

総合科学技術会議 科学技術連携施策群 化学物質の安全管理・活用連携群
総合的リスク評価による化学物質の安全管理・活用のための研究開発
平成21年度対象施策 成果報告会
2009年12月16日
社会福祉法人全国社会福祉協議会 灘尾ホール

化学物質管理における「安全」と「安心」シンポジウム

化学物質の安全性評価におけるカ テゴリーアプローチおよび*in silico* 評価支援システムの開発

財団法人食品農医薬品安全性評価センター
センター長 林 真

反復投与毒性への*In silico* 評価手法の適用

反復投与毒性試験は、各種検査値・病理所見を基に専門家の総合判断により無影響量(NOEL)、無毒性量(NOAEL)、標的臓器などが判断される。

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。

専門家の総合判断を主体とした評価手法(カテゴリーアプローチ等)が適している。

専門家の総合判断を支援するためのデータベース及び解析システムが必要。

化審法の主要有害性評価試験と *In silico* 評価手法開発の現状

| | 分解度試験 | 濃縮度試験 | 生態毒性試験 |
|-----------------------------|---------------------------------------|--|------------------------|
| 試験実施費用 及び期間 | 140～200万円 60～120日 | 600～850万円 120～180日 | 96～216万円 約90日 |
| 化審法物質試験データ数 (2006年6月公表済) | 1495物質 | 805物質 | 394物質 |
| 主な <i>in silico</i> モデル | BIOWIN, CERIMODEL, CATABOL | BIOWIN, CERIMODEL, Baseline Model | ECOSAR, KATE, TIMES |
| | Ames試験 | 染色体異常試験 | 28日間反復投与 毒性試験 |
| 試験実施費用 及び期間 | 50～80万円 45～60日 | 180～230万円 60～90日 | 750～950万円 150～180日 |
| 化審法物質試験データ数 (2006年6月公表済) | 245物質 | 255物質 | 153物質 |
| 主な <i>in silico</i> モデル | DERECK, MultiCase AdmeWorks, TIMES | DERECK, MultiCase, AdmeWorks, TIMES | |

NEDO「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」プロジェクト

最終目標（実施期間：H19-23）

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。

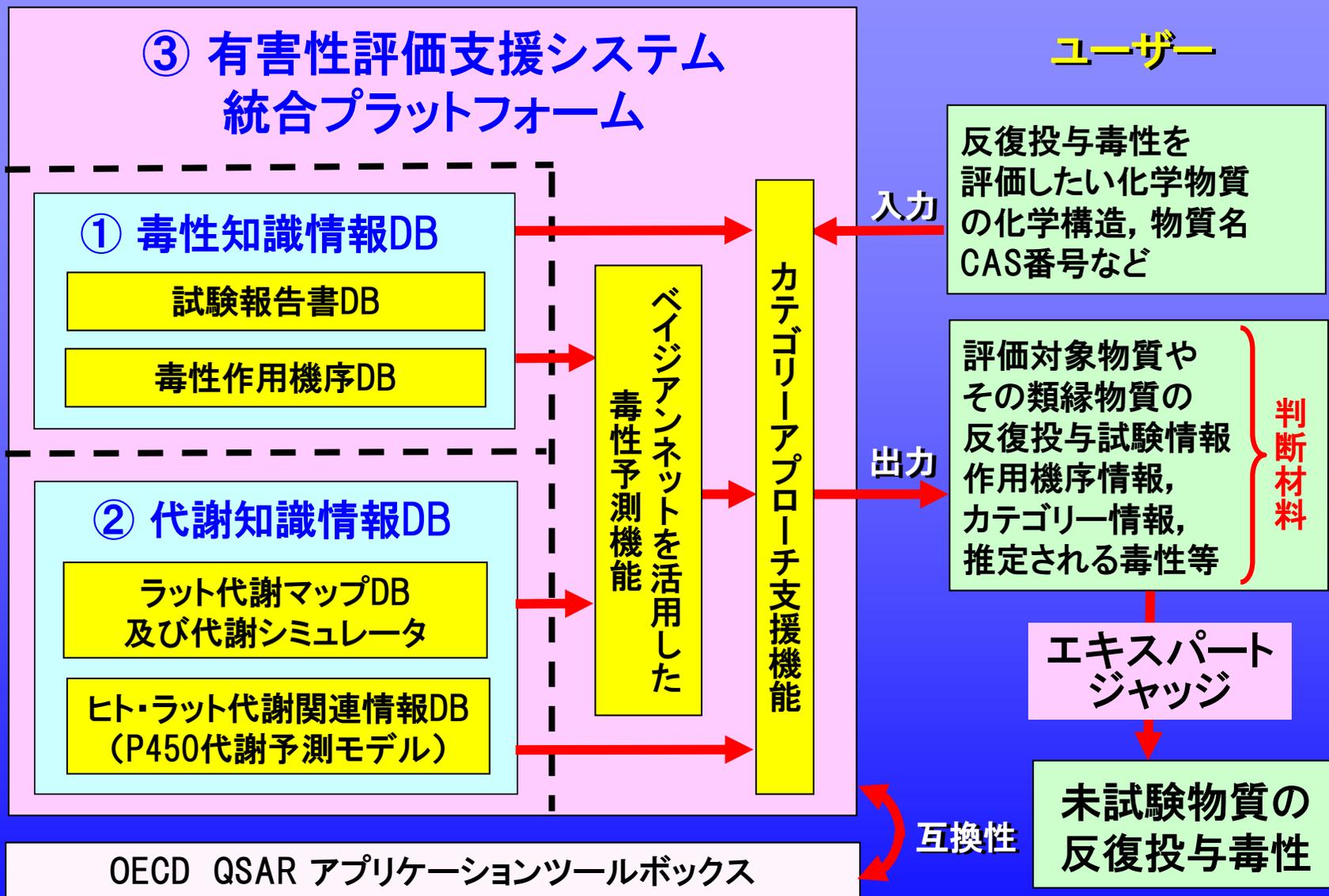
研究開発項目

- ① 毒性知識情報データベースの開発
- ② 代謝知識情報データベースの開発
- 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

本プロジェクトの特徴

- 国際的に利用されるものを目ざす(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)
- 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)

開発予定システムの構成

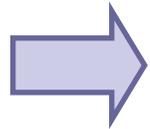


[試験報告書DBの開発]

<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 (データの質を評価してから用いる)

ラットの経口投与試験報告書
計**1244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, **約500物質**の試験報告書を入力データとして選定した.

[試験報告書DBの開発]

反復毒性試験の基本的項目を網羅した入力項目を設定。
 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(共通フォーマットを開発)。
 毒性学的影響が認められた所見にフラグを表示(審議会等判定による)。

※血液生化学検査データの表示例

| 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 | ** | ▲ |
| T.protein | g/dL | 6.06 | 0.29 | 6.13 | 0.15 | | | 6.26 | 0.26 | | | 6.44 | 0.21 | * | ▲ |
| Albumin | g/dL | 3.05 | 0.10 | 3.10 | 0.23 | | | 3.06 | 0.10 | | | 2.95 | 0.14 | | |
| A/G | | 1.02 | 0.08 | 1.03 | 0.13 | | | 0.96 | 0.12 | | | 0.85 | 0.10 | * | ▼ |
| Glucose | mg/dL | 150 | 13 | 150 | 10 | | | 119 | 21 | ** | ▼ | 81 | 9 | ** | ▼ |

[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って、用語の統一を行い、シソーラスを作成した。

約350の報告書記載の病理所見用語の統一を行い、半数の報告書(13機関)について全56臓器・約4300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

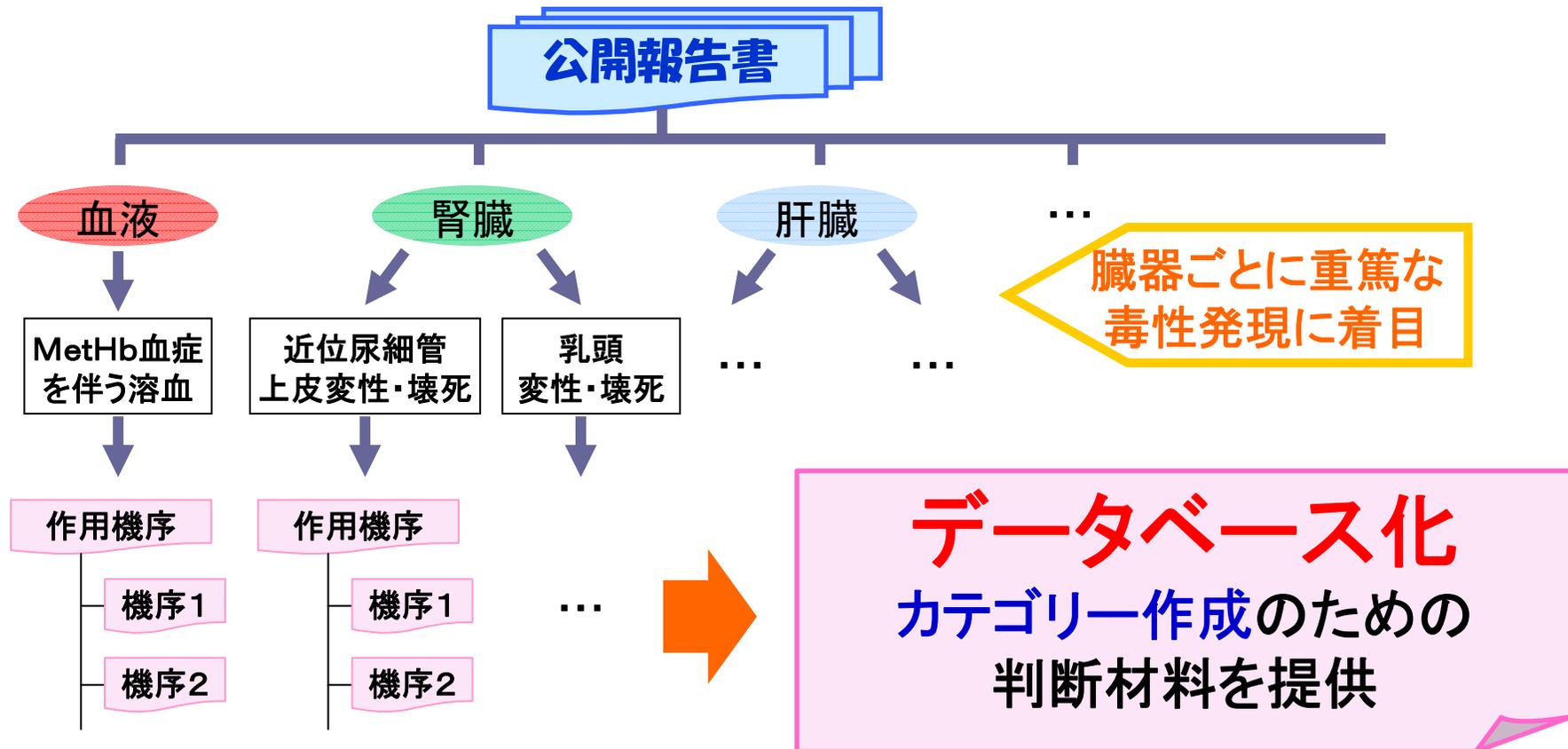
hypertrophy, hepatocyte, centrilobular

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

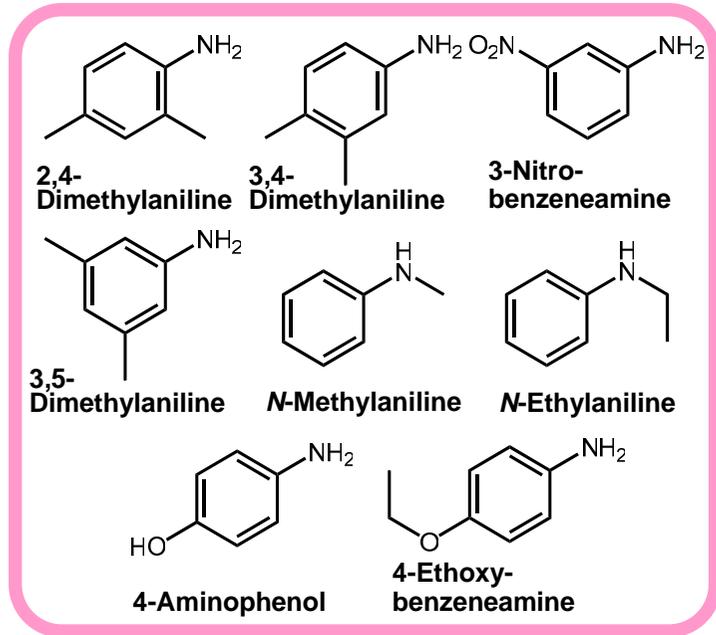
反復毒性試験で発現した毒性をベースに物質を選抜し、作用機序を体系的に収集・整理し、データベース化する。



分子, 細胞, 臓器レベル

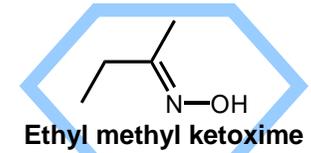
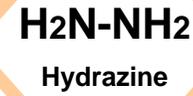
毒性作用機序DBの開発

<溶血性物質の作用機序にもとづく分類>



代謝
活性化

フェニルヒドロ
キシルアミン
又は
ベンゾキノニンイミン



直接作用

ヘモグロビン酸化

フリーラジカル産生

赤血球障害

Met-Hb血症を伴う溶血

代謝
活性化

アルコキシ
酢酸

膨張化

溶血

棘状化



溶血性物質

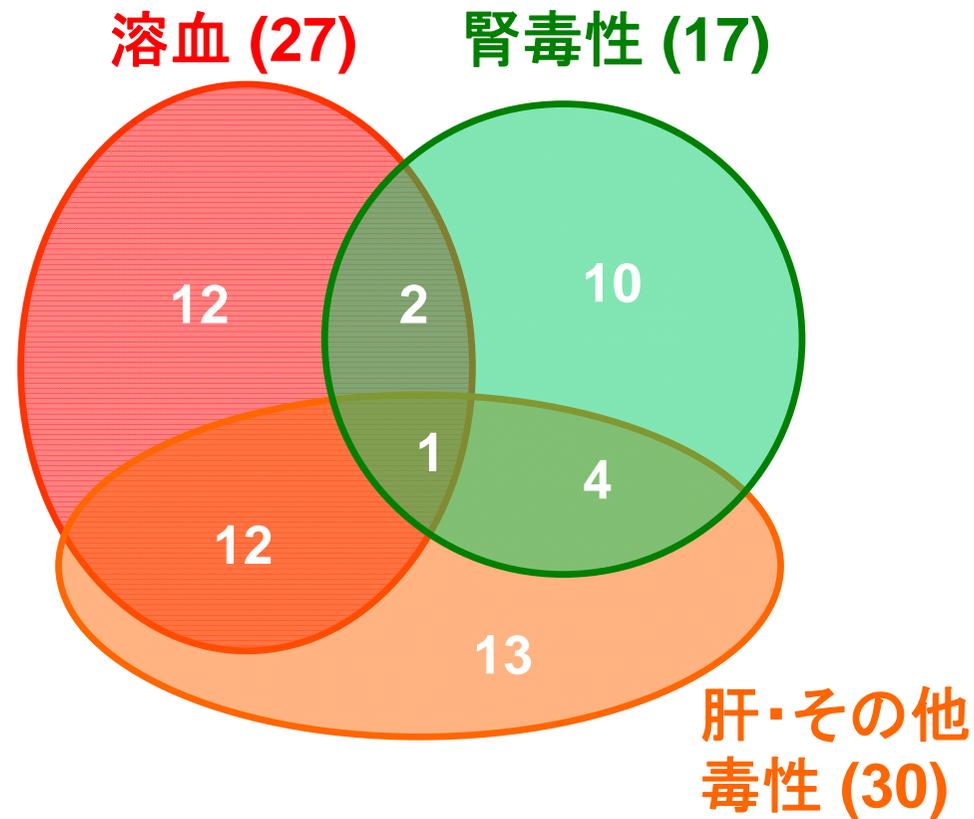
毒性作用機序に基づき
5つのグループに分類

反復投与毒性
カテゴリー作成に有用

毒性作用機序DBの開発

<作用機序情報を収載した物質数>

合計77物質



毒性作用機序DBの開発

<設定したデータ項目>

【化学物質に関する項目】

- Chem. No.
- CAS
- Chemical Name
- Structure

【文献情報】

- Reference

【作用機序に関する項目】

- Toxicity
- Possible Chemistry Reaction /Metabolism
- Possible Toxicant
- Possible Interaction with Target Molecule
- Possible Effects
- Target Organ/Tissue/Cell etc.

【実験に関する項目】

- Species
- Experimental Design
- *in vitro* / *in vivo* / *ex vivo*
- Dose / Concentration Employed
- Effective Dose / Concentration

【作用機序の要約】

- Possible Mechanism Summary

【その他追加項目】

- Other Compounds Studied
- Additional Information
- Authors' Suggestion

【備考】

- Remark

毒性作用機序DBの開発

Example

<3,5-キシリジン (3,5-ジメチルアニリン)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。
2. 3,5-xylylidine以外の異性体は4.8 mmol/kgで単回投与してもメトヘモグロビン血症を誘導しない。

代謝知識情報データベース

～代謝マップのデータベース化～

反復投与毒性試験報告書がデータベース化された物質(400物質を予定)について、既知の代謝経路を収集し、**代謝マップ**を作成し、データベース化。

試験条件や文献情報を併せて登録。

代謝マップの親物質及び代謝物は、部分構造による検索が可能。

The screenshot displays the METABOLISM DATABASE software interface. On the left is a tree view of a database containing 79 entries, with entry 59 selected. The main window shows a metabolic map for biphenyl-4-yl phenyl ether (1). The map illustrates the following metabolic pathways:

- (1) Biphenyl-4-yl phenyl ether
- (2) 4-hydroxybiphenyl-4-yl phenyl ether
- (3) 4-hydroxybiphenyl-4-yl phenyl ether (isomer)
- (4) 4-hydroxybiphenyl-4-yl phenyl ether (isomer)
- (5) 4-methoxybiphenyl-4-yl phenyl ether
- (6) 4-hydroxybiphenyl-4-yl phenyl ether (isomer)

Below the map, a search results table is visible:

| No. | Map No. | Metabolite |
|-----|---------|------------|
| 1 | 47001 | parent |

代謝知識情報データベース

～代謝関連(動態)情報のデータベース化～

反復投与毒性試験報告書がデータベース化された物質について、**ヒト/ラット間の毒性発現の種差**を検討する際に有用と思われる代謝関連(動態)情報を収集しデータベース化。約100物質について127文献の情報を収載。

表. 代謝関連(動態)情報のデータベース項目

| | | | |
|----|---|--------------------------------|--|
| 吸収 | 吸収率 Cmax、Tmax トランスポーターの関与 | 代謝 | 関連酵素系と分子情報 寄与率 細胞内画分 代謝物 種差 系統差 |
| 分布 | 見かけの分布容積 反復に伴う経時変化 脳→中枢作用 脂肪組織→蓄積 肝臓→酸化抱合代謝 腎臓→尿中排泄 腎臓→タンパク結合 血液よりも高い濃度を示す臓器/器官 トランスポーターの関与 | 排泄 | 排泄率 トランスポーターの関与 種差 系統差 |
| | | 相互作用、酵素阻害、酵素誘導試験の結果 毒性との関連性 | |

代謝知識情報データベース

～代謝予測モデルの開発～

実測試験のない物質の代謝情報を補完するため、
収集した代謝情報を、独自の手法により解析し、
化学物質の毒性評価に特化した代謝予測モデルを開発。

① ラット肝S9モデル

[階層化した反応式と反応確率]

広範囲な物質群に適用可能

② ヒト/ラットP450モデル

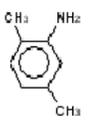
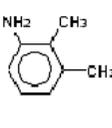
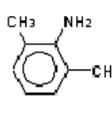
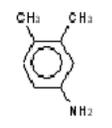
[基質の構造による予測, ドッキングシミュレーション]

反応部位を精度良く予測可能

毒性の種差検討への活用が期待される

有害性評価支援システム 統合プラットフォーム

「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」から必要な情報を抽出し、それらの情報を**物質間で比較しやすい形式で表現**すること等により、カテゴリーアプローチによる反復投与毒性の評価を支援するシステム。

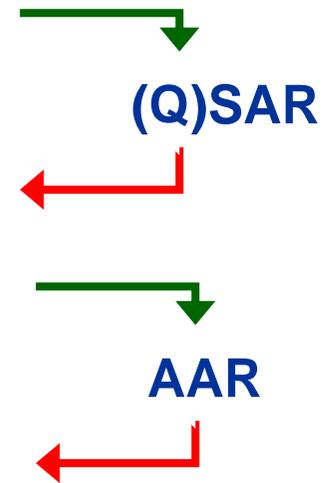
| | 1 (Target) | 2 | 3 | 4 |
|---------------------------|--|---|---|---|
| Structure |  |  |  |  |
| Profile | | | | |
| NITE | Hemolytic anemia (...) | Hemolytic anemia (...) | Hemolytic anemia (...) | Hemolytic anemia (...) |
| Repeated Dose toxicity | | | | |
| LOEL | | | | |
| Male | | | | |
| General signs (11/36) | | T: 300 mg/kg/day, ... | T: 50 mg/kg/day, 5... | T: 250 mg/kg/day, ... |
| Hematological examination | | | | |
| Blood cell (Erythrocyte) | | | | |
| HGB↓ (12/12) | | T: 60 mg/kg/day | T: 250 mg/kg/day | T: 250 mg/kg/day |
| HTC↓ (10/10) | | T: 300 mg/kg/day | | T: 250 mg/kg/day |
| MCH↑ (7/7) | | T: 300 mg/kg/day | | |
| MCH↓ (1/1) | | | | |
| MCHC↑ (2/2) | | | | |
| MCHC↓ (8/8) | | T: 300 mg/kg/day | T: 250 mg/kg/day | |
| MCV↑ (8/8) | | T: 300 mg/kg/day | T: 250 mg/kg/day | |

Use of (Q)SARs and AARs in Chemical Categories

| | Chemical 1 | Chemical 2 | Chemical 3 | Chemical 4 |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| Property 1 | ● | ○ | ● | ○ |
| Property 2 | ● | ○ | ● | ● |
| Property 3 | ○ | ● | ● | ○ |
| Property 4 | ● | ● | ● | ● |
| Activity 1 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Activity 2 | ● | ● | ● | ● |
| Activity 3 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| Activity 4 | ○ | ○ | ○ | ○ |

● reliable data point
○ missing data point

read-across
interpolation
extrapolation



カテゴリーライブラリー

反復投与毒性試験結果，化学構造，物理化学定数，作用機序情報，代謝情報を手がかりに，**同様の経路により毒性を発現**と思われる物質群をカテゴリー化。

各カテゴリーについて，化学構造上の特徴と反復投与毒性における特定の毒性の強度との関係を調査。**特定の毒性が強く発現する物質領域**を明確化。

現状で約20のカテゴリーを認識。アニリン類の溶血性貧血カテゴリーでは，パラメータの変動を定量的に表現できることを確認した。

作成したカテゴリーの定義及び該当物質の情報を有害性評価支援システム統合プラットフォームに登録。

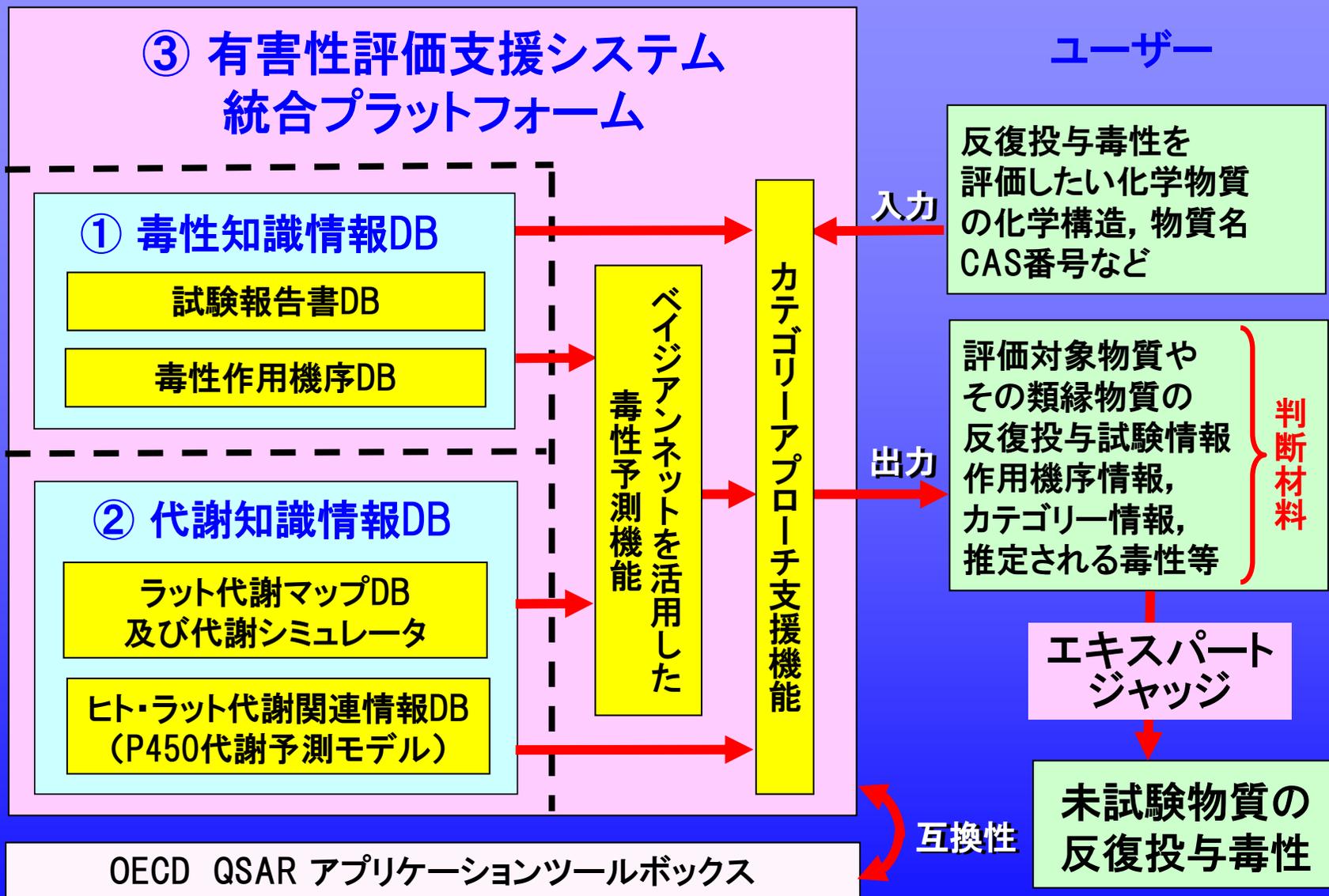
ベイジアンネットによる 反復投与毒性推定システム

試験報告書に含まれる各種検査値(血液学的検査, 血液生化学的検査, 尿検査等)を基に, データマイニング手法の一種であるカスケードモデルにより解析を行い, 特定の毒性を発現する構造上の特徴を抽出.

抽出した構造上の特徴と, **毒性学専門家の知識を活用し,** 毒性発現の因果関係を, 条件付確率のネット(ベイジアンネット)で表現することにより, 反復投与毒性を構造から推定するためのベイジアンネットの構築を検討.

芳香族アミン類の肝毒性及び血液毒性を推定するベイジアンネットの構築に成功.

開発予定システムの構成



まとめ

化学物質の反復投与毒性を，化学構造から推定する際に必要となる情報を収集・整理し，各種データベースと評価支援システムを構築した。

毒性・病理学の専門家が開発に深く関与することにより，搭載するデータの質を保証するだけでなく，病理シソーラスなど，反復投与毒性試験結果を物質間で比較することを支援する機能を備えた。

収集した情報を活用し，反復投与毒性試験データを解析することにより，一部の物質群について化学構造と反復投与毒性との関係を明らかにする支援システムを構築することができた。