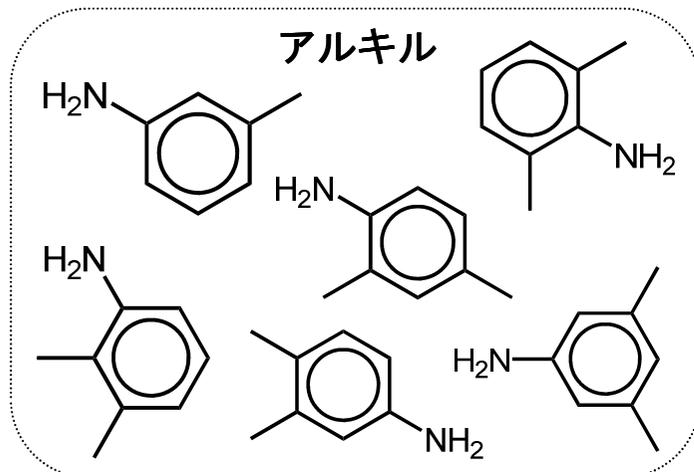
判断材料の例

推定結果

	構造	logP	代謝物		HBI	HBI NH ⁺ 相関	Met- Hb	反復投与毒性 (雄ラット, 28日)		毒性発現経路の推定	
			NH ₂	N=O				用量*	関連所見	結果	考え方
1		2.2	/	virto	2.3	○	vitro vivo	10~ 50	HGB ↓ T-bil ↑	○	反復毒性所見は判断材料として弱いが(低用量のため)、他の判断材料により推定可能。
2		-2.1	/					1000	なし	×	脂溶性が低いため、肝細胞及び赤血球に分布せず排出される。
3		1.6	virto	vitro vivo				25~ 125	RBC ↓, HGB ↓ HTC ↓, Reticulo ↑ T-bil ↑ 脾一色素沈着	○	肝臓で代謝されアニリンとなり、アニリンと同様の毒性発現経路を進む。

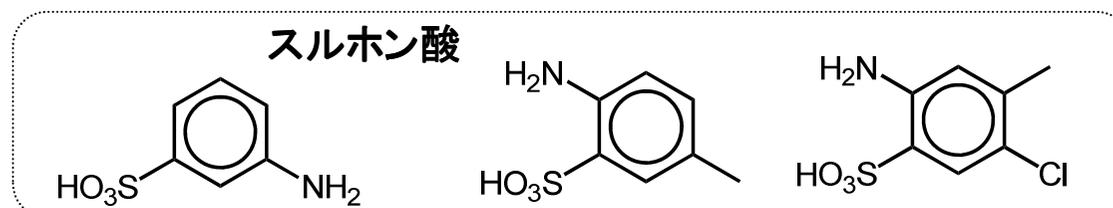
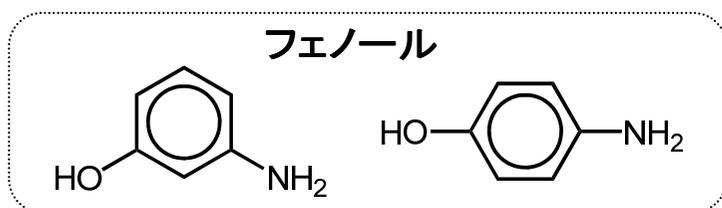
*関連所見が認められた最小の用量(mg/kg/day)

(1) 該当物質



(2) 該当の可能性あり

(3) 該当しない

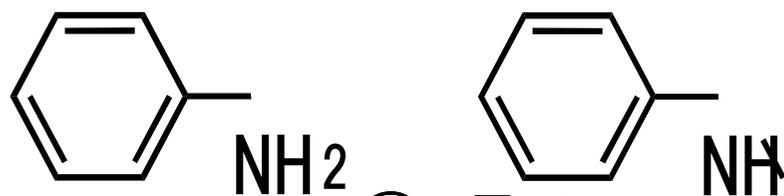


カテゴリーに該当する物質の特徴が明確になり、カテゴリーの該当領域を定義することができるようになった。

アニリン溶血性貧血カテゴリー

以下の①～③すべての条件を満たす物質

① 以下の部分構造のうち、どちらかを有する



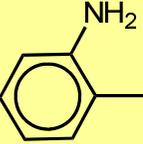
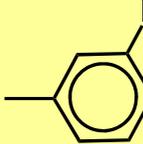
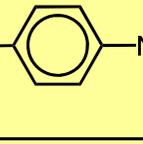
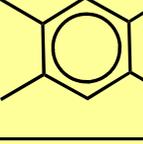
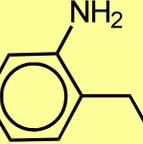
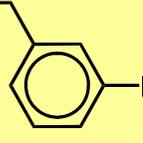
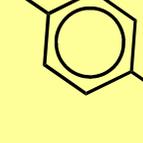
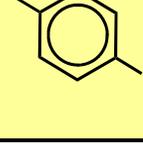
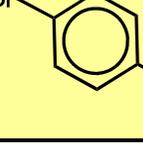
② 環は一つ

③ $\log P \geq 1$



有害性評価支援システム統合プラットフォームの
カテゴリーライブラリーへ登録

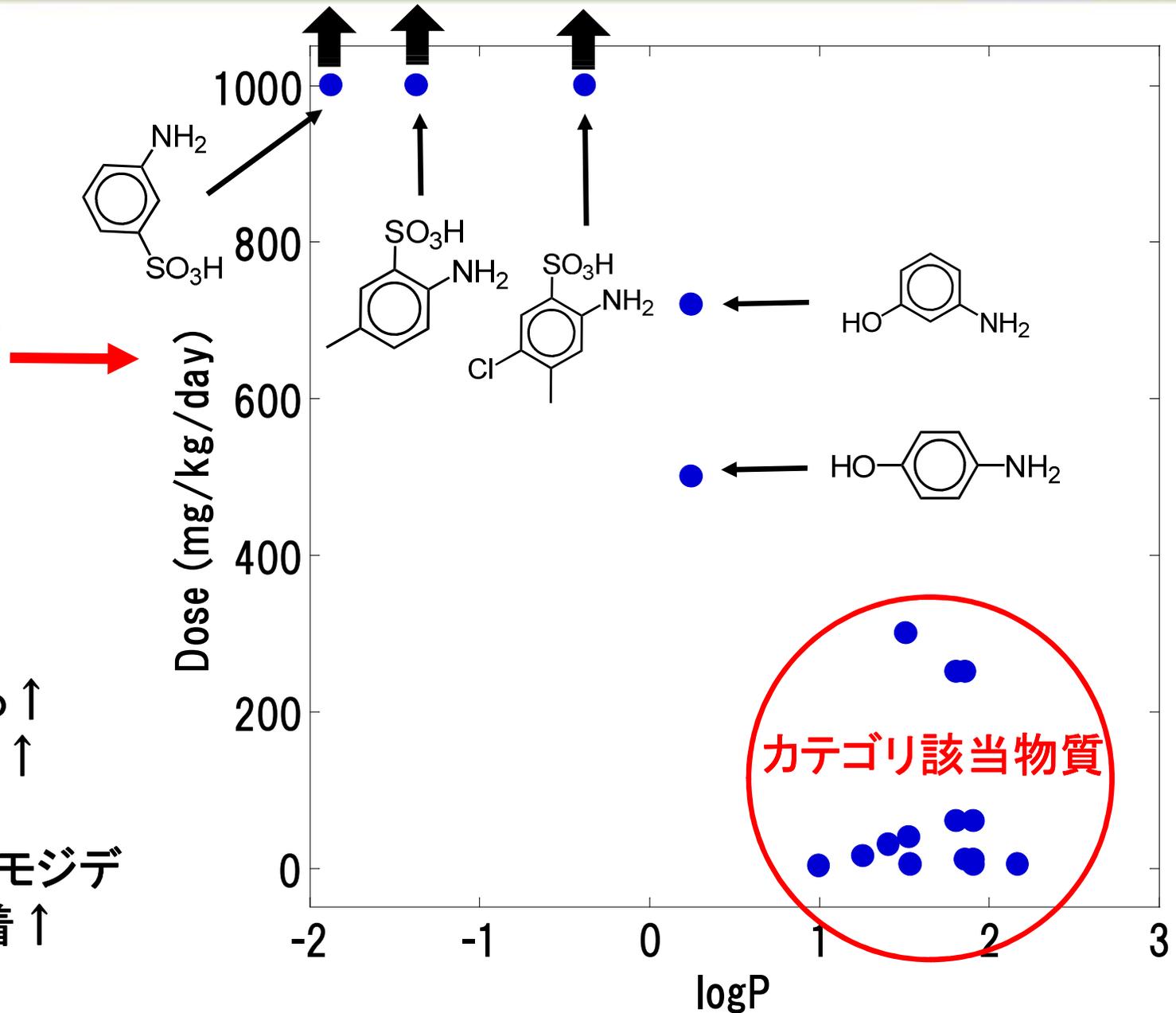
作成したカテゴリーに該当する 未試験物質とその判断材料の例

	構造	logP	代謝物	HBI	HBI NH ⁺ 相関	Met- Hb	カテゴリー内の 構造類似物質		構造	logP	代謝物	HBI	HBI NH ⁺ 相関	Met- Hb	カテゴリー内の 構造類似物質
			N=0								N=0				
1		1.6	vivo	4.0	○		アルキル アニリン	6		2.1	silico	7.3	○	virto vivo	アルキル アニリン
2		1.6	vitro	4.3	○		アルキル アニリン	7		2.7	silico	0.7	○		アルキル アニリン
3		2.1	silico	5.1	○		アルキル アニリン	8		2.7	silico	0.2	○		アルキル アニリン
4		2.1	silico	12.7	○		アルキル アニリン	9		1.3	silico	33	○		4-クロロア ニリン
5		2.1	silico	5.8	○		アルキル アニリン	10		2.0	silico	341	○		4-クロロア ニリン

nit 溶血性貧血に対する最小影響量の予測

溶血性貧血
のLOEL

- Min. {
- RBC ↓
 - HGB ↓
 - HTC ↓
 - Reticulo ↑
 - Met-Hb ↑
 - T-bil. ↑
 - 脾臓:へモジデリン沈着 ↑



カテゴリー	物質数	標的	カテゴリー	物質数	標的
アルキルアニリン類 ハロゲン化アニリン類	7	肝臓・腎臓 赤血球	アルキルフェノール類、 ハロゲン化フェノール類 (logP \geq 3)	12	腎臓、粘膜刺激
アミノフェノール類	2	肝臓・腎臓 赤血球	アルキルフェノール類、 ハロゲン化フェノール類 (logP $<$ 3)	10	粘膜刺激
アミノベンゼンスルホン酸類	3		ハロゲン化ベンゼン類 (logP \geq 3)	11	肝臓、腎臓
ニトロアニリン類	2	肝臓・腎臓 赤血球・精巣	ハロゲン化ベンゼン類 (logP $<$ 3)	8	肝臓
ニトロベンゼン類 (logP $>$ 1)	4	肝臓・腎臓 赤血球	ハロゲン化アルカン類	3	肝臓
ハロゲン化ニトロベンゼン類	2	肝臓・腎臓 赤血球	フェニルフォスフェート類	3	精巣
p-ニトロフェノール類	3	呼吸異常	アルキルフォスフェート類	8	神経系
1,3-ジニトロベンゼン類	4	肝臓・腎臓 赤血球・精巣	チオウレア・チオアミド類	3	甲状腺
ニトロベンゼンスルホン酸類	2		アントラキノノン類	9	肝臓
アミド、スルホンアミド類	6	神経系	炭化水素類	18	肝臓
フタル酸エステル類	3	精巣	ベンゼンスルホン酸類 ナフタレンスルホン酸類	8	

有害性評価支援システム統合プラットフォームの画面イメージ (ポスター発表でデモンストレーション)

Hazard Evaluation Support System
Reset Options

Input Profiling

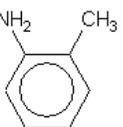
RDT Data

Categories

Gap Filling

Metabolism

Report



Chemical name: **2-Toluidine**
 CAS No: **000095-53-4**
 SMILES: **c1(N)c(C)cccc1**

to data matrix ->

作成したカテゴリーが登録されており、
未試験物質に対するカテゴリー作成を支援する。

	1 (Target)	2	3	4	5
Structure					
Substance Information					
Profile					
Aromatic Amines	Aromatic Amines	Aromatic Amines	No Binding	Aromatic Amines	Aromatic Amines
No Binding	No Binding	No Binding	No Binding	No Binding	No Binding
Root of map No. 244	N/A	Root of map No. 312	Root of map No. 1	Root of map No. 196	
47	47	168	1	157	
48	48	170	1	156	
Anilines (logKow>=1)	Anilines (logKow>=1)	Anilines (logKow>=1)	Anilines (logKow>=1)	Anilines (logKow>=1)	
Aromatic Amines	Aromatic Amines	No Binding	Aromatic Amines	Aromatic Amines	
Repeated Dose toxicity					
Rat					
Oral (gavage)					
Blood chemical examination (12/719)	T: 60 mg/kg/day, 60 mg...	T: 50 mg/kg/day, 250 m...	T: 10 mg/kg/day, 50 mg...	T: 2 mg/kg/day, 2 mg/k...	
General signs (12/415)	T: 60 mg/kg/day, 60 mg...	T: 10 mg/kg/day, 10 mg...	T: 50 mg/kg/day, 50 mg...	T: 10 mg/kg/day, 10 mg...	
Hematological examination					
Blood cell (Coagulation) (8/80)	T: 300 mg/kg/day, 300 ...	T: 250 mg/kg/day, 250 ...	T: 250 mg/kg/day, 250 ...	T: 2 mg/kg/day, 10 mg/...	
Blood cell (Erythrocyte)					
HGB↑ (12/21)	T: 300 mg/kg/day, 300 ...	T: 250 mg/kg/day	T: 250 mg/kg/day, 250 ...	T: 50 mg/kg/day, 50 mg...	
HGB↓					
LOEL (12/21) Average 94.3 mg/kg/day	T: 60 mg/kg/day	T: 250 mg/kg/day	T: 250 mg/kg/day	T: 30 mg/kg/day	
NOEL (12/21)	T: 12 mg/kg/day, 12 mg...	T: 50 mg/kg/day	T: 50 mg/kg/day, 50 mg...	T: 2 mg/kg/day, 10 mg/...	
HTC↑ (12/21)	T: 300 mg/kg/day, 300 ...	T: 250 mg/kg/day	T: 250 mg/kg/day, 250 ...	T: 50 mg/kg/day, 50 mg...	
HTC↓ (12/39)	T: 12 mg/kg/day, 60 mg...	T: 250 mg/kg/day	T: 50 mg/kg/day, 50 mg...	T: 50 mg/kg/day, 50 mg...	
MCH↑ (11/32)	T: 60 mg/kg/day, 60 mg...	T: 250 mg/kg/day	T: 250 mg/kg/day, 250 ...	T: 50 mg/kg/day, 50 mg...	
MCH↓ (11/21)	T: 300 mg/kg/day, 300 ...	T: 250 mg/kg/day	T: 250 mg/kg/day, 250 ...	T: 10 mg/kg/day, 50 mg...	
MCHC↑ (11/24)	T: 300 mg/kg/day, 300 ...	T: 250 mg/kg/day	T: 250 mg/kg/day, 250 ...	T: 50 mg/kg/day, 50 mg...	

約500物質の反復投与毒性試験データの詳細及びそれらに関連する毒性作用機序情報・代謝情報を収載するデータベースの試作版を作成した。

反復投与毒性試験のカテゴリー化の方法論の確立し、約20種類のカテゴリーを定義した。

反復投与毒性を対象とするカテゴリー作成を支援する有害性評価支援システムの試作版を作成した。

開発したデータベース、支援システムの最終版は平成23年度に最終版が完成し、その後、NITEのホームページから無料でリリースする予定。

反復投与毒性の試験データの一部は本年10月にリリースされる予定のOECD (Q)SAR Application Toolbox ver.2に搭載される予定。

開発した評価手法については本年12月に予定されているAdverse Outcome Pathway Workshopで提案予定。

ご清聴ありがとうございました。