

## 令和5～6年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	食品関連化学物質のリスク評価におけるリードアクロス手法の適用と信頼性評価に関する研究（課題番号：JPCAFSC20232301） 3 新たなリスク評価手法等の活用 （2）食品中の化学物質の毒性を予測するリードアクロスに関する研究
主任研究者	研究者名：山田 隆志 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

## I 研究期間及び研究目的等

## 1 研究期間

令和5年度～令和6年度（2年間）

## 2 研究目的

リードアクロスは、毒性データが不足する化学物質の安全性評価を行う上で重要な毒性予測手法のひとつと考えられており、食品中の化学物質の毒性を予測する技術としても、その応用が期待される。近年、海外の行政機関では、リードアクロスのガイダンスの作成や改訂作業が精力的に進められていることから、本邦の食品関連化学物質のリスク評価において、一貫性を持ったリードアクロスの活用の検討を行う環境が整いつつある。本研究の目的は、海外における最新のガイダンスと活用状況を整理し、本邦におけるガイダンスの作成のための基本となる情報を取りまとめて、食品健康影響評価に活用する際の考え方を提案することである。

## 3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
食品関連化学物質のリスク評価におけるリードアクロス手法の適用と信頼性評価に関する研究	ガイダンスの調査・分析に基づくリードアクロスの手順と不確実性の評価方法の状況整理	山田 隆志(国立医薬品食品衛生研究所)
	リスク評価機関におけるリードアクロスの活用状況の把握および食品健康影響評価における適用可能範囲の提案	山田 隆志(国立医薬品食品衛生研究所)、小野 敦(国立大学法人 岡山大学)
	NAMの開発状況の調査とNAMを活用した類似物質の同定の信頼性向上に関する研究	安部 賀央里(公立大学法人 名古屋市立大学)、小野 敦(国立大学法人 岡山大学)、吉成 浩一(静岡県公立大学法人 静岡県立大学)、山田 隆志(国立医薬品食品衛生研究所)
	食品健康影響評価にリードアクロスを活用する際の考え方の提案	山田 隆志(国立医薬品食品衛生研究所)、小野 敦(国立大学法人 岡山大学)、吉成 浩一(静岡県公立大学法人 静岡県立大学)、安部 賀央里(公立大学法人 名古屋市立大学)

#### 4 倫理面への配慮について

本研究では、ヒトを対象とした解析及び疫学研究を実施していない。

## II 研究内容及び成果等

1 研究項目：食品関連化学物質のリスク評価におけるリードアクロス手法の適用と信頼性評価に関する研究

(1) 個別課題：ガイダンスの調査・分析に基づくリードアクロスの手順と不確実性の評価方法の状況整理（山田 隆志（国立医薬品食品衛生研究所））

1-1) 国際ガイダンスの動向調査

OECDのグルーピングガイダンス：

国際的によく知られたリードアクロスのガイダンスとして、OECDのGuidance on Grouping of Chemicals, Second Edition（2014）がある。本文書は、動物試験を削減しながら、化学物質の有害性評価の効率化を図るためのOECDの取り組みの一環として作成された。2007年の初版、2014年の第2版では、OECD化学物質共同評価プログラムで得られた経験と既存の事例をもとに、アナログアプローチとカテゴリーアプローチ、定量的及び定性的なリードアクロス、AOP（Adverse Outcome Pathway, 有害性発現経路）の概念、リードアクロスの正当化などについて、その考え方や留意点がまとめられている。アナログアプローチとは評価対象物質とごく少数（1～2種類の参照物質など）によるリードアクロスで、カテゴリーアプローチはより広範な類似物質群をグループ化し、そこで特性に明らかな傾向がある場合に使用するリードアクロスである。

グルーピング法やカテゴリー評価は多くの場合、複雑かつケースバイケースの判断が必要である。最新の研究成果を取り入れることによりリードアクロスの課題を克服し行政受け入れ性をさらに向上させるため、OECDにおいては、上記のグルーピングガイダンス第2版の改訂作業が進行している。2024年3月の本ガイダンス第3版初案に対するコメント募集が行われ、本研究班からもコメントを提出した。OECD関係者によると、第3版は2025年7月の承認を目指しているとのことである。

第3版では、依然としてグルーピング法はまだ発展途上であることを指摘しつつ、最新情報として、OECDのIATA（Integrated Approaches to Testing and Assessment, 試験と評価のための統合的アプローチ）事例研究プロジェクト（IATA Case studies Project）から得られた教訓に加え、動物試験代替を検討するSEURAT-1、EU-ToxRisk、化学物質リスク評価加速化（APCRA）といったプロジェクト、米国環境保護庁（US EPA）のPer- and Polyfluoroalkyl Substances（PFAS）に関する国家試験戦略など関連する取り組みにおける事例に基づき補強される予定である。EUの化学品規制REACHにおいて要求される情報取得で最も使用されている手法の一つがリードアクロスであり、第3版ではREACHにおけるリードアクロスの使用経験から得られた知見も追加される。また、グルーピングのための生物学的類似性の立証や作用機序の提供における、NAM（New Approach Methods, 新たな評価手法）<sup>1</sup>使用の有用性などについてもまとめられる予定である。具体的なNAMとして、オミクス技術、ハイスループットスクリーニング（HTS、細胞内での表現型スクリーニング等）、ハイコンテンツアナリシス（HCA、細胞の画像解析技術）の他、(Q)SAR等のNAMが挙げられる。さらに、リードアクロスを実施するための手順/報告様式の改定が検討されており、第2版には含まれていなかった、問題の定式化（Problem formulation）、データギャップの特定や不確実性評価が加わる予定である。特に、不確実性評価については、IATA Case studies Projectにて提案された2種類の報告様式、欧州化学品庁（ECHA）のRead-Across Assessment Framework（RAAF）による評価要素、さらにSchultz et al.（2019）<sup>2</sup>によるリードアクロス実施における12種の不

<sup>1</sup> 化学物質のハザードとリスク評価に関する情報を提供し、動物の使用を避けることができるあらゆる技術、方法論、アプローチ、または組み合わせと定義され、in silico, in chemico, in vitroアプローチを含む（US EPA, Strategic Plan to Promote the Development and Implementation of Alternative Test Methods Within the TSCA Program, 2018; ECHA, New Approach Methodologies in Regulatory Science, 2016より）。

<sup>2</sup> Schultz TW et al., (2019) Assessing uncertainty in read-across: Questions to evaluate toxicity predictions based on knowledge gained from case studies. Comp Toxicol., 9, 1-11.

確実性に基づく質問票が例示される予定である。ただし、これらの不確実性評価は定性的あるいは低中高という半定量評価である。なお、代謝や分解さらにトキシコキネティクスを考慮するグループや、ナノ材料、UVCB (Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials、組成が不明または不定の化学物質、複雑な反応生成物及び生物材料) 等のグループに関しても改定が予定されている。

OECD のグルーピングガイダンスの重要性は言うまでもないが、これは汎用性に主眼を置いている。一方で、リードアクロスを適用する目的や規制要件、どのようなアプローチが許容されるか否かは、各国の規制当局が規定するものであり、規制におけるリードアクロス結果の受け入れ促進のためには、個々の規制に即した個別の実践的なガイダンスの作成も重要である。特に、リードアクロスの実施者やリードアクロス結果の提出者と、その結果を評価する規制側という、それぞれの立場から参照できる内容である必要があり、その作成には関連分野の専門家が集結し、詳細に議論する必要がある。

#### EFSAのリードアクロス使用に関するガイダンス：

欧州食品安全機関 (EFSA) は、食品や飼料中の化学物質のリスク評価においてリードアクロスをどのように一貫的に適用していくか、EFSA の管轄での評価に焦点を当てたリードアクロスのガイダンス案を作成している (以下、EFSA ガイダンス)。EFSA では 2024 年にガイダンス初案に対して、EFSA 内部、EFSA の各パネル及び EFSA 外部 (ECHA、欧州医薬品庁 (EMA)、JRC (Joint Research Centre)、OECD 等) と対象を絞った意見募集を実施し、本研究班からも意見を提出した。

EFSA ガイダンス案は、リードアクロスをデータギャップの穴埋めをする技術であり、有害性特定 (Hazard Identification) するものと位置づけている。もともと EFSA では、以下に示すように様々な評価分野においてリードアクロスの利用が言及されており、様々な評価目的に適用できる、柔軟かつ科学的根拠を提供する標準化されたワークフローとガイダンスが必要とされていた。

- Guidance on the establishment of the residue definition for dietary risk assessment (EFSA PPR Panel, 2016)
- Genotoxicity assessment of chemical mixtures (EFSA SC, 2019a)
- Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals (EFSA SC, 2019b)
- Scientific guidance for the preparation of applications on smoke flavouring primary products (EFSA FAF Panel, 2021)
- Guidance on risk assessment of nanomaterials to be applied in the food and feed chain: human and animal health (EFSA SC, 2021)
- Scientific guidance on the data required for the risk assessment of flavourings to be used in or on foods (EFSA FAF Panel, 2022)
- Guidance document on the impact of water treatment processes on residues of pesticides active substances or their metabolites in water abstracted for the production of drinking water (ECHA / EFSA, 2023).

EFSA 内外からのコメントを踏まえ修正された EFSA ガイダンス案「Draft guidance on the use of read across for chemical safety assessment in food and feed (EFSA, 2025)」が公開され、2025 年 3 月から 4 月までパブリックコメントが行われた。また、2025 年 3 月 27-28 日に開催された「Workshop on read-across: role and guidance in chemical risk assessment」での意見やパブリックコメントの結果を踏まえ、2025 年 7 月に EFSA の Scientific Committee での承認を目指した最終化が行われる予定である。

EFSA ガイダンス案では、リードアクロスはリソースを要する可能性のある方法論であると説明されており、目的によっては TTC アプローチや(Q)SAR 利用が適していることもあるとされている。この点はリードアクロスを利用する前提として非常に重要であり、我が国ではどのような場合においてリードアクロスの実施を選択するかを明確にする必要がある。

*In vitro* や *in vivo* の試験法ガイドライン試験と同様、リードアクロスの実施手順に含めるべき要素を明らかにし、手順を標準化することを EFSA ガイダンス案では強調している。手順の標準化は、手順に関わる不確実性を削減できるだけでなく、評価において着目すべき点を明らかにできる意味でも、我が国におけるリードアクロスの手順を検討する上で有用な考え方と言える。

OECD グルーピングガイダンス第3版改訂初案と同様、EFSA ガイダンス案においても、リードアクロスの信頼性を向上させるための NAM データの活用に関する記載が多くなされている。リードアクロスにおける NAM 活用の必要性については、評価目的や受け入れ可能な不確実性に依存する。そのため、今後は、実際の評価において NAM データが求められる事例について把握していく必要があると考えられる。

#### ECHA Read-across Assessment Framework (RAAF) :

欧州における化学物質の登録、評価、認可、制限を規定する法律 (Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals (REACH 規則) ) では、ヒトの健康及び環境の保全を目的として、化学品の登録を事業者が義務付けるとともに必要に応じた認可、制限をしている。REACH においては脊椎動物による試験は最終手段「Last resort」とされ、脊椎動物を用いた試験を最小限にすることを定めており、そのための手段として(Q)SAR、リードアクロス等の利用が推奨されている。REACH における事業者による「登録」においてリードアクロスは要求される情報取得に最もよく使用される方法であり、ECHA に提出されるリードアクロスについて一貫した評価を行えるように RAAF が作成された。

RAAF ではアナログアプローチには2つ、カテゴリーアプローチには4つのシナリオを設定し、それぞれに対応する仮説、評価要素を定め、シナリオに応じてリードアクロスを評価する枠組みを構築している(添付資料1)。不確実性についてもこの枠組みではシナリオ毎に評価ポイントが定められている。また、各評価要素に対して、以下に示す5段階での評価を行う。各シナリオにおいて、すべての評価要素が3以上であれば許容可能なリードアクロスであると判断される。

- 5 : 非常に高い信頼性で許容可能
- 4 : 中程度の信頼性で許容可能
- 3 : 十分な信頼性で許容可能
- 2 : 現在の形式では許容不可能
- 1 : 許容不可能

#### その他 :

その他の国際ガイダンス等の収集と調査にあたり、OECD のガイダンス文書 (GD) No.329「Overview of Concepts and Available Guidance related to Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)」(OECD, 2020、以下 GD329) の Appedix-3 (List and short description of the mapped guidance documents) に整理された2019年までの IATA 関連文書のリストを基礎資料とした。また、上記 GD 329 が公表された2020年以降文書として OECD、EFSA、ECHA 及び米国 EPA から公表されたガイダンス及び上記リストで「ongoing」となっていたものについて調査した(表1-1)。これまで対応するガイダンス文書がなかった「問題の定式化」について、新たに2023年に公開された EFSA Scientific committee の「Guidance on

protocol development for EFSA generic scientific assessments (EFSA SC, 2023) 」に問題の定式化に関する考え方や記載テンプレートが提示されている。

表 1-1 調査に基づく IATA に関連する国際ガイダンス等の文書数

分野横断的に使用する方法	国際ガイダンス数
IATA に関する包括的な内容	34
IATA 等に使用する情報に関する内容	40
データの品質確保/品質評価	17
情報の統合/評価	13
不確実性評価	23

表 1-2 に、IATA 及びリードアクロスに含まれる構成要素を大別し、IATA 及びリードアクロスとの関連の有無を示した。また、表 1-2 に示す主要な構成要素について調査対象の文書の整備状況やギャップを整理した。さらに、OECD ガイダンス文書 No.369 「Report on Considerations from Case Studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA)」 (OECD, 2022、以下 GD369) において OECD IATA Case Studies プロジェクトでのケーススタディを通じて、ガイダンスの必要性が指摘されている内容のうち、まだ解決されていないと考えられる内容についても整理した。

表 1-2 IATA 及びリードアクロスに関する構成要素と関連性及び既存ガイダンス数

構成要素		IATA との関連	リードアクロスとの関連	ガイダンス数	
IATA				5	
	Defined approach	●		8	
問題の定式化		●	●	1	
評価仮説の設定	AOP	●	●	5	
	MoA	●	●	3	
情報収集		●	●	9	
情報源	Omics	●	●	3	
	NAM	●	●	3	
	<i>in vivo</i> 試験	●	●	2	
	<i>in vivo/in vitro</i> 試験	●	●	1	
	<i>in vitro</i> 試験	●	●	3	
	<i>ex vivo</i> 試験	●	●	0	
	<i>in chemico</i> 試験	●	●	0	
	<i>in silico</i> 法	PBK モデル	●	●	5
		QSAR	●	●	10
リードアクロス		●	●	14	
個別データの品質評価		●	●	1	
	ガイドライン試験	●	●	1	
	非ガイドライン試験	●	●	2	
	GLP	●	●	2	
	OECD 調和テンプレート	●	●	2	

構成要素		IATA との関連	リードアクロスとの関連	ガイダンス数
	関連性評価	●	●	1
情報の統合	WoE	●	●	12
	不確実性の評価	●	(●)	
データギャップの穴埋め		●	●	0
	IVIVE ( <i>in vitro-in vivo extrapolation</i> )	●	●	0
不確実性評価	不確実性解析/評価	●	●	11

## 1-2) リードアクロスのワークフロー

リードアクロスには、いくつかの作業のステップがある。基本的な流れは共通しているが、統一されたものではなく、ステップ数やその名称は、技術ガイダンスや出版物によって異なっている。ここでは、近年の総説<sup>1)</sup>や各種ガイダンス参考に以下の形でリードアクロスのワークフローを整理する。まず、それぞれのワークフローを紹介する。

### Patlewicz G *et al.*, (2019)<sup>3</sup> の提唱したワークフロー :

- Step 1. 評価の目的の明確化
- Step 2. 評価対象物質のデータギャップ解析
- Step 3. 類似性仮説
- Step 4. 類似物質の特定
- Step 5. 類似物質の評価
- Step 6. データギャップ補完
- Step 7. 不確実性の評価

なお、このワークフローは、低分子有機化学物質にのみ適用されることに留意が必要である。混合物、ポリマー、無機物、ナノ物質を考慮する場合、ワークフローは異なる可能性がある。

### OECDグルーピングガイダンスにおけるワークフロー :

第2版までと比較して、第3版において推奨される実施手順では新たに「問題の定式化」、「データギャップ分析」及び、文書化の工程に含まれる「不確実性評価」が加わる。この手順は柔軟なものとなされるべきとされ、場合によっては複数のステップを繰り返す必要があるとされている。リードアクロスの行政受け入れ課題の一つである正当化 (Justification) について、含まれる要素が記されており (添付資料 2)、我が国におけるリードアクロスガイダンス案作成において参考となる。後述の EFSA ガイダンス案との大きな違いとして、「データギャップの穴埋め」の前に「方法の妥当性 (Adequacy) 評価」がある。第3版初稿では、リードアクロスのワークフローは、アナログアプローチとカテゴリーアプローチについて、以下のように整理されている。

#### ・アナログアプローチ

Step 0. Determine the problem formulation

Step 1. Determine the type and number of data gaps

<sup>3</sup> Patlewicz G *et al.*, (2019) Exploring current read-across applications and needs among selected U.S. Federal Agencies. Regul. Toxicol. Pharmacol., 106, 197-209.

- Step 2: Check whether the chemical is a member of an existing category
- Step 3: Analogue Identification
- Step 4: Gather Data for Analogues
- Step 5: Construct a matrix of data availability
- Step 6: Evaluation of the Analogue
- Step 7: Assess the adequacy of the analogue approach
- Step 8: Fill data gaps
- Step 9: Document the analogue approach, justification and remaining uncertainties

・ カテゴリーアプローチ

- Step 0: Determine the problem formulation
- Step 1. Determine the type and number of data gaps
- Step 2: Check whether the chemical is a member of an existing category
- Step 3: Develop category hypothesis to identify category members
- Step 4: Gather data for each category member
- Step 5: Construct a matrix of data availability
- Step 6: Evaluation of the category members
- Step 7: Assess adequacy of the approach
- Step 8: Fill data gaps
- Step 9: Document the category approach, justification, and remaining uncertainties

EFSAガイドランスにおけるワークフロー：

EFSA ガイドランス案においてリードアクロス手順、各手順での目的や実施概要等について整理したものを添付資料 2 に示す。OECD グルーピングガイドランス案と同様に、「Step 1. 問題の定式化」において、評価の目的及び受け入れ可能な不確実性を明確にする必要性が強調されている。また、リードアクロスの実施において重要となる「リードアクロスの仮説（なぜリードアクロスによってデータギャップの穴埋めが可能なのかの説明）」について「Step 2. 標的物質の特性化」で初期的な仮説を設定し、「Step 4. 類似物質の評価」で最終化することが明確化されている。

OECD のグルーピングガイドランス案と異なり、EFSA ガイドランス案には「方法の妥当性（Adequacy）評価」が含まれていない。この工程はリードアクロスの正当化（Justification）と重複する部分があるためと考えられる。EFSA のリードアクロス手順にも、OECD グルーピングガイドランス案に追加された「問題の定式化」及び「不確実性評価」が含まれている。

- Step 1. 問題の定式化
- Step 2: データギャップ解析
- Step 3: 類似物質の特定
- Step 4: 類似物質の評価
- Step 5: データマトリックスの構築とデータギャップの穴埋め
- Step 6: 不確実性評価

以上を踏まえ、本研究班では、食品健康影響評価で使用するリードアクロスのワークフローの主要ステップを個別課題（4）で定義したい。

### 1-3) 類似物質の探索と評価に関する分析

類似物質の探索・評価は、リードアクロスにおいて最も重要な工程であるが、リードアクロスに受け入れ可能な参照物質を特定することの難しさはよく指摘される場所である。Wu ら (2010)<sup>4</sup>は専門家主導の適切な類似物質を選択する決定木を提案した (図 1-1)。まず、[1] 標的物質の構造的特徴及び主要な官能基に基づく探索と、[2] 標的物質の代謝経路及び代謝物に関してデータベースや文献、部分構造、専門家判断さらに市販ソフトを用いて検索を行う。その後、毒性情報の有無を調べ、毒性情報を有する類似物質候補を探索し、構造、反応性、代謝及び物理化学的性状に基づき潜在的な類似性を分類する。この際、決定木を用いて適性 (「適している」、「説明付きで適している」、「事前条件を満たせば適している」、「適さない」) を分類する。Wu らの決定木には、包括的な MoA/AOP、(物理化学的性状で説明可能な部分もある) トキシコキネティクス (TK) 及び毒性プロファイルの類似性の観点は含まれていないが、その他の評価すべき類似性の観点 (構造的/化学的類似性、物理化学的性状、代謝パスウェイ、代謝物) が含まれている。ただし、図 1-1 の決定木には毒性に関連する警告構造の有無の評価をすることとなっており、この部分が部分的に MoA や毒性プロファイルの評価を包含するとも考えられる。

Wu らの方法で重要な点は、相違がある場合に、その相違が標的とする毒性エンドポイントにどのような影響を与えうるかを評価する点である。リードアクロスでの評価は、類似物質の探索の際に重要な「類似性」が注目されるが、その一方で「相違」について注目することも重要である。リードアクロスによる評価では、標的毒性エンドポイントに対する影響が十分に説明可能であり、かつ、リードアクロスの類推を行う上で保守的な相違で (参照物質の毒性が強くなる相違)、それを適切に正当化できるのであれば、相違は十分に受け入れ可能と考えられる。このことは、Blackburn and Stuard (2014)<sup>5</sup>や OECD ガイダンス案においても言及されている。Blackburn and Stuard (2014) では、リードアクロスの不確実性評価のための質問表を提案しているが、この中で、例えば標的物質と参照物質の類似性に関する不確実性の質問項目に「官能基及び関係する反応性に保守的な方向への違いがあるか?」、「予想される代謝パスウェイ/代謝率に保守的な方向への違いがあるか?」があり、保守的な相違を受容している。また、OECD ガイダンス案においても「受け入れ可能な相違」として説明されている。

<sup>4</sup> Wu et al. (2010) A framework for using structural, reactivity, metabolic and physicochemical similarity to evaluate the suitability of analogs for SAR-based toxicological assessments. Regul. Toxicol. Pharmacol. 56: 67-81.

<sup>5</sup> Blackburn K. and Stuard SB (2014) A framework to facilitate consistent characterization of read across uncertainty. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 68: 353-362.

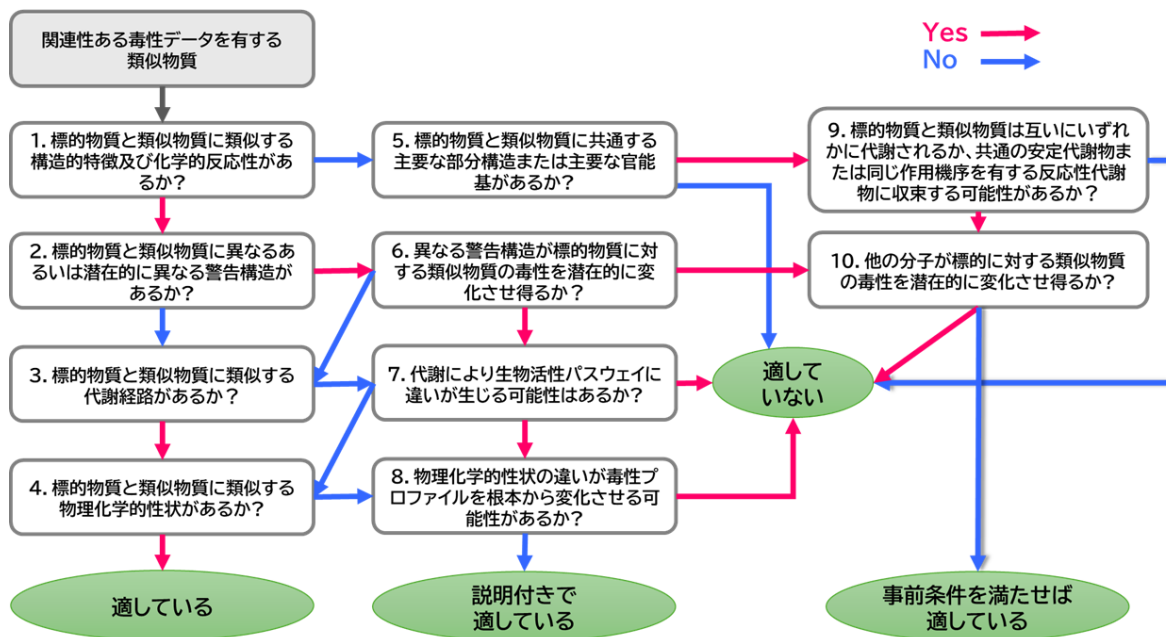


図 1-1 Wu *et al.* (2010) による類似物質の適正を分類する決定木  
(Wu *et al.* (2010) Fig. 2 を改変)

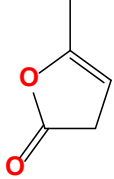
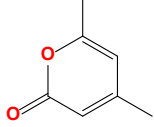
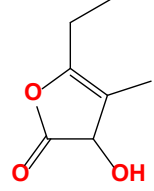
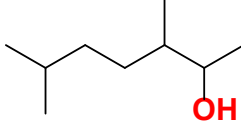
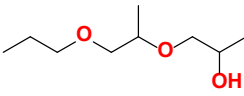
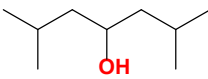
Moustakas ら (2022) <sup>6</sup>は、類似物質を探索する際に、官能基及び炭化水素フラグメント（注：基本骨格に相当）に基づきでクラスターを形成させた後、ADME の類似性に基づき更なるサブクラスターに分割し、特定のエンドポイントの特性に応じた物理化学的性状や毒性プロファイルに基づき専門家判断により選別することを提案し、遺伝毒性、皮膚感作性、光毒性、反復投与毒性、生殖毒性及び局所呼吸器毒性の6つのエンドポイント毎のリードアクロス評価の事例を紹介している。Moustakas ら (2022) の事例では、構造の相違に基づくリードアクロスに適した/適さない類似物質の事例が示されている。参考として、図 1-2 に食品安全評価に特に関連性が高い遺伝毒性、反復投与毒性及び生殖発生毒性 <sup>7</sup>の事例を示した。

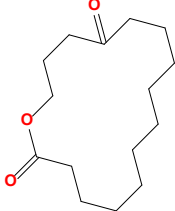
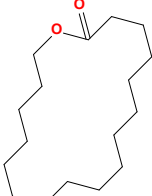
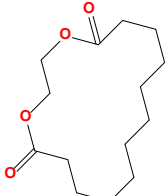
このように、類似物質の探索においては、相違をどのように説明できるかも重要と考えられる。

<sup>6</sup> Moustakas *et al.* (2022) An End Point-Specific Framework for Read-Across Analog Selection for Human Health Effects. *Chem Res Toxicol.*, 19;35(12):2324-2334.

<sup>7</sup> 論文では「Reproductive toxicity」で表記されているが、「includes fertility-related and developmental effects」との記載があるため、この報告書上では「生殖発生毒性」とした。

図 1-2 Mousatakas ら (2022) の事例における適している類似物質、適していない類似物質の例

エンドポイント	評価における考慮事項	例		
		標的物質	類似物質の例	理由
遺伝毒性	<ul style="list-style-type: none"> <li>共通の警告構造を有しているか?</li> <li>標的物質に複数の警告構造がある場合、類似物質も同じ警告構造を含んでいるか?</li> <li>共通の反応機構及び反応性を有するか?</li> <li>関連するモデルやプロファイラーの内容が標的物質と類似物質で一貫しているか?</li> <li>標的物質と同じ代謝経路で類似した代謝物を生成するか?</li> </ul>	 <p>CAS: 591-12-8</p> <p>フラン骨格の2位にケトン基、5位にメチルがある</p>	<p>適している例</p>  <p>CAS: 675-09-2</p>	基本骨格がフランより大きなピランであり、不飽和結合を含むが反応性は標的物質と同様である。骨格の違い及び不飽和結合の含有があっても反応性が異なることはない。
			<p>適していない例</p>  <p>CAS: 698-10-2</p>	構造的に類似しているが、標的物質にない水酸基があり、これは潜在的な反応性に影響を与える可能性がある。つまり、ケト-エノール互変異性により、水酸基がケトンに変換され、ジケトンを形成するが、これは標的物質の反応性と異なる。
反復投与毒性	<ul style="list-style-type: none"> <li>二次元構造の類似性 (官能基 (結合位置含む)、反応性) があるか? (可逆的変化の場合、非類似性が許容される可能性がある)</li> <li>基本骨格が類似しているか?</li> <li>ADME の類似性があるか?</li> <li>関連するモデルやプロファイラーの内容が標的物質と類似物質で一貫しているか?</li> </ul>	 <p>CAS: 1247790-47-1</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>分岐炭素鎖をもつ第二級アルコール</li> <li>α-メチルケトンを形成する可能性がある。</li> </ul>	<p>適している例</p>  <p>CAS: 2911-27-1</p>	エーテル結合が2つあり、構造的にはあまり類似していない。しかし、標的物質と同様にα-メチルケトンを生じうる、水酸基を有する。エーテル結合は不活性であると予測されるため機能的には標的物質と類似する。
			<p>適していない例</p>  <p>CAS: 108-82-7</p>	分岐炭素鎖をもつ第二級アルコールであるが、水酸基の位置が標的物質と異なり、この物質の水酸基は周囲に立体障害があるため、標的物質の水酸基とは反応性が異なる (標的物質の方が、反応性が高い)。

生殖発生毒性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 標的物質と同じ官能基を有し、類似した位置にあるか？</li> <li>• 類似した ADME 特性を担保するために、炭化水素骨格の類似性があるか？</li> <li>• 関連するモデルやプロファイラーの内容が標的物質と類似物質で一貫しているか？</li> </ul>	 <p>CAS : 38223-29-9</p>	<p><b>適している例</b></p>  <p>CAS : 109-29-5</p>	<p>エステル基がひとつのみの大環状化合物であり、標的物質と比べケトンが欠落しているのみである。標的物質中のケトンは独立した位置にあり、毒性懸念があるとは考えられない。</p> <p>二つのエステル基をもつ大環状化合物であるが、この2か所で加水分解される可能性があり、標的物質とは異なる代謝物を形成するため、類似物質としては不適切である。</p>
		<p>エステルとケトン基を有する大環状化合物である</p>	<p><b>適していない例</b></p>  <p>CAS : 54982-83-1</p>	

#### 1-4) 不確実性の評価に関する分析

化学物質リスク評価における不確実性は、評価に関連する多くの変数についての正確な知識の欠如を指し、評価の厳密性や正確性を低下させるものである。リードアクロスのそれぞれのステップに一定の不確実性がある。

不確実性評価は、リードアクロスの正当性を判断する材料となる。また、不確実性の要因の中には、追加情報を収集すれば解決するものが含まれる可能性があり、それを明らかにし対処すれば、不確実性を低減できる。さらに、不確実性はリードアクロスによる予測が特定の規制目的に許容できるかどうかの一つの指標となる。したがって、不確実性評価は、リードアクロスを正当化し、その結果の行政的受け入れを判断するために極めて重要である。

近年の研究で、不確実性を決定する主な要素は4つに分類された Schultz et al. (2019)<sup>2</sup>。一つ目は、リードアクロスの規制上の使用目的で、これとリードアクロスで予測するエンドポイントとの関連性により、不確実性の許容水準が決定される。

二つ目に、参照する試験データの質が挙げられ、データギャップを埋めるためには、十分な質や関連性がなければならない。

三つ目にリードアクロスの論拠に関する不確実性が挙げられ、i) 毒性に至るメカニズムの妥当性、ii) 裏付けとなるエビデンスの完全性、iii) 裏付けとなるデータの頑健性、及び iv) 科学的証拠の重み付け (Weight-of-Evidence) が考慮される必要がある。

四つ目はリードアクロスの正当化、特に類似性仮説の正当化であり、評価対象物質と参照物質の様々な観点からの類似性についての議論が不確実性を低減する。特に複雑な毒性エンドポイントを対象とする場合、不確実性を適切に低減するためには、化学構造だけでは類似性の妥当性の説明として不十分な場合、NAMを活用することで不確実性を削減できる。

OECDのガイダンス案はまだ最終化されていないものの、リードアクロスに内在する不確実性を評価することの重要性を強調するとともに、評価対象物質と参照物質の特性評価、不確実性のレベル分け(低、中、高)、許容レベルの定義および文書化の観点から整理されている。WoEやNAMs、関連ツールの活用を通じて不確実性を低減させることにも焦点が当てられている。EFSAガイダンス案(2025)<sup>8</sup>では、リードアクロスの不確実性はリードアクロスのワークフローの各ステップに内在しており、評価対象物質と参照物質の特性評価、類似性の正当化、データの質、文書化など多岐にわたるとされている。それぞれの不確実性は、低、中、高の3つのレベルに半定量化して評価される。しかし、現段階では不確実性の各レベルについて、詳細な定義づけはなされていない。評価の目的のために許容できる不確実性のレベルは、問題の定式化の段階で定義される。NAMsからの追加データを組み込むことなどで、不確実性を許容できるレベルに低減することも検討される。ただ、不確実性が高すぎて目的を満たせない場合、評価対象物質の追加試験が必要になる可能性があることが述べられている。不確実性の文書化は重要であり、そのためのテンプレートも提供されている。本テンプレートでは、19の不確実性要素が挙げられており、それらを実評価するため、質問/説明および標準化された手順がそれぞれ関連付けられている。

<sup>8</sup> European Food Safety Authority (EFSA), (2025) Draft guidance on the use of read-across for chemical safety assessment in food and feed. <https://connect.efsa.europa.eu/RM/sfc/servlet.document/download/069Tk000009xQEDIA2>

(2) 個別課題：リスク評価機関におけるリードアクロスの活用状況の把握及び食品健康影響評価における適用可能範囲の提案（山田 隆志（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）、小野 敦（国立大学法人 岡山大学））

2-1) リスク評価機関におけるリードアクロスの活用状況の把握

2-1-1) リードアクロスの活用状況の収集と調査

表 2-1 に示す①～④を調査対象として、反復投与毒性、生殖発生毒性及び遺伝毒性を中心に活用事例整理を実施した。①は最も先進的にリードアクロスを使用してきた米国 EPA を対象としており、多様な目的でリードアクロスが利用されている。②は OECD 加盟国による一般化学品の高生産量物質の初期有害性評価を目的とした、リードアクロス活用事例である（リードアクロス活用事例：120 件）。一方、OECD 加盟国による③で実施されているリードアクロスは、AOP や NAM、Physiologically-Based Kinetic (PBK) モデル等、近年、欧米で活発に利活用の検討が進められている評価技術を活用したリードアクロス事例となっており、②で行われていた方法に新たな観点が追加されたものである。④は食品健康影響評価における適用領域の把握のために、食品安全の分野ですでにリードアクロスを利用してきた EFSA における活用事例の調査を実施した。なお、利用目的に応じて、リードアクロスで検討すべき情報の詳細レベルや受容できる不確実性が異なるため、各事例におけるリードアクロスの結果の利用目的も調査対象とした。

表 2-1 リードアクロスの活用事例調査の調査対象

No.	調査対象	リードアクロス結果の利用目的
①	米国 EPA <ul style="list-style-type: none"> <li>Patlewicz et al. (2019) Exploring Current Read-across Applications and Needs Among Selected U.S. Federal Agencies. Doi:10.1016/j.yrtph.2019.05.011.</li> <li>米国 EPA の Web サイトにて[read across]をキーワードとして検索.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>有害物質規制法（TSCA）における新規化学物質評価</li> <li>初期有害性評価</li> <li>暫定的毒性値設定<sup>9</sup>における基本情報提供 等</li> </ul>
②	OECD Cooperative Chemicals Assessment Programme の高生産量物質の初期評価（SIDS）	<ul style="list-style-type: none"> <li>初期有害性評価</li> </ul>
③	OECD Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) Case Studies Project	<ul style="list-style-type: none"> <li>スクリーニング/優先順位付け</li> <li>特定の有害性リスクの可能性評価</li> <li>規制目的利用</li> </ul>
④	EFSA <ul style="list-style-type: none"> <li>EFSA の Web サイトにて[read across]をキーワードとして検索.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Acceptable Daily Intake (ADI)/Tolerable Daily Intake (TDI)設定</li> <li>安全マージンの設定</li> <li>遺伝毒性評価</li> </ul>

表 2-1 に示した調査対象における活用事例の調査において、実際の評価事例におけるリードアクロスの正当化に用いられた要素を表 2-2 に整理している。

- ① 米国 EPA における活用事例：米国 EPA の HPV チャレンジプログラムで実施されていた事例以外の活用事例については、現時点では詳細はほとんど得られていない。
- ② OECD SIDS プログラムにおける活用事例：OECD Screening Information Datasets (SIDS)プログラムにおける初期有害性評価を目的としたリードアクロスでは、主に化学構造、物理化学的性状、毒性に基づきリードアクロスの妥当性が説明されていた。ケースバイケースで環境中運命、情報がある場合には作用機序や化学物質の機能、UVCB の場合には製造工程や不純物の情報が利用されていた。正当化は、これらの要素に関する共通性や一定パターンの変化で説明されるものが主であった。ま

<sup>9</sup> Basic Information About Provisional Peer-Reviewed Toxicity Values (PPRTVs)

た、各要素の正当化に利用される情報として、QSAR による予測結果が利用される事例もあった。一方、化学構造における非共通性部分による影響についてはほとんど説明されておらず、不確実性評価も行われていなかった。

- ③ OECD IATA Case Studies Project における活用事例：OECD の IATA Case Studies Project では、ケーススタディを通じて、規制当局における IATA の使用経験を増やすことや、ガイダンス改定が必要な要素の抽出等を目的としている。このプロジェクトでは、OECD 加盟国が異なる利用目的で実施した実施したケーススタディについて、他の加盟国によるレビューが実施され、ケーススタディから得られた教訓等も整理されている。このプロジェクトには、リードアクロスのケーススタディも含まれている。本調査では、活用事例を調査するエンドポイントとして、反復投与毒性、生殖毒性、発生毒性及び遺伝毒性の他、明確な AOP を用いた評価事例のある神経毒性及びパーキンソン病を対象とした。これらのケーススタディでは、*in silico* ((Q)SAR) 及び *in vitro* の NAM や *in vitro-in vivo* 外挿 (IVIVE)、PBK モデル等を活用したリードアクロスが報告されている。評価エンドポイント、該当する場合カテゴリーの定義及びカテゴリーメンバーの構造の他、実施目的、評価戦略、仮説、正当化の説明（化学的同一性と組成 | 化学構造 | 組成 | 不純物 | 官能基、物理化学的性状、毒性パターン、動態/ ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion)、MoA (Mode of Action)/AOP、化学的/生物学的作用)、全体としての結論、不確実性評価、類似物質の検索方法などの観点から情報を整理した。こうした技術を活用した事例については、別途、具体的な評価内容（詳細な不確実性評価を含む）を整理している。

この OECD プロジェクトでは詳細な不確実性評価も実施されており、リードアクロス特異的な不確実性評価項目として、以下が挙げられていた。

- リードアクロスの正当化に使用したメカニズムの不確実性
- 構造的特徴と有害影響との関係性に関する不確実性
- 仮説を支持する所見の類似性の程度に関する不確実性
- 仮説とヒトあるいは環境との関連性に関する不確実性
- 仮説を支持するデータ量と影響の一貫性に関する不確実性
- リードアクロスに使用されるエンドポイントデータの質に関する不確実性
- (Q)SAR 予測結果を仮説支持に使用した場合、その信頼性に関する不確実性

- ④ EFSA における活用事例：食品安全分野におけるリードアクロスの適用範囲を把握するために、食品安全分野のどの領域（例：食品接触材料、香料、添加物等）のどのような目的に利用されているかを調査した。受け入れ可 3 件、不可 4 件の事例を対象とし、評価目的、評価エンドポイント、リードアクロスの理由、評価対象物質、参照物質/カテゴリー、（記載されている場合）正当化の説明、結果などの観点から情報を整理した。なお、調査した範囲では類似物質の検索方法の記載はなかった。これらのリードアクロスが活用されていた事例は、新たに発生したリスク (Emerging risk)、食品接触材料、食品添加物、香料、新規食品などの領域における、ADI/TDI の設定、リスク評価、安全マージンの設定、遺伝毒性評価であった。

表 2-2 リードアクロスの正当化に利用されていた要素

要素	備考
<b>■グループの正当化（妥当性は下記の要素を類似性や傾向で説明できるか否か）</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 化学構造に関する説明（共通性、受容できる非共通性範囲/グループ対象とする範囲）</li> </ul>	

<ul style="list-style-type: none"> <li>共通代謝物・分解生成物に基づくリードアクロスの場合、共通の代謝物・分解生成物</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>構造/代謝物・分解生成物の非共通性がリードアクロスの結果に影響を与えないことの説明がガイダンス等で求められているが、説明されている事例は少ない</li> <li>非共通性のある物質にデータがある場合、そのデータに基づき説明されている場合がある（非共通性部分があってもエンドポイントの結果は変わらない等）</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>グループに適用される作用機序または AOP</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>作用機序や AOP の情報がある場合は必須</li> <li>作用機序や AOP を説明する情報として、OECD IATA Case Studies Project の事例では種々の NAM を利用</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>物理化学的性状の類似性</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>評価対象エンドポイントに関連のある物理化学的性状が主な対象</li> <li>一貫性のある変化や範囲が必要とされる。</li> <li>ただし、範囲の規定方法についてはガイダンス等がない</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>評価対象エンドポイントと関連のあるエンドポイントにおける一貫性のある結果または一貫性のある変化</li> </ul>	—
<ul style="list-style-type: none"> <li>バイオアベイラビリティ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>OECD SIDS プログラムでは物理化学的性状で説明する事例がある</li> <li>OECD IATA Case Studies Project の事例では、カテゴリ内で十分なデータがない場合、種々の NAM を利用</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>UVCB 等の場合、製造工程等の共通性/化学的同等性</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>特に EFSA における評価で物質同等性が示せない場合にリードアクロスが受け入れられない事例が複数あった—</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>不純物の情報と評価結果への影響</li> </ul>	不純物による影響がある場合
<ul style="list-style-type: none"> <li>グループの正当性を説明する各要素に対する不確実性の評価</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>グループに含める物質の調査に使用したデータベース、検索条件</li> </ul>	説明されている事例は多くなかったが、評価の任意性を排除する因子として重要と思われる。
<ul style="list-style-type: none"> <li>情報収集に利用したデータベース、検索条件</li> </ul>	
<b>■データギャップ補完（穴埋め）方法の正当化</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>参照物質のデータ品質</li> </ul>	—
<ul style="list-style-type: none"> <li>評価対象物質に適用する参照物質で認められた影響の明確な説明（特に、反復投与毒性等、複数エンドポイントがある場合）</li> </ul>	—
<ul style="list-style-type: none"> <li>グループの妥当性で説明された内容と評価対象エンドポイントとの関係</li> </ul>	—
<ul style="list-style-type: none"> <li>具体的に予測を行う際の方法の明確な説明</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>予測を行う際、最も構造が類似した物質の結果を用いるのか、定量的な傾向分析による定量的な結果を用いるのか、ワーストケースの結果を用いるのか、等</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>トキシコキネティクスデータを考慮した IVIVE 等の説明</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>In vivo</i> 毒性エンドポイントの定量予測において、<i>in vitro</i> 試験濃度を用いる場合</li> </ul>

## 2-1-2) リードアクロス活用事例の詳細な分析

### リードアクロスの仮説について

リードアクロスの仮説は、参照物質の特定のエンドポイントの情報に基づき標的物質のデータギャップの穴埋めができる理由を説明する、類似物質/参照物質の探索方法等の根拠を示すもので、通常、官能基の反応性、作用機序、代謝の類似性などが挙げられる。詳細な記載がある OECD IATA Case Studies を中心とした事例のリードアクロスの仮説に含まれた要素を分析した結果、最も高頻度の要素は毒性の種類であり、どの毒性に対して適用できるかを明らかにしていた。次いで頻度が高かった要素は構造/化学的特性、動態/ADME及びMoA/AOP・生物活性の3要素であった。構造/化学的特性が仮説に含まれていな

かったのは、特定の代謝生成物が毒性に寄与することが述べられていた事例のみであり、構造/化学的特性は仮説において重要な要素と考えられた。動態/ADMEについては、代謝が毒性に寄与するあるいは寄与しないことを言及している事例がある他、バイオアベイラビリティが説明されていた。また、物理化学的性状の情報を用いて動態/ADMEを説明している事例もあった。動態/ADMEの頻度が高かった理由として、今回の調査では反復投与毒性、生殖発生毒性等を中心に調査していることにも起因している可能性がある。MoA/AOP・生物活性については、MoA/AOPが既知の場合にはリードアクロス実施における強い根拠となるため重要と考えられる。ただし、今回の分析で頻度が高かった要因として、分析対象に多く取り上げたOECD IATA Case Studiesの事例はNAMの利用促進のケーススタディであるという側面もあるため、MoA/AOPが既知の事例が多く扱われていたとのバイアスがある可能性がある。

### 類似物質の探索について

類似物質は参照物質となる物質の候補である。類似物質の探索/選定方法についての詳細な分析を行った。前段の調査結果の中から個別の事例を参照し、リードアクロスにおいてどのように参照物質として選定しているか、具体例を分析した。

OECD HPV プログラムでは、スクリーニング評価として、酸クロライド基 (-C(=O)Cl) を持つ4物質をカテゴリー化し、当該物質のデータがない場合にはその加水分解生成物のデータを用いて反復投与毒性、遺伝毒性及び生殖発生毒性を評価している例がある。酸クロライド基という共通する反応性部分構造を持ち、いずれも速やかに有機酸と HCl に加水分解される他、類似の物理化学的性状(液体、低融点)、揮発性及び沸点が分子量に依存する傾向を持ち、さらに毒性学的特性(接触点における重篤な刺激性はあるが全身吸収が想定されない)に基づき類似性があると判断されている。

二重結合の位置や分岐の有無の異なる Butene の4種の異性体及びその混合物(同じ化学式)をカテゴリーとして評価した OECD HPV プログラムの事例では、物理化学性状の類似性に基づき動態も類似すると予想され、3物質での反復投与毒性試験の最高用量において、ごく軽微な毒性しか示さないことを根拠としている。

C2-C4 脂肪族チオール類の OECD HPV プログラムの評価では、チオール基 (-SH) を有し、C2-C4 の直鎖又は分岐脂肪族炭素鎖を有する物質が対象となり、物理化学性状(水溶性、沸点、蒸気圧、logPow)の他に、3種の直鎖状物質の3種の水生生物による生態毒性試験の結果に一定の傾向があり、生態毒性に関する QSAR 予測モデル(EcoSAR)の結果もこれを支持していること等が考慮されている。

EFSA において、香料の ADI 設定のための評価において、3,7-Dimethylocta-1,5,7-trien-3-ol の90日間反復投与毒性データを Linalool のデータからリードアクロスすることが提案されたが、両物質は、アリル位の第三級水酸基が共通するものの、特異な物理化学的性質を持つ共役末端二重結合を Linalool が持たず、物質全体としての類似性が不十分とされた。全体構造の類似性、特徴的な部分構造の共有が共に重要と考えられる。

ベンゾフェノンを中心に4-ヒドロキシベンゾフェノン、4-メチルベンゾフェノンをリードアクロスした食品接触材料に関する緊急助言を行うための EFSA の評価事例では、全体的な構造類似性や、4-ヒドロキシベンゾフェノンがベンゾフェノンの主要代謝物であることが考慮されていると考えられる。なお、4-メチルベンゾフェノンの評価においてはベンゾフェノンからのリードアクロスであることを理由に曝露マージン(MoE)の計算に係数2を使用していた。

OECD IATA Case Studies Project の分岐脂肪族カルボン酸 2-Ethylbutyric acid のリードアクロスでは、特定のデータベースに対して不飽和側鎖、複数のカルボン酸、定義外の官能基あるいは芳香環を有する物質を除外して、バルプロ酸、2-Ethylhexanoic acid を含む2位に分岐アルキル側鎖を有する脂肪族カル

ボン酸を検索して類似物質としてカテゴリー化していた。物理化学性状の類似性の他、*in silico* NAM（構造アラートのプロファイリング、代謝物予測）や、AOPに基づく *in vitro* NAM（脂質代謝異常に関連する受容体を介した転写活性化能、細胞毒性、脂肪蓄積性等）を実施し、正当性を示した。

エストロゲン活性のスクリーニング評価事例では、様々な化学物質のインベントリーからフェノール性の水酸基を有する物質を抽出したプールデータベースを作成した後、エストロゲン活性が強いとされる物質を用い、局所類似法 (LSM: Local Similarity Method) 及びグローバル類似法 (GSM: Global Similarity Method) の2種類の方法に基づき類似物質が探索されていた。

エチレングリコールメチルエーテル関連物質は、代謝により生殖毒性を示すメトキシ酢酸またはエトキシ酢酸を生成することから、これらを類似物質としてカテゴリー化し、炭素鎖長による傾向を関連付けて論じている事例もある。

また、OECD IATA Case Studies Project において Health Canada が提出した事例では、組成が不定の物質 UVCB (Substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) の例として、多様な置換基を持つジフェニルアミンを置換基により幾つかのサブグループに分けて反復投与毒性の評価を行った。

これらの事例から、リードアクロスにおける物質の類似性は(1) 全体構造の類似 (2) 反応性部分構造の類似 (3) 生物学的作用の類似 (4) 共通代謝物の生成に大別できると考えられる (図2-1)。

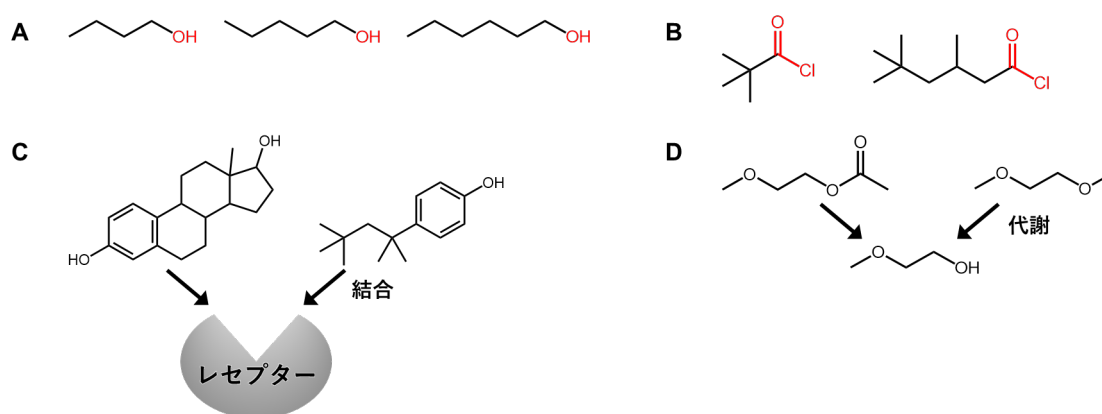


図 2-1 類似物質の考え方

A: A: 全体構造の類似、構造アナログ。B: 反応性部分構造の類似。C: 同様の生物学的作用を示す物質。D: 代謝、分解により共通の分子になる物質。

### リードアクロスの正当化について

詳細な記載があるOECD IATA Case Studies Projectを中心とした事例において、リードアクロスの正当化に用いられた要素について分析した結果、仮説で説明されていた項目が包含され、他の関連のある項目がさらに追加され、説明されていた。説明内容には、使用したデータの生成方法の概略及び結果が含まれていた。ガイドライン等の標準化が行われていない方法を用いている場合は、必要に応じてデータ生成方法の妥当性も説明され、具体的には、方法選択の根拠（例：AOPに基づく選択、*in vivo*応答との関連が既知である等）、応答の正当化（例：陽性対照における応答）が説明されていた。さらに、得られた結果の類似性、一貫性、一致性が説明され、類似性、一貫性がない場合にはその理由が説明されていた。*In vitro* NAMを用いた事例で、PBKモデルやIVIVEが使用された場合には、それらの方法の正当化の説明も行われていた。なお、「中」以上の不確実性項目があったいずれの事例においても、最終的な評価の不確実性は「低」あるいは「低/中」であった。

不確実性が高い傾向にある要素について不確実性評価が行われていた今回調査対象とした事例のうち、低中高の半定量評価において「中」以上の不確実性の内容には以下があった。なお、OECD IATA Case Studies Projectの事例における不確実性評価では、不確実性評価の個別項目の評価において「低/中」、「中-高」等の表記があり、3段階で評価できない場合に現実的な選択がとられていた。「中」以上の不確実性項目があったいずれの事例においても、最終的な評価の不確実性は「低」あるいは「低/中」であった。

[1] データの数/一貫性に関するもの

- ◆ 標的エンドポイントの実験データ密度が低い（例：1物質のみ）の場合（アナログアプローチと同様になってしまうとの理由）
- ◆ カテゴリーメンバー内あるいは参照物質と標的物質の間で、一貫性がないデータがあり、その説明ができない

[2] AOP そのものあるいは MIE (Molecular Initiating Event) /KE (Key Event) 検出試験に関連するもの

- ◆ AOP の OECD ステータスが「Accepted」ではない
- ◆ AOP を用いたリードアクロスにおいて、MIE や KE のデータがあっても、AO (Adverse Outcome : 有害事象) が *in vivo* 指標であり、そのデータが欠落している
- ◆ *In vitro* の結果において細胞内取り込みの評価ができない
- ◆ サポートデータに関する不確実性について、AO 知見の不一致がある

[3] 動態に関するもの

- ◆ シミュレーションで類似性が示されていても、官能基の違いによるトキシコキネティクス (TK) の違いの可能性が払拭できない
- ◆ 物理化学的性状において、標的物質の logPow が標的物質より相対的な低さ、結果として標的への到達性への不確実性がある（この事例は脳が標的であるためと考えられる）

[1]では、物質数が多く、当該カテゴリー内にある物質を用いて毒性等の傾向確認できるカテゴリーアプローチと比べ、物質数が少なく傾向の確認ができないアナログアプローチ（傾向の確認ができない）は方法論として不確実性が高くなると考えられる。また、一貫性がないデータについては、その内容によってはリードアクロス全体の評価に影響を与えうる可能性がある。[1]に挙げられていた項目に関しては、複数の側面からの類似性を示すなどの証拠を重ねることで不確実性の低減は可能と考えられる。ただし、評価エンドポイントそのものや、AOが一致しない場合は、参照物質の選定からやり直す必要がある可能性がある。

[2]の中で、AOPのOECDでの承認の有無を取り上げる事例が複数あったことから、多くの科学的レビューが行われていること必要性を示すものと考えられる。現状、OECDで承認されていないAOPは多いため、承認されていないAOPを用いる場合は、品質の高い*in vivo*データのある陽性対照物質の知見などで十分な説明をすることも重要になる。AOPが未承認であることはMIE/KE検出試験の選択にも影響を与え、不確実性を高める要因として扱われていた。ただし、ガイドライン等に標準化されていない*in vitro*試験であっても、十分な文書化が行われていること、複数の試験系で知見が得られていること、及びそれらの結果に一貫性があることで、そのデータ品質の不確実性は「低」で扱われていた。

[3]に示す2つの内容を取り上げたのは、同一のアナログアプローチ（1つの参照物質のみ）の事例であり、傾向の把握ができないアナログアプローチの事例であったためと考えられた。

## 2-2) 食品健康影響評価におけるリードアクロス適用可能範囲の提案

食品安全委員会で扱う品目のうち、リードアクロスが適用可能もしくは必要な分野について検討した。以下に整理する。

食品安全委員会では、食品衛生法、農薬取締法などの法令のもとで、食品添加物、農薬、動物用医薬品、器具・容器包装物質、汚染物質などのリスク評価が実施されている。リスク評価を必要とする物質の範囲は広く、化学的に多様である。

個々の法規制では、汚染物質を除きリスク評価に必要な毒性データ及び曝露予測値の導出に必要な情報の取得はその製品を製造販売する事業者がその責任を負う。製品となる原体化合物そのもの以外の代謝物や分解物については、従来は一部の物質を除き毒性情報の提出は求められていないが、近年、国際的には、全ての代謝物や分解物についてリスク評価に基づく管理を行うべきであるという考え方が主流となってきている。しかし、ほとんどの代謝物や分解物については、標品の入手が難しく毒性試験の実施は困難であることから、毒性データとして実試験結果の代わりに(Q)SAR やリードアクロスを適用したリスク評価が求められている。

また、新規開発ではなく、すでに市場に出回っている化学物質や汚染物質のように、リスク評価に必要なデータの責任を負う特定の事業者が存在せず、毒性情報が不足する化学物質が数多くある。これらについて、国側が一定期間内にリスク評価を行う必要性が生じている。このようなシナリオ下では、試験にかかる経済的及び時間的コストや動物福祉を考慮し、類似した物質をグルーピングして包括的にリスク評価を行うことを検討しなければならない。

このような国際的状況、行政的な要請及び上記のリードアクロスの活用事例調査などを踏まえて、食品安全委員会が実施するリスク評価（食品健康影響評価）におけるリードアクロスの適用可能範囲として、

- ・農薬代謝物・分解物の毒性評価
- ・器具・容器包装化学物質のポジティブリスト化に伴う既存化学物質の毒性評価
- ・毒性情報の限られている汚染物質の毒性評価

などの場面が考えられる。対象となる毒性エンドポイントとして遺伝毒性及び反復投与毒性が考えられる。

さらに、

- ・*In silico* 変異原性評価結果の信頼性評価

においてもリードアクロスの考え方を適用することは重要であると考えられる。

農薬代謝物については、一つの農薬に対して、場合により 10 を超える代謝物があり、試験に必要な標品の入手自体が困難である。多くの農薬代謝物は親物質と互いに類似しており、親物質の試験データを用いたリードアクロスの適用により代謝物の毒性が親物質の毒性レベルとほぼ同等またはそれより弱いと判断出来れば、その結果をもとにその後のリスク評価を実施可能である。しかし、親物質より毒性が強い代謝物も存在するため、注意が必要である。グルーピングの基準を検討していく必要があると考えられる。

器具・容器包装化学物質のポジティブリスト化に伴い、市場に流通済みの約 2,000 物質について新たに毒性評価が必要になると想定される。器具からの溶出量によるカットオフをした上で、溶出量が多いと予測される物質は反復投与毒性を評価しなければならないが、毒性データがないすべての物質について毒性試験を実施することは難しい。リードアクロスを用いて、類似した物質群を包括的に評価することが求められる。

食品汚染物質のリスク評価においては、データ取得の責任を負う特定の事業者は存在せず、食品安全委員会で独自に既存データを収集してリスク評価を行う必要がある。したがって、既存の毒性試験データが不足する物質に対してはリードアクロスをを用いた評価のあり方について議論を進めておくことが望ましい。

いくつかの場面で導入が始まっている *in silico* 変異原性評価では、(Q)SAR の予測結果の信頼性評価が必要になる。実試験データがある類似物質を(Q)SAR が正しく予測できるか、局所的な予測性能を確認することは重要な評価項目のひとつである。その鍵となる類似物質の特定は、リードアクロスにおける類似物質の特定と共通する部分がある。いずれの場面も、リードアクロスを実施して評価資料を提出する事業者側と、その評価資料の提出を受け妥当性や受け入れ性を評価する行政側の双方に対応していく必要がある。

(3) 個別課題：NAMの開発状況の調査とNAMを活用した類似物質の同定の信頼性向上に関する研究（安部 賀央里（公立大学法人 名古屋市立大学）、小野 敦（国立大学法人 岡山大学）、吉成 浩一（静岡県公立大学法人 静岡県立大学）、山田 隆志（国立医薬品食品衛生研究所））

3-1) NAMの開発状況の調査（安部賀央里（名古屋市立大）、山田隆志（国立医薬品食品衛生研究所））及びKEの*in silico*モデルを用いたリードアクロスの信頼性評価手法の検討（安部賀央里（名古屋市立大））

本課題では、NAMの開発状況と利用可能性を調査するため、類似物質の同定にNAMがどのように活用されているかを、OECDのIATA Case Studies Projectの評価文書や公表されている研究論文を用いて調査した。

### ① *In silico* NAMツール

リスク評価に必要とされる主要な物理化学的及び毒性エンドポイントに関連する、数多くの*in silico*ツールがフリーで利用可能である。米国 National Toxicology Program の Integrated Chemical Environment (ICE) は、キュレーションされた*in vivo*及び*in vitro*試験データに加えて、化学物質の特性、体内動態及び毒性を予測する様々な*in silico*ツールを提供している。

他の*in silico*システムの例としては、OECD QSAR Toolboxがあり<sup>10</sup>、(Q)SARモデルやリードアクロスによってさまざまな毒性エンドポイントを予測するための汎用性の高い一連のプログラムを提供する。グルーピングに有用な、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）や代謝予測機能を備えている。

EUのJoint Research Centreは、利用可能な種々の(Q)SARモデルのコレクションを提供している<sup>11</sup>。ECHAは、(Q)SARモデルの使用法と結果の報告方法に関する実用的なガイドを提供している<sup>12</sup>。

英国にある欧州バイオインフォマティクス研究所（EMBL-EBI）は、化学物質や医薬品の生物活性情報に関する大規模データを収載するデータベースであるChEMBLを運営している<sup>13</sup>。米国のEPAを含む複数の連邦機関は、化学物質の毒性を予測するためのハイスループット試験の大規模データベースTox21を提供している<sup>14</sup>。いずれも生物活性をエンドポイントとした*in silico*モデルの作成に利用されている。

### ② *In vitro* NAM試験法

NAMの開発と検証は海外では精力的に進められており、多くのリソースが利用可能である。例えば、EURL-ECVAMは、非動物実験法に関する報告書（Non-animal Methods in Science and Regulation）を毎年発行している。EFSAはNAMの支援ツールとして、曝露及びトキシコキネティクス-トキシコダイナミクス解析の拡張のためのウェブツール（TK Plate）を提供している。

EUでは化粧品成分の動物実験が禁止されているため、化粧品成分を評価する上でNAMの使用が決定的に重要になっている。消費者安全科学委員会（Scientific Committee on Consumer Safety, SCCS）は最近、利用可能な*in vitro* NAMのリストをガイダンス文書（SCCS/1647/22）にまとめており、継続的に更新される見込みである。

<sup>10</sup> [www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm](http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm)

<sup>11</sup> <https://data.jrc.ec.europa.eu/dataset/e4ef8d13-d743-4524-a6eb-80e18b58cba4>

<sup>12</sup> [https://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg\\_report\\_qsars\\_en.pdf/407dff11-aa4a-4eef-a1ce-9300f8460099](https://echa.europa.eu/documents/10162/13655/pg_report_qsars_en.pdf/407dff11-aa4a-4eef-a1ce-9300f8460099)

<sup>13</sup> <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>

<sup>14</sup> <https://ncats.nih.gov/research/research-activities/Tox21/assays>

### ③ AOPと事例研究

AOP情報は、類似物質の正当化に資するNAMの選定に対して有用であると考えられる。OECDが承認したすべてのAOPはOECDウェブサイト<sup>15</sup>で参照できる。AOP wiki<sup>16</sup>は、OECDで開発中のAOPを収載している。また、OECD IATA Case Studies Projectでは、AOPにより支援されたリードアクロスの事例研究が公開されている<sup>17</sup>。

### ④ OECD IATA Case Studies Projectの調査

OECD IATA Case Studies Projectの評価文書を調査対象として、より詳細なNAMの開発状況調査を実施している。IATA Case Studies Projectでは、ケーススタディを通して、規制当局における化学物質の安全性評価のためのIATAの新しい方法論を共有し、検討することができる。本調査では、「(2) 研究項目名：リスク評価機関におけるリードアクロスの活用状況の把握及び食品健康影響評価における適用可能範囲の提案」の活用状況の把握と同様に、反復投与毒性、生殖発生毒性、神経毒性等を対象エンドポイントとした。ケーススタディにおいて、NAMは評価対象物質と類似物質両方に対して作用機序に関連する相互比較が可能なデータを提供し、類似物質の評価の支援に使用されていることが多い。

NAMの整理項目を下記とした。

- ・ AOPの有無、または提示されているメカニズム
- ・ 使用したNAMの種類 (*in vitro*, *in silico*)、選定理由
- ・ NAMの実験プロトコルや使用した試薬、機器

表 3-1 ケーススタディ No. 326<sup>18</sup>のパーキンソン病に関連する神経毒性の例

項目	内容
AOP	AOPWiki, AOP: 3 Inhibition of the mitochondrial complex I of nigro-striatal neurons leads to parkinsonian motor deficits 黒質ニューロンのミトコンドリア呼吸鎖複合体I阻害がパーキンソン病性運動障害を引き起こす。
NAM	Molecular Initiating Event (MIE) (複合体Iとの相互作用) の予測 <i>in silico</i> 分子ドッキングアプローチによる構造ベースモデリング Jain <i>et al.</i> , 2017 Schrodinger 使用 human cryo-EM structure (PDB ID: 5XTD)
	Key Event (KE)1 (複合体Iの阻害) <i>in vitro</i> ミトコンドリア呼吸鎖複合体活性の測定 Oxygen consumption neuro intact cells (LUHMES)   Oxygen consumption neuro individual complexes (LUHMES)   Oxygen consumption Basal/Max HepG2
	KE2 (ミトコンドリア機能障害) <i>in vitro</i> 呼吸鎖を介する酸素消費量の測定、ミトコンドリア膜電位の評価、細胞内 ATP レベルの測定 Seahorse リアルタイム細胞代謝解析、電位依存性色素ローダミン 123 又は JC-1 を用いたミトコンドリア膜電位測定、ATPlite™ アッセイシステム
	KE3 (プロテオスタシス障害) <i>in vitro</i>

<sup>15</sup> [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-adverse-outcome-pathways\\_2415170x](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-series-on-adverse-outcome-pathways_2415170x)

<sup>16</sup> <https://aopwiki.org/>

<sup>17</sup> <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata/>

<sup>18</sup> [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2020\)22/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2020)22/en/pdf)

	蛍光プローブ法によるプロテアソーム活性、アンフォールドタンパク質応答による CHOP 遺伝子の活性化の評価 Proteasome assay (LUHMES)   CHOP-GFP reporter (HepG2)
	KE4 (DA ニューロン黒質経路の変性) <i>in vitro</i> アクチン細胞骨格の染色により神経突起の伸長を定量 LUHMES 細胞を用いた NeuriTox アッセイ (Stiegler <i>et al.</i> , 2011; Krug <i>et al.</i> , 2013; Delp <i>et al.</i> , 2018)
	バイオアベイラビリティの予測 <i>in silico</i> <i>in silico</i> モデル 細胞内濃度をモデル化
	<i>In vivo</i> 脳内濃度の予測 <i>in silico</i> PBPK モデル

ケーススタディ No. 326 では、黒質ニューロン障害を起こす呼吸鎖複合体 I について OECD で受け入れられた AOP を使用し、EFSA (2017) で提案された試験戦略を採用している (表 3-1)。NAM については、OECD でガイドライン化されているものではないが、一般的な測定法、機器を使用しており、すでに EU-ToxRisk のプロジェクトで使用されているものである。さらに、ケーススタディ No. 271、No. 274、No. 325 について調査した。No. 271 では、フェノール性ベンゾトリアゾールの反復投与毒性として肝毒性を対象にリードアクロスを実施している。AOP がない場合のケーススタディであり、NAM にはトランスクリプトームデータを使用している。No. 274 では 2-アルキル-1-アルカノールの鎖長の違いに着目し、反復投与毒性の NOAEL をカテゴリーアプローチにて推定している。No. 273 と同様に AOP がない場合のケーススタディである。No. 325 では、2-メチルヘキササン酸の発生・生殖毒性に関するデータギャップ穴埋めをリードアクロスにて実施している。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害に関する AOP を使用しているが、正確な AOP については不明としている。他のケーススタディとは異なり、弱い毒性または陰性結果を評価している。

#### ⑤ 類似性判断に使用可能な Key Event (KE) を予測する *in silico* NAM の候補について

神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) は神経系機能において重要であり、有機リン系やカルバメート系の農薬に見られる振戦等のコリン作動性影響を引き起こす主要な毒性メカニズムは、神経系アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害であると考えられている。

AChE 活性阻害については *in vitro* 試験法が確立されており、ハイスループットの結果が公開されている。本研究では、*in vitro* 試験系の AChE 活性阻害情報を、有機リン系やカルバメート系の農薬のリードアクロスにおける類似性判断に使用可能な KE 候補とした。KE 情報について *in silico* モデルを作成することで、代謝物などの物質の合成が困難な場合や、*in vitro* 試験が実施できない場合にも、*in vitro* 試験の結果を予測することが可能となる。

約 240 万種類の化合物とそのアッセイ情報が記載されている ChEMBL や、約 1 万物質のアッセイデータが公開されている米国の毒性プロジェクトである Tox21 にて、AChE 活性阻害情報が公開されている。ChEMBL では AChE 活性阻害情報について、ヒト以外にもラット、マウス、ウナギ等の異なる種のデータが収集されている。Tox21 では、ヒトの細胞ベース AChE アッセイ、酵素ベース AChE アッセイ (ミクロソーム添加有り/無し) のデータが掲載されている。

ChEMBL に関しては、これまでに機械学習等による *in silico* モデルが開発されており、最新、かつデータ量が多い Vignaux (2023)<sup>19</sup>らの文献情報を用いて *in silico* モデルを検討した。この文献では、モデル構築に使用したデータセットが公開されていたため、分子記述子計算ソフト alvaDesc を用いて、化学物質の分子記述子から、ラットの AChE 阻害活性の有無（陽性: IC<sub>50</sub> ≤ 1 μM、陰性: IC<sub>50</sub> > 1 μM）を判別するモデルを独自に作成した。予測性能は ROC-AUC が 0.88、感度 0.87、特異度 0.90 であり、文献の予測性能（ROC-AUC 0.94、感度 0.87、特異度 0.87）と同等の高性能なモデルが得られた。ただし、文献のモデルとは陽性、陰性の定義やデータセットは共通しているが、特徴量に Morgan fingerprint を使用していることは異なっている。表 3-2 に Vignaux (2023) らのデータセットを用いて、本研究で独自に作成したラットの AChE 阻害活性判別モデルの内容を示した。

表 3-2 本研究で作成したラットの AChE 阻害活性判別モデルの内容

内容	本モデルの結果	備考
データセット	1,406 物質 (陽性:687、陰性:719)	陽性定義: IC <sub>50</sub> ≤ 1 μM、 陰性定義: IC <sub>50</sub> > 1 μM (Vignaux (2023) と同様)
特徴量	分子記述子 383 種 (2D: 204 種、3D: 179 種)	使用した分子記述子計算ソフト alvaDesc
アルゴリズム	XGBoost (最も性能が高かったアルゴリズム)	検討したアルゴリズム Random Forest, XGBoost, LightGBM, k-Nearest Neighbor, Logistic regression, Support Vector Machine
評価方法	5-fold クロスバリデーション	5 個のテストデータのスコアを平均した値を性能評価に使用。

Vignaux (2023) らの報告しているモデルの性能と同様の性能が得られたため、ラットの AChE 阻害活性のデータセットに関する汎用性や頑健性が確認できたと考えられる。Vignaux (2023) らの報告では、ヒト AChE の活性阻害予測モデルも構築しており、ROC-AUC が 0.9 を超える高性能なモデルが得られている。また、IC<sub>50</sub> 値を予測する回帰モデルも報告されている。ちなみにヒトとラットの IC<sub>50</sub> 値を比較すると共通した 127 物質ではあるが、相関が高いことがわかっている (Spearman の相関係数 0.92)。

しかし、Vignaux (2023) らのラット AChE 阻害活性のデータセットを確認すると、有機リン系の構造を有する物質がほとんどなく、カルバメート系は 140 物質（陽性物質: 64、陰性物質: 76）であった。そこで、Tox21 の AChE 活性阻害情報を精査したところ、有機リン系、カルバメート系の構造を有する物質が確認できたため、予測モデル構築の学習データとして使用することとした。

#### AChE 活性阻害強度を予測する半定量的モデル

Tox21 から入手できる 3 つのアッセイデータを使用して、AChE 活性阻害の有無を化学構造情報のみから判別する予測モデルを構築した。ヒトの細胞ベースのアッセイデータ (AID1347395)、酵素ベースのアッセイデータ (AID1347397)、ミクロソーム添加のアッセイデータ (AID1347399) を統合して使用

<sup>19</sup> <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.2c00283>

し、PUBCHEM ACTIVITY SCORE の最大値を用いて陽性物質 (score 10 以上)、陰性物質 (score 0) を定義した。

#### 陽性陰性分類モデル① F1 スコア重視

陽性物質および陰性物質を使用し、F1 score (感度と陽性的中率の調和平均) を指標として阻害活性の有無を予測するモデルを構築したところ、ROC-AUCが0.78、F1が0.49であった。表3-3に分類モデルの内容を示した。

表 3-3 陽性陰性分類モデル① F1 スコア重視

内容	本モデルの結果	備考
データセット	7,544物質 (陽性:877、陰性:6,667)	陽性定義: score 10 以上 陰性定義: score 0
特徴量	分子記述子 81 種 (4モデルの平均)	使用した分子記述子計算ソフト alvaDesc
アルゴリズム	lightGBM	
評価方法	4x3 nested cross validation	4 個のテストデータのスコアを平均した値を性能評価に使用。

このモデルではバランスの取れた予測結果を重視した。さらに、偽陰性を回避するために NPV (陰性的中率) を重視した予測モデルを構築した。F1 スコア重視モデルと同様に、ヒトの細胞ベースのアッセイデータ (AID1347395)、酵素ベースのアッセイデータ (AID1347397)、ミクロソーム添加のアッセイデータ (AID1347399) を統合して使用し、PUBCHEM ACTIVITY SCORE の最大値を用いて陽性物質 (score 10 以上)、陰性物質 (score 0) を定義した。

#### 陽性陰性分類モデル② NPV 重視

陽性物質及び陰性物質を使用し、陰性的中率を指標として阻害活性の有無を予測するモデルを構築した。20 回のアンダーサンプリングにより構築したモデルによる予測の平均値について、閾値を 0.1 として分類したところ、陰性的中率は 0.97、特異度は 0.43 が得られた。表 3-4 に分類モデルの内容を示した。

表 3-4 陽性陰性分類モデル② NPV 重視

内容	本モデルの結果	備考
データセット	7,544物質 (陽性:878、陰性:6,667)	陽性定義: score 10 以上 陰性定義: score 0
特徴量	分子記述子 94 種 (4モデルの平均)	使用した分子記述子計算ソフト alvaDesc
アルゴリズム	lightGBM	
評価方法	4-fold cross validation	4 個のテストデータのスコアを平均した値を性能評価に使用。

さらに阻害活性の強度を予測するため、陽性物質については、強阻害 (score 80 以上)、弱阻害 (score 10 以上 50 未満) を定義したところ、弱阻害物質は 706 物質、強阻害物質は 172 物質であった。

### 活性阻害強度分類モデル PPV 重視

陽性物質のみを使用し、PPV（陽性的中率）を指標として阻害活性の強さを分類するモデルを構築したところ、陽性的中率は0.71、感度は0.40が得られた。表3-5に分類モデルの内容を示した。

表 3-5 活性阻害強度分類モデル PPV 重視

内容	本モデルの結果	備考
データセット	877物質 (陽性:172、陰性:705)	陽性定義: score 80 以上 陰性定義: score10 以上 50 未満
特徴量	分子記述子 75 種 (4 モデルの平均)	使用した分子記述子計算ソフト alvaDesc
アルゴリズム	lightGBM	
評価方法	4x3 nested cross validation	4 個のテストデータのスコアを平均した値を性能評価に使用。

これら 3 種類のモデルについては、「陽性陰性分類モデル① F1 スコア重視」モデルを用いて陽性物質と陰性物質を分類し、陰性と予測された物質については、再度「陽性陰性分類モデル② NPV 重視」を使用して、陽性物質と陰性物質を予測する。ここで陰性と予測された物質は陰性である可能性が高まると考えられる。一方で、「陽性陰性分類モデル① F1 スコア重視」モデルを用いて陽性と予測された物質については、「活性阻害強度分類モデル PPV 重視」モデルを使用して阻害の強弱を予測する。ここで得られる結果から、活性阻害の強度に関する情報が得られる（図 3-1）。

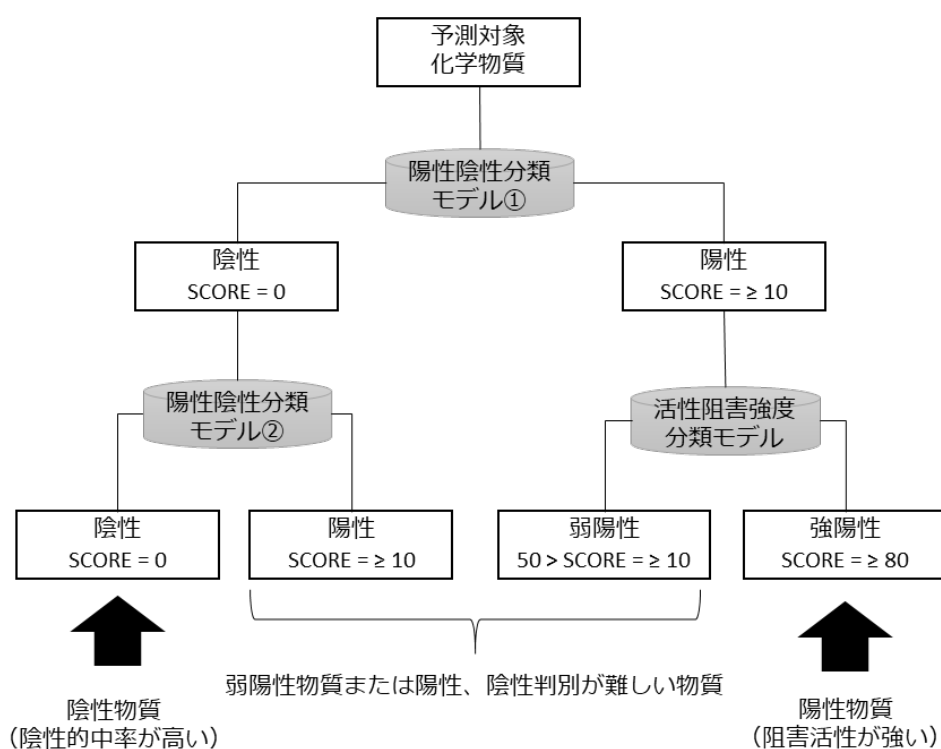


図 3-1 AChE 活性阻害強度を予測する半定量的モデルのフローチャート

作成した3つの半定量的モデルを使用して、農薬のAChE活性阻害強度を予測した。農薬は分担研究者（静岡県立大学・吉成浩一）の研究室で構築した、農薬評価書（約360農薬、450試験）のラット90日間反復投与毒性試験（90日間試験）ならびにラット2年間反復投与毒性・発がん性試験（2年間試験）のデータベースを活用し、有機リン系の27物質、カルバメート系の20物質を対象とした。これらは、「3-3）リードアクロスに有用なトキシコダイナミクス（TD）関連試験の同定およびトキシコダイナミクス（TD）関連データを利用したリードアクロスのケーススタディ」の神経毒性に関する*in vitro*評価を実施した物質と共通である。また、対象物質のうち有機リン系22物質、カルバメート系13物質は、学習データに使用したTox21に含まれている物質であったが、改めて作成したモデルにて予測を行った。予測結果は、有機リン系27物質のうち、強陽性に判別されたものは14物質、弱陽性または陽性、陰性判別が難しい（陽性の可能性がある）と予測された物質は13であり、陰性物質と判断されたものはなかった。カルバメート系20物質は、強陽性に判別されたものは7物質、陽性、陰性判別が難しい（陽性の可能性がある）と予測された物質は12であり、陰性物質と判断されたものは1物質であった（表3-6）。農薬評価書のラット90日反復投与毒性試験のNOAELを確認したところ、有機リン系、カルバメート系ともに強陽性と判断された物質は4.4 mg/kg/day以下であった。また陰性と判断されたカルバメート系のアシュラムについてはNOAELが1000 mg/kg/day以上であった。半定量的な予測モデルにより、強陽性物質と陰性物質について精度よくAChE阻害作用を予測することで、ラット*in vivo*毒性試験における神経系の影響の類似性判断を支援する*in silico* NAMとしての活用可能性が確認された。

表 3-6 AChE 活性阻害強度を予測する半定量的モデルの農薬に対する予測結果

ID	名称	分類	<i>In silico</i> 予測結果	Tox21の結果 <sup>a</sup>
有機リン系農薬 27 物質				
P005	EPN	Thioate	強陽性	86
P017	アジンホスメチル	Thioate	弱陽性	40
P021	アセフェート	Oxon	陽性の可能性がある	0
P037	イソキサチオン	Thioate	強陽性	85
P045	イプロベンホス	Oxon	強陽性	結果なし
P048	イミシアホス	Others	強陽性	結果なし
P069	エトプロホス	Oxon	強陽性	84
P111	クロルエトキシホス	Thioate	強陽性	80
P114	クロルピリホス	Thioate	強陽性	94
P123	シアノホス (CYAP)	Thioate	強陽性	結果なし
P132	ジクロトホス	Oxon	弱陽性	41
P166	ダイアジノン	Thioate	弱陽性	42
P194	トリアゾホス	Thioate	強陽性	85
P198	トリブホス	Others	強陽性	84
P206	トルクロホスメチル	Thioate	陽性の可能性がある	0
P248	フェニトロチオン	Thioate	弱陽性	40
P256	フェンチオン	Thioate	弱陽性	0
P257	フェントエート	Thioate	強陽性	80
P267	ブタミホス	Thioate	弱陽性	結果なし
P302	プロチオホス	Thioate	陽性の可能性がある	0
P313	プロフェノホス	Oxon	強陽性	84
P344	ホサロン	Thioate	強陽性	84
P346	ホスメット	Thioate	弱陽性	41
P347	ホセチルアルミニウム	Others	陽性の可能性がある	結果なし
P350	マラチオン	Thioate	弱陽性	40
P359	メタミドホス	Oxon	弱陽性	42
P375	メビンホス	Oxon	強陽性	85
カルバメート系農薬 20 物質				

P016	アシュラム	Carbamate	陰性	0
P033	アルジカルブ	Carbamate	強陽性	83
P034	アルドキシカルブ	Carbamate	強陽性	81
P058	エスプロカルブ	S-Thio	陽性の可能性がある	結果なし
P087	カルバリル	Carbamate	強陽性	82
P125	ジェットフェンカルブ	Carbamate	陽性の可能性がある	0
P175	チオベンカルブ	S-Thio	陽性の可能性がある	0
P180	デスメディファム	Carbamate	陽性の可能性がある	0
P234	ピリプチカルブ	O-Thio	陽性の可能性がある	結果なし
P238	ピリミカーブ	Carbamate	強陽性	82
P251	フェノチオカルブ	S-Thio	陽性の可能性がある	結果なし
P252	フェノブカルブ	Carbamate	強陽性	結果なし
P265	フェンメディファム	Carbamate	陽性の可能性がある	0
P300	プロスルホカルブ	S-Thio	陽性の可能性がある	結果なし
P312	プロファム	Carbamate	陽性の可能性がある	0
P337	ベンチアバリカルブイソプロピル	Carbamate	陽性の可能性がある	結果なし
P349	塩酸ホルメタネート	Carbamate	強陽性	84
P361	メタムアンモニウム塩	Dithio	陽性の可能性がある	結果なし
P365	メチオカルブ	Carbamate	強陽性	84
P379	モリネート	S-Thio	陽性の可能性がある	0

<sup>a</sup> Tox21 の結果は細胞ベースのアッセイデータ (AID1347395)、酵素ベースのアッセイデータ (AID1347397)、ミクロソーム添加のアッセイデータ (AID1347399) を統合して使用し、PUBCHEM ACTIVITY SCORE の最大値を記載。モデル構築時は強阻害 (score 80 以上)、弱阻害 (score 10 以上 50 未満)、陰性物質 (score 0) と定義した。

#### 代謝情報を考慮した予測モデル

細胞ベースのアッセイデータ (AID1347395)、酵素ベースのアッセイデータ (AID1347397) から最大値を採用し、PUBCHEM ACTIVITY SCORE を用いて陽性物質 (score 10 以上)、陰性物質 (score 0) を定義した。これを代謝考慮なしのデータセットとしてモデルを構築したところ、ROC-AUC は 0.72、感度と陽性的中率の調和平均である F1 score は 0.52 が得られた。一方で、ミクロソーム添加のアッセイデータ (AID1347399) を使用し、PUBCHEM ACTIVITY SCORE を用いて陽性物質 (score 10 以上)、陰性物質 (score 0) を定義した。これを代謝考慮ありのデータセットとしてモデルを構築したところ、ROC-AUC は 0.72、F1 score は 0.52 が得られた。モデルの詳細は表 3-7 と表 3-8 に示した。

2つのモデルの構築に使用した 7546 物質は共通しており、この中で代謝考慮なしのデータセットで陽性、代謝考慮ありのデータセットで陰性であった物質は、740 物質であった。構築した 2つのモデルにおいてこれら 740 物質のうち、代謝考慮なしモデルで陽性、代謝考慮ありモデルで陰性と正しく予測できたのは 320 物質であった。一方で、代謝考慮なしのデータセットで陰性、代謝考慮ありのデータセットで陽性であった物質は、6 物質であった。これらの *in silico* モデルを活用することで、化学物質の代謝を考慮した AChE 活性阻害の情報を得ることが可能となり、類似性判断に使用可能な KE を予測する *in silico* NAM としてより多くの情報を提供することが期待される。

表 3-7 代謝考慮なしモデル

内容	本モデルの結果	備考
データセット	7,546 物質 (陽性:873、陰性:6,673)	陽性定義: score 10 以上 陰性定義: score 0
特徴量	分子記述子 97 種 (4 モデルの平均)	使用した分子記述子計算ソフト alvaDesc

アルゴリズム	lightGBM	
評価方法	4x3 nested cross validation	4 個のテストデータのスコアを平均した値を性能評価に使用。

表 3-8 代謝考慮ありモデル

内容	本モデルの結果	備考
データセット	7,546 物質 (陽性:139、陰性:7,407)	陽性定義: score 10 以上 陰性定義: score 0
特徴量	分子記述子 206 種 (4 モデルの平均)	使用した分子記述子計算ソフト alvaDesc
アルゴリズム	lightGBM	
評価方法	4x3 nested cross validation	4 個のテストデータのスコアを平均した値を性能評価に使用。

以上本項において、類似性判断に使用可能な KE を予測する *in silico* NAM として、半定量的な AChE 活性阻害予測モデルを構築した。AChE 阻害作用は有機リン系やカルバメート系の農薬の毒性評価において重要な情報となるため、*in silico* モデルを作成することで、代謝物などの物質の合成が困難な場合や、*in vitro* 試験が実施できない場合にも、*in vitro* 試験の結果を予測することが可能となる。したがって開発した AChE 活性阻害予測モデルは、*in silico* NAM としてリードアクロスにおける類似性判断を支援できる可能性が示された。

### 3-2) トキシコキネティクス (TK) 関連パラメータを組み合わせたリードアクロスの信頼性評価手法の検討 (小野敦 (岡山大学) )

#### 目的

反復投与毒性の Point of Departure (POD) 評価におけるリードアクロスにおいて、化学構造が類似しているものの無毒性量が大きく異なる原因として TK の寄与が挙げられる。本研究では、化学物質の反復投与毒性のリードアクロスの信頼性向上に向けた NAM 候補として各種 TK 関連パラメータの有用性について検討を行い、有用性が示された TK 関連パラメータを単独もしくは組み合わせ適用によるリードアクロスの信頼性向上の検討を行うことを目的とした研究を行った。

#### 成果

##### ・TK 関連パラメータの *in silico* モデル構築と反復投与 NOEL (NOAEL 値) との関連解析

反復投与毒性の発現に影響を与えると想定される TK 関連パラメータとして、腸管吸収性の *in vitro* 指標として用いられている Caco-2 細胞を用いた膜透過性を、代謝安定性としてラット肝 S9 を用いた *in vitro* 代謝安定性、組織分布に關与する指標として血漿タンパク結合性について反復投与による無影響量 (NOEL) のリードアクロスにおける NAM としての有用性について検討を行った。それぞれの *in vitro* 試験と反復投与 NOEL とおおよその関係について解析を行うため、既存の文献情報等から得られた *in vitro* 実験値をもとに *in silico* 定量評価モデルの構築を行い、構築したモデルによる予測値と *in vivo* 反復投与毒性試験による NOEL (NOAEL) 値との相関性について解析を行った。

### ・TK関連 *in vitro* 指標の *in silico* 簡易モデルの構築

3種のTK関連 *in vitro* 指標について、Caco-2細胞透過性試験については、Mol. Inf. 2011, 30, 376-385で示されたCaco-2細胞透過性、代謝安定性試験については、Int J Mol Sci. 2018, 19(4):1040でChEMBLより収集されたラット肝ミクロソーム試験による半減期データ、血漿タンパク結合については、ChemMedChem 2018, 13, 572-581から得られたヒト血漿タンパク結合率の測定値を用い定量評価モデルの構築を行った。解析にはKNIME Analytic platform 4.7.2を用いた。それぞれの測定値が得られている化学物質の構造情報(SMILES)から、RDKitノードにより計算させた分子記述子をもとに、H2O AutoML<sup>20</sup>による回帰モデルの構築を行った。表3-9～表3-11に本研究で構築したそれぞれの *in silico* モデルの統計情報を示した。

表 3-9 Caco-2 透過性予測モデルの training 及び test 結果

Set	n	Mean Squared Error	R <sup>2</sup>	RMSE
Training	526	0.04	0.95	0.20
Test1	138	0.30	0.56	0.55
Test2	98	0.19	0.67	0.43

表 3-10 代謝安定性予測モデルの training 及び test 結果

Set	n	Mean Squared Error	R <sup>2</sup>	RMSE
Training	1050	0.06	0.83	0.25
Test	258	0.21	0.48	0.46

表 3-11 血漿タンパク結合予測モデルの training 及び test 結果

Set	n	Mean Squared Error	R <sup>2</sup>	RMSE
Training	1456	0.02	0.84	0.13
Test	363	0.03	0.70	0.17

いずれのモデルも Training set の R<sup>2</sup> 値は良好 (0.95~0.84) であったが、検証用データである test set の R<sup>2</sup> 値は低く Training set へのオーバーフィッティングが示唆された。特に代謝安定性モデルでは、0.48 であり、今回構築したモデルは、各パラメータの有用性について予備的な評価を行うことを目的としており、細かいチューニングを行っていない簡易モデルであるため、個々の予測値はあまり信頼性が高くないことに注意が必要である。

### ・TK関連パラメータ予測値と反復投与毒性試験による無毒性量との関連解析

上記構築した3種のTK関連パラメータ予測モデルによる予測値と *in vivo* 反復投与毒性試験によるNOEL値 (NOAEL値) との関連について解析を行った。

反復投与NOEL値としては、厚生労働省における既存化学物質点検事業で実施されたラット反復投与試験 (28日間試験、生殖発生併合試験を含む319物質)、器具容器包装に用いられる化学物質 (123物質) について実施された90日試験のNOEL値、Munroらにより毒性学的懸念の閾値 (TTC: Threshold of Toxicological Concern) 設定に用いられたデータベースに登録された物質 (601物質) のNOEL値 (様

<sup>20</sup> <https://docs.h2o.ai/h2o/latest-stable/h2o-docs/automl.html>

々な毒性試験の慢性曝露 NOEL 値への換算値)、農薬 (383 物質) のラット 90 日間試験の NOAEL 値の 4 種の化学物質セットについて、3 種の NAM 候補指標の *in silico* モデルによる予測値と NOEL (NOAEL) 値との関連を解析した。

図 3-2~図 3-4 に各化学物質セットにおける NOEL (NOAEL) 値と本研究で構築した TK 関連パラメータの *in silico* 予測値との関係を示した。いずれのプロットとも、X 軸は *in silico* 予測値、Y 軸は NOEL (NOAEL) 値の対数値であり、プロットの色は、OECD QSAR Toolbox4.6 を用いた Cramer 毒性分類による毒性クラス (赤: class III、緑: class II、青: class I) を示す (農薬セットについては、Cramer 分類を行っていないが、全てが Class III である。)

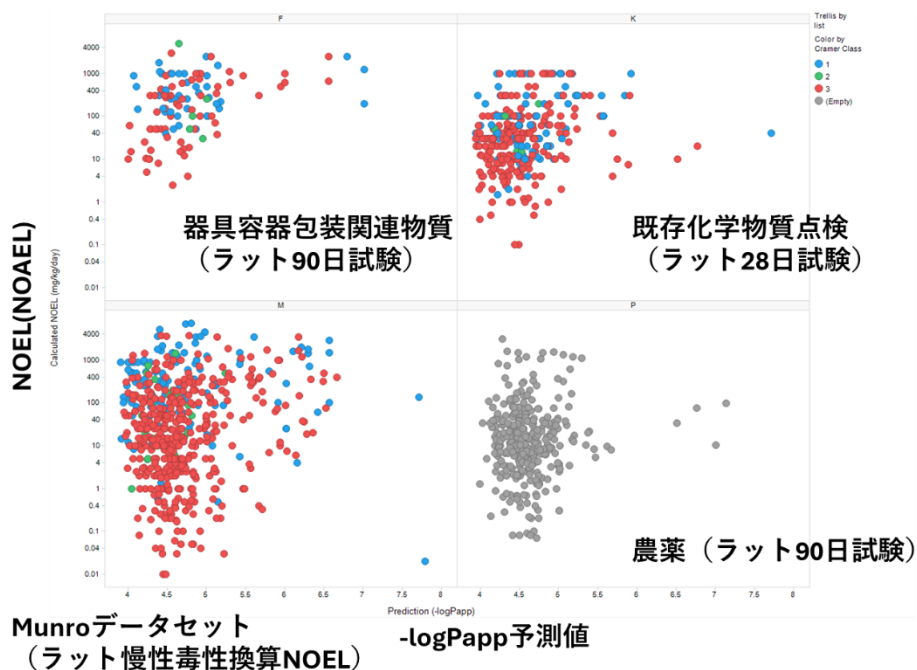


図3-2 Caco-2透過性*in silico*予測値とラット反復投与NOEL(NOAEL)との関係

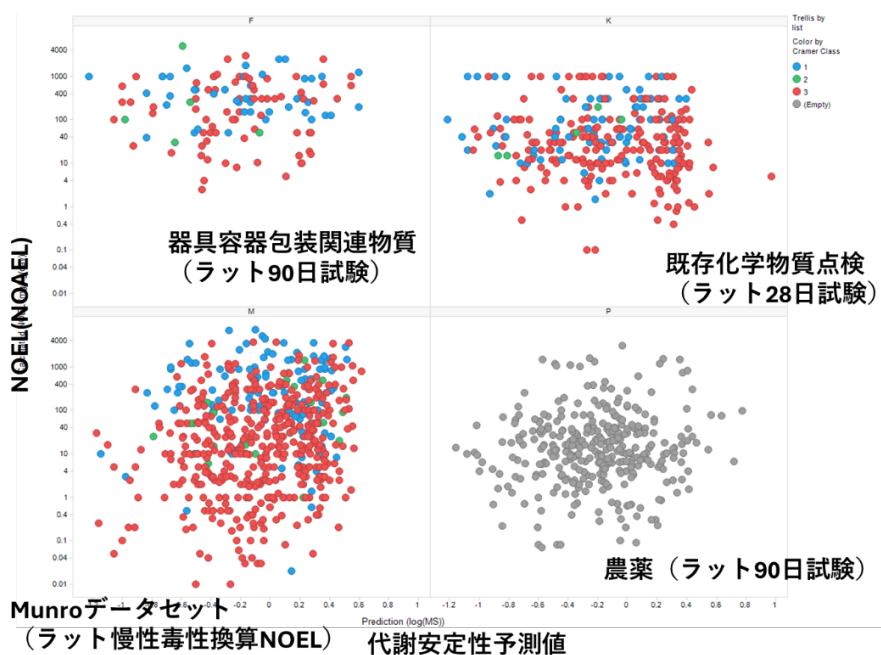


図 3-3 代謝安定性 *in silico* 予測値とラット反復投与 NOEL(NOAEL)との関係

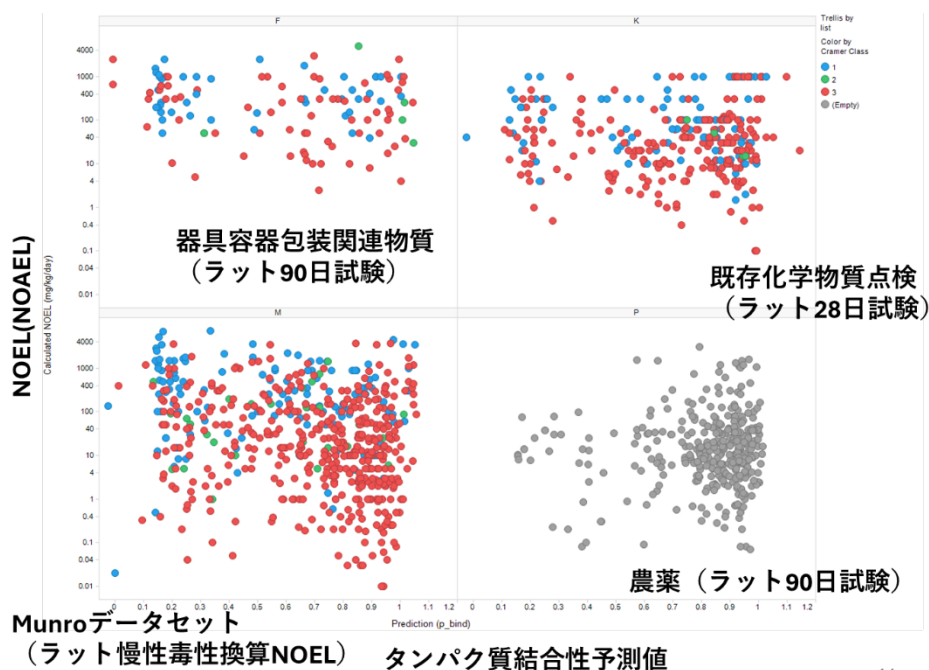


図 3-4 タンパク質結合性 *in silico* 予測値とラット反復投与 NOEL(NOAE)との関係

3種のTK関連パラメータのうち、Caco-2透過性予測値では、4つの化学物質セットいずれにおいてもグラフ右側の膜透過性が低くなるのに従い、NOEL (NOAEL) 値の低い物質が少なくなる傾向が認められ、Caco-2透過性の反復投与 NOEL (NOAEL) 値のリードアクロスにおけるTK関連NAMとしての有用性が示された。一方、膜透過性の高い領域（グラフ左）には、NOEL (NOAEL) 値の低い物質から高い物質まで含まれるが、これらの物質のNOEL (NOAEL) 値は、TKよりもむしろTDによる影響が大きいものと想定される。タンパク結合性に関しては、あまり明確ではないが結合性が低い領域より高い領域にNOEL (NOAEL) 値の低い物質が分布する傾向が認められたが、代謝安定性についてはNOEL (NOAEL) 値との関連において明確な傾向は認められなかった。

#### ・Caco-2透過性*in silico*モデルの予測性能向上のための再構築

上記の解析によりCaco-2透過性の反復投与NOEL (NOAEL) 値のリードアクロスにおけるTK関連NAMとしての有用性が示された。しかし、先に構築した*in silico*モデルは、簡易的に構築したモデルで前述のとおりテストセットの決定係数は、test1, test2 setそれぞれで0.562, 0.674と予測値の信頼性は限定的であった。そのため、モデル構築に用いるデータを増やして、モデルの高精度化を検討した。データセットとして、上述のMol. Inf. 2011, 30, 376-385で用いられたデータセットに加え、J. Chem. Inf. Model. 2016, 56, 4, 763-773で用いられたデータセットを加え、重複を除く1458物質のデータセットの化学物質についてpython (Google Colaboratory) を用いてSMILESからRDkitライブラリーによる記述子を計算し、トレーニングセット1163物質とテストセット295物質に分割して、H2O 3.46.0.3 python libraryを用いてスタッキングアンサンブルモデルの構築を行った。図3-5にトレーニングセットとテストセットにおける、Caco-2膜透過測定値(-PAPP値)の分布及びモデル構築に用いた記述子を用いたPCA解析

の結果を示した。図 3-5 の結果から、-PAPP 値及び PCA 解析の結果ともに、トレーニングセットとテストセットでデータの偏りは無いと判断した。

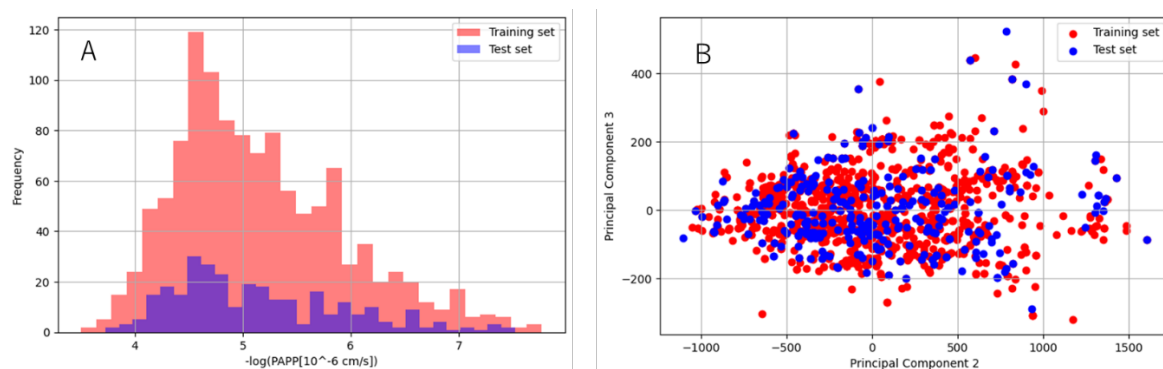


図 3-5 Training set と Test set の PAPP 値の分布 (A)と RDkit 記述子による PCA 解析結果 (B)

最終的に構築した予測モデルによる、トレーニングセットとテストセットの実測値と予測値の分布を図 3-6 に、トレーニングセットとクロスバリデーション (CV) 及びテストセットにおける予測精度の統計情報を表 3-12 に示した。新たに構築したモデルは、CV における  $R^2 \approx 0.80$  に対してテストセットにおける  $R^2 \approx 0.79$  とほぼ同等の精度であり、先に構築したモデルに比べ予測精度は大幅に向上した。新たに構築したモデルでの予測値と反復投与試験の NOEL (NOAEL) 値との関係は、先に構築したモデルの予測値と同様に、Caco-2 透過性が低い領域では NOEL (NOAEL) 値の低い物質を認めない分布を示した (図は省略)。

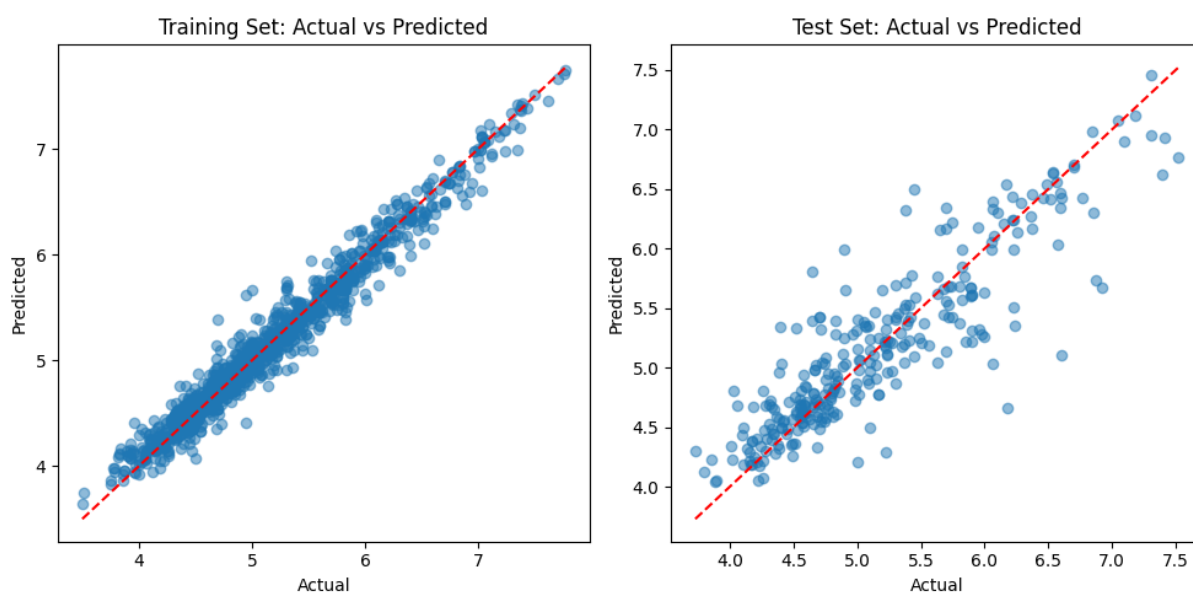


図 3-6 新たに構築した Caco-2 透過性予測モデルの Training set と Test set の実測値と予測値の分布

表 3-12 新たに構築した Caco-2 透過性予測モデルの予測精度

Set	n	Mean Squared Error	$R^2$	RMSE
Training	1163	0.02	0.97	0.14

CV		0.13	0.80	0.35
Test	295	0.13	0.79	0.36

・構造類似物質群におけるCaco-2透過性予測値とNOEL (NOAEL) 値との相関性解析

構造類似化合物群のカテゴリーアプローチにおける TK 関連指標としての Caco-2 透過性の有用性について更に検討を行うため、構造類似化合物群における新たに構築した Caco-2 透過性モデルによる予測値と NOEL (NOAEL) 値との相関性について解析を行った。構造類似化合物群の探索のため、既存化学物質点検データセットの化学物質を対象として morgan fingerprint を用いたクラスタリングを行い、得られた各クラスターの化合物セットについて Caco-2 透過性予測値と NOEL (NOAEL) 値との関係を解析した。Caco-2 透過性予測値と NOEL (NOAEL) 値との相関性が認められた化合物クラスターの例を図 6~8 に化合物構造とともに示した。図 3-7 に示すアミノベンゼン類では、青で示したスルホ基が付加された化合物群では、赤で示すスルホ基のない単純なアミノベンゼン類に比べ Caco-2 透過性が低く、NOEL (NOAEL) 値が高い傾向が認められた。図 3-8 に示すアルキルアルコールや図 3-9 に示すリン酸類についても、Caco-2 透過性が低い物質ほど NOEL (NOAEL) 値が高くなる傾向が認められた。これらの化合物群の一部の物質について、実際に *in vitro* Caco-2 透過性試験による検証試験を行った。

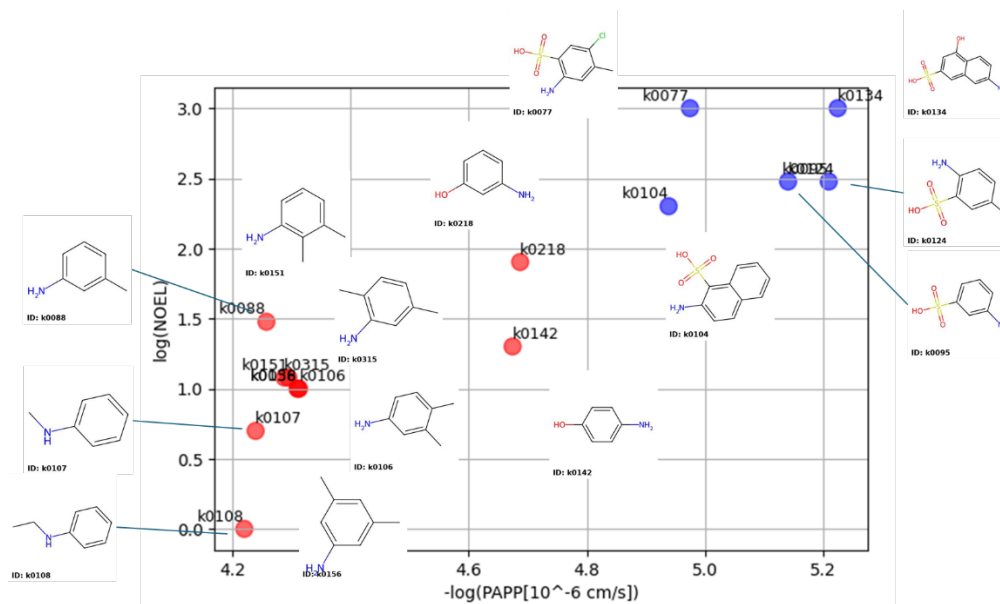


図 3-7 Caco-2 透過性予測値と NOEL (NOAEL) 値との相関性が認められたアミノベンゼン類  
赤：アミノベンゼン類、青：アミノベンゼンにスルホ基が付加された化合物

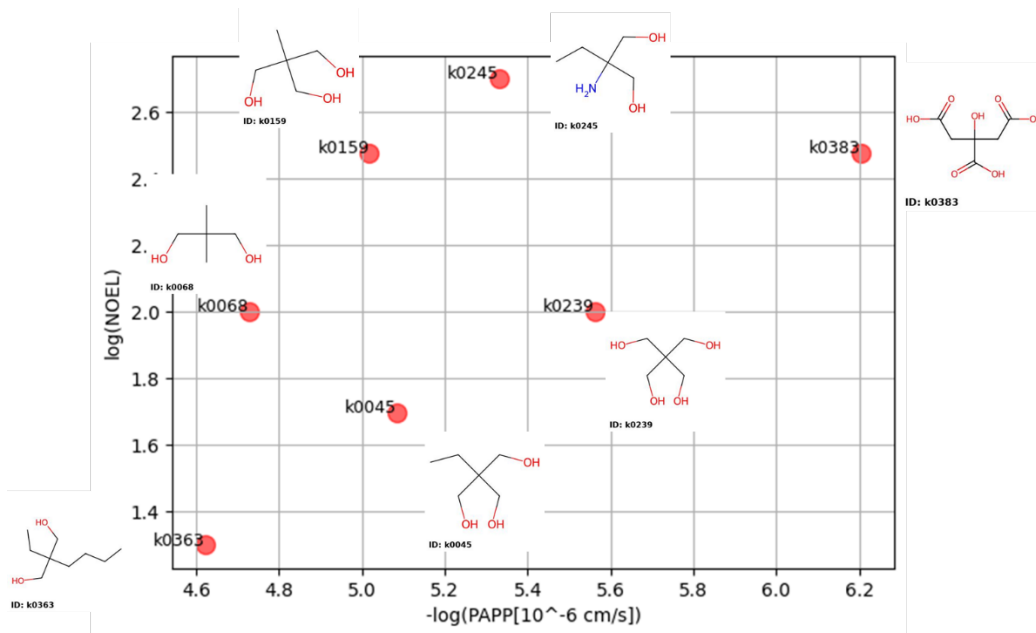


図 3-8 Caco-2 透過性予測値と NOEL (NOAEL) 値との相関性が認められたアルキルアルコール類

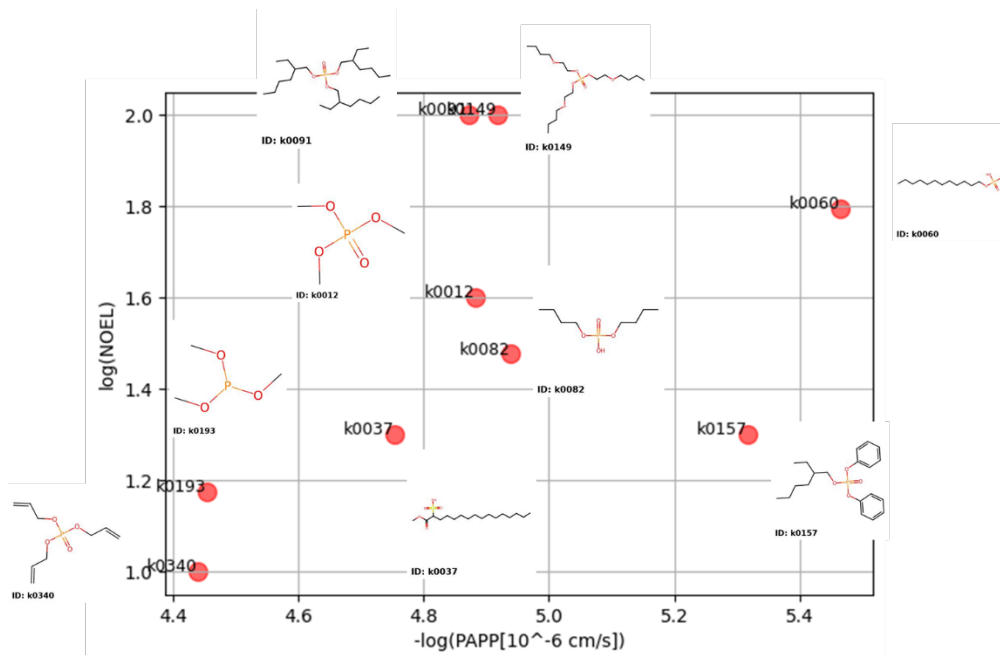


図 3-9 Caco-2 透過性予測値と NOEL (NOAEL) 値との相関性が認められたリン酸類

・ Caco-2 透過性予測値の実験的検証

前項の図 3-7～図 3-9 に示した Caco-2 透過性予測値と NOEL (NOAEL) 値との相関性が認められた構造類似物質群のうち市販試薬が入手出来た化合物について、Caco-2 透過性試験による検証を行った。Caco-2 透過性試験に供した被験物質を表 3-13 に示す。

表 3-13 Caco-2 透過性試験の被験物質

物質グループ	Caco2アッセイのコード番号	物質ID*	CAS番号	IUPACName	メーカー	コード番号	ロット番号
アミノベンゼン類 (図3-7)	OK01	k0108	103-69-5	N-ethylaniline	富士フィルム和光純薬	055-06172	KCJ5275
	OK02	k0107	100-61-8	N-methylaniline	富士フィルム和光純薬	136-01952	KSN4065
	OK03	k0156	108-69-0	3,5-dimethylaniline	富士フィルム和光純薬	245-00871	DLN1382
	OK04	k0038	87-62-7	2,6-dimethylaniline	富士フィルム和光純薬	247-00772	CKJ6603
	OK05	k0315	95-78-3	2,5-dimethylaniline	富士フィルム和光純薬	244-00282	WTL5873
	OK06	k0218	591-27-5	3-aminophenol	富士フィルム和光純薬	011-02672	PAH2516
	OK07	k0124	88-44-8	2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid	富士フィルム和光純薬	353-01742	DLF7612
	OK08	k0134	87-02-5	7-amino-4-hydroxynaphthalene-2-sulfonic acid	BLD Pharmatech Ltd.	BD22925	BSP094
	OK09	k0077	88-53-9	2-amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid	Combi-Blocks, Inc	QC-2818	C11310
アルキルアルコール類 (図3-8)	OK10	k0363	115-84-4	2-butyl-2-ethylpropane-1,3-diol	富士フィルム和光純薬	351-01042	KSG3035
	OK11	k0045	77-99-6	2-ethyl-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol	富士フィルム和光純薬	205-04912	LEF5517
	OK12	k0068	126-30-7	2,2-dimethylpropane-1,3-diol	富士フィルム和光純薬	047-08892	LEL6805
	OK13	k0239	115-77-5	2,2-bis(hydroxymethyl)propane-1,3-diol	富士フィルム和光純薬	169-00585	WTG4667
	OK14	k0159	77-85-0	2-(hydroxymethyl)-2-methylpropane-1,3-diol	富士フィルム和光純薬	203-08972	PAK0359
	OK15	k0383	3012-65-5	diazanium;3-carboxy-3-hydroxypentanedioate	富士フィルム和光純薬	011-03032	CKM3351
	OK16	k0245	115-70-8	2-amino-2-ethylpropane-1,3-diol	Combi-Blocks, Inc	QF-8723	C20577
リン酸類 (図3-9)	OK17	k0340	1623-19-4	tris(prop-2-enyl) phosphate	BLD Pharmatech Ltd.	BD154982	CGW522
	OK18	k0246	298-06-6	diethoxy-sulfanyl-sulfanylidene-lambda5-phosphane	富士フィルム和光純薬	044-01901	ACQ0965
	OK19	k0012	512-56-1	trimethyl phosphate	富士フィルム和光純薬	208-09902	WTF5791
	OK20	k0091	78-42-2	tris(2-ethylhexyl) phosphate	富士フィルム和光純薬	201-06913	WTJ2313
	OK21	k0149	78-51-3	tris(2-butoxyethyl) phosphate	Combi-Blocks, Inc	QN-3504	C61230

\* 図 3-7～図 3-9 に示す物質 ID

Caco-2 透過性試験の試験方法の概要を以下に示す。

#### 測定条件の検討

透過性試験に先だって LC-MS/MS を使用して、最適化を実施した結果、5 化合物 (OK10、OK11、OK12、OK13、OK14) については、MS スペクトルが検出出来なかったため評価不能とし、透過試験を実施しなかった。

#### 被験物質の調製

被験物質に適宜 DMSO を添加し、10 mmol/L DMSO 溶液を調製した。なお、OK-15 については DMSO に溶解しなかったため、DMSO と同量の水を添加し、10 mmol/L DMSO : 水 (1:1,v/v) 溶液を調製した。

被験物質及び指標化合物 (Atenolol) 10 mmol/L DMSO 溶液を HBSS-MES 溶液 (pH6.5) で 1000 倍に希釈し、被験物質含有 HBSS-MES 溶液 (pH6.5) を調製し、添加溶液とした。OK-15 については 0.5% DMSO 含有 HBSS-MES 溶液 (pH6.5) で 1000 倍に希釈し、添加溶液とした。

#### Caco-2 単層膜の健全性評価および透過試験

試験に先立って Caco-2 単層膜の apical 側に被験物質不含 HBSS-MES 溶液 (pH6.5) 200  $\mu$ L を、basal 側に 4% BSA 含有 HBSS-HEPES 溶液 (pH7.4) 900  $\mu$ L を加え、恒温振とう機 (37°C, 200rpm) にて 20 分以上インキュベート後、各ウェルの試験前の抵抗値を測定した。膜抵抗値測定後、apical 側を添加溶液 (被験物質含有 HBSS-MES 溶液 (pH6.5)) 250  $\mu$ L、basal 側を新たな 4% BSA 含有 HBSS-HEPES 溶液 (pH7.4) 900  $\mu$ L に交換し、apical 側から 50  $\mu$ L をサンプリング (これを 0 時点 Donor 溶液とした) 後、恒温振とう機 (37°C, 200 rpm) にてインキュベートした。30 分、60 分後に、それぞれの basal 側から透過液を 100  $\mu$ L ずつサンプリングし、サンプリングした溶液を LC-MS/MS 分析に供した。なお、30 分サンプリング後に 100  $\mu$ L の 4%BSA 含有 HBSS-HEPES 溶液 (pH7.4) を補液した。透過試験実施後、apical 側を 150  $\mu$ mol/L Lucifer Yellow 含有 HBSS-MES 溶液 (pH6.5) 200  $\mu$ L、basal 側を新たな 4% BSA 含有 HBSS-HEPES 溶液 (pH7.4) 900  $\mu$ L に交換し、恒温振とう機 (37°C, 200rpm) にてインキュベートした。60 分後、それぞれの basal 側から透過液 200  $\mu$ L ずつをサンプリングし、蛍光プレートリーダーを用いて測定した。(Papp 値が 2 以下である場合、Caco-2 細胞単層膜の健全性が保たれているとした。) 測定を各化合物について 3 例ずつ行った。

Caco-2 透過性試験の結果を表 3-14 に示す。測定を行った化合物のうち OK08、OK15、OK16、OK20 は、検量線のピークは得られたものの、basal 側のピークは未検出であったため評価不能であった。また、OK21 は solvent(50%メタノール)でも一定の大きさのピークが見られており、環境中のコンタミネーションの可能性が疑われたため測定された Papp 値は信頼出来る値ではないと判断した。よって、アルキルアルコール類、リン酸類については、透過性測定値が得られた物質が、それぞれ 0、3 物質と少なかったため *in vivo* 無毒性量との関係について評価は行えなかった。一方、OK09 は外挿値でばらつきも大きいため参考値であるが、透過性が低いためであり Papp 値は検討に利用可能である判断した。よって、透過性試験により 8 物質について Papp 値が得られたアミノベンゼン類について、Caco-2 透過性と *in vivo* 無毒性量の関係について解析を行った。結果を図 3-10 に示す。

表 3-14 Caco-2 透過性試験の結果

No.	compound	透過試験時間 (min.)		Donor溶液 濃度平均値 (nM)	Basal濃度 (nM)	平均値	$P_{app}$ ( $10^{-6}$ cm/s)	Papp 平均値 ( $10^{-6}$ cm/s)		Donor溶液 濃度 (nM)		
OK01	N-ethylaniline	30	1	5790	313	324	81.9	84.8	1	5610		
			2		321		84.0		2	5420		
			3		338		88.4		3	6340		
		60	1		450	437	63.4	61.8				
			2		437		61.8					
			3		423		60.3					
OK02	N-methylaniline	30	1	7243	377	368	78.9	77.0	1	6700		
			2		347		72.6		2	6780		
			3		381		79.7		3	8250		
		60	1		602	544	67.3	61.1				
			2		504		56.7					
			3		525		59.3					
OK03	3,5-dimethylaniline	30	1	9090	461	458	76.8	76.3	1	8410		
			2		429		71.5		2	9230		
			3		484		80.7		3	9630		
		60	1		771	734	68.5	65.4				
			2		718		63.8					
			3		712		63.8					
OK04	2,6-dimethylaniline	30	1	8210	624	602	115	111	1	8600		
			2		596		110		2	8380		
			3		587		108		3	7650		
		60	1		1000	927	98.7	91.7				
			2		944		93.2					
			3		838		83.3					
OK05	2,5-dimethylaniline	30	1	7987	622	578	118	110	1	8830		
			2		545		103		2	7520		
			3		568		108		3	7610		
		60	1		821	829	84.4	84.8				
			2		820		83.5					
			3		847		86.3					
OK06	3-aminophenol	30	1	9527	458	460	72.8	73.2	1	9370		
			2		501		79.7		2	10400		
			3		421		67.0		3	8810		
		60	1		684	676	58.4	57.8				
			2		655		56.5					
			3		690		58.6					
OK07	2-amino-5- methylbenzenesulfonic acid	30	1	9267	8.52	13.0	1.39	2.13	1	9540		
			2		18.3		2.99		2	9250		
			3		12.3		2.01		3	9010		
		60	1		10.7	17.4	0.952	1.54				
			2		23.3		2.07					
			3		18.2		1.60					
OK08	7-amino-4- hydroxynaphthalene-2- sulfonic acid	30	1	9547	No Peak	-	-	評価不能	1	9860		
			2		No Peak		-		2	9530		
			3		No Peak		-		3	9250		
		60	1		No Peak	-	-	評価不能				
			2		No Peak		-					
			3		No Peak		-					
OK09	2-amino-5-chloro-4- methylbenzenesulfonic acid	30	1	9723	2.30 *	4.36	0.358 **	0.679 **	1	9620		
			2		3.89 *		0.606 **		2	9970		
			3		6.89 *		1.07 **		3	9580		
		60	1		6.54 *	7.08	0.529 **	0.589 **				
			2		5.72 *		0.479 **					
			3		8.97		0.759					

No.	compound	透過試驗時間 (min.)		Donor溶液 濃度平均值 (nM)	Basal濃度 (nM)	平均值	P <sub>app</sub> (10 <sup>-6</sup> cm/s)	P <sub>app</sub> 平均值 (10 <sup>-6</sup> cm/s)		Donor溶液 濃度 (nM)		
OK15	diazanium;3-carboxy-3-hydroxypentanedioate	30	1	-	No Peak	-	-	-	-	-		
			2		No Peak							
			3		No Peak							
		60	1		No Peak	-	-	-	-	-	-	-
			2		No Peak							
			3		No Peak							
OK16	2-amino-2-ethylpropane-1,3-diol	30	1	8720	No Peak	-	-	-	-	-		
			2		No Peak							
			3		No Peak							
		60	1		No Peak	-	-	-	-	-	-	-
			2		No Peak							
			3		No Peak							
OK17	tris(prop-2-enyl) phosphate	30	1	10477	625	581	90.4	84.0	-	-		
			2		568		82.1					
			3		549		79.4					
		60	1		921	71.6	918	71.6	71.0	-	-	-
			2		900	69.6						
			3		932	71.8						
OK18	diethoxy-sulfanyl-sulfanylidene-lambda5-phosphane	30	1	8393	9.32	8.51	1.68	1.54	-	-		
			2		11.8		2.13					
			3		4.41		0.796					
		60	1		10.5	1.04	9.95	1.04	0.983	-	-	-
			2		14.7	1.45						
			3		4.65	0.464						
OK19	trimethyl phosphate	30	1	9500	446	439	71.1	70.0	-	-		
			2		442		70.5					
			3		428		68.3					
		60	1		722	61.5	728	61.5	61.9	-	-	-
			2		706	60.2						
			3		755	64.0						
OK20	tris(2-ethylhexyl) phosphate	30	1	3390	No Peak	-	-	-	-	-		
			2		No Peak							
			3		No Peak							
		60	1		No Peak	-	-	-	-	-	-	-
			2		No Peak							
			3		No Peak							
OK21	tris(2-butoxyethyl) phosphate	30	1	12600	599	606	72.0 **	72.9 **	-	-		
			2		610		73.4 **					
			3		610		73.4 **					
		60	1		991	63.6 **	1057	63.6 **	67.6 **	-	-	-
			2		1050	67.2 **						
			3		1130	72.0 **						
PC	Atenolol	30	1	10733	7.99	4.17	1.13	0.588	-	-		
			2		4.51		0.637					
			3		3.82		0.539					
		60	1		10.3	0.790	6.07	0.790	0.461	-	-	-
			2		5.75	0.441						
			3		6.39	0.481						
PC	Propranolol	30	1	12367	286	271	35.0	33.2	-	-		
			2		271		33.2					
			3		255		31.2					
		60	1		504	32.8	492	32.8	32.0	-	-	-
			2		493	32.0						
			3		478	31.0						

\*:外挿値, \*\*: 參考值

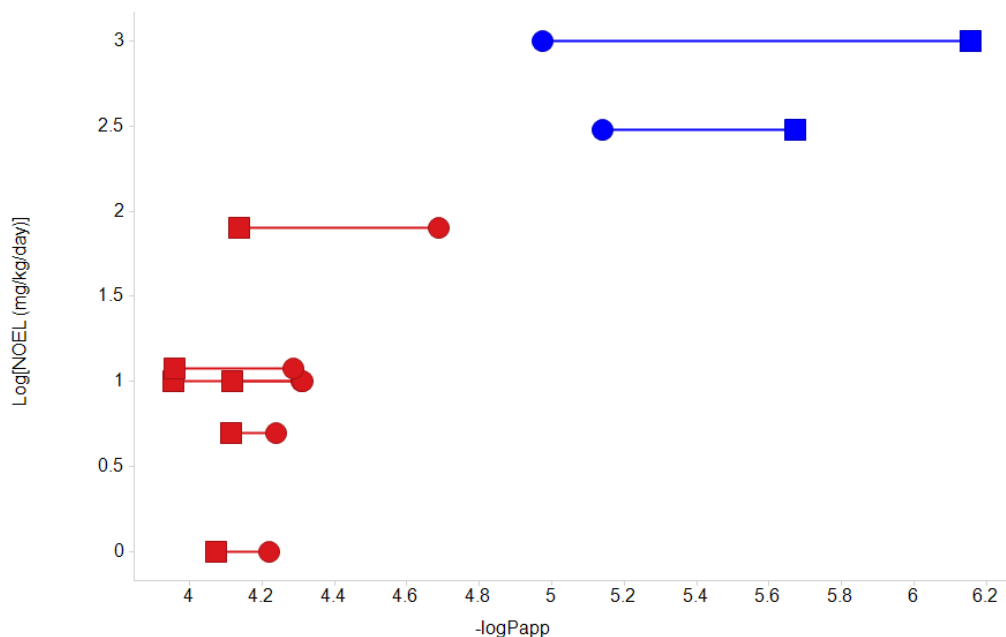


図 3-10 アミノベンゼン類の Caco-2 透過性 (QSAR 予測値と実測値) と *in vivo* 28 日間試験の無毒性量 (NOEL 値) との関係

○ : QSAR 予測値、□ : Caco-2 透過性試験実測値

赤 : アミノベンゼン類、青 : アミノベンゼンにスルホ基が付加された化合物

物質によって予測値と実測値の違いは認められるものの、Caco-2 透過性(-logPapp 値)と無毒性量 (Log(NOEL)値)との関係は、予測値、実測値とも同様に無毒性量が高い物質では Caco-2 透過性(-logPapp 値)が大きく Caco-2 透過性が低い傾向が明らかであり、Caco-2 透過性が *in vivo* 無毒性量のリードアクロスに有用な TK 関連パラメータであることが示された。Caco-2 透過性の正確な Papp 値を得るためには実試験による測定が必要ではあるが、物質によっては、LC-MS/MS での測定が困難であるなどの問題もあり、リードアクロスのための指標として QSAR モデルによる *in silico* 予測値は有用であり十分実用的であると考えられる。

#### ・ Caco-2 透過性予測値による連続的 (sequential) TTC 値の検討

Munro らによって提唱された Cramer 分類に基づく TTC 値は、毒性情報の得られていない化学物質について毒性学的に影響のない曝露量の基準として、器具容器包装に用いられる化学物質などの規制に適用されている。Munro らの TTC 値は、Cramer クラス I~III の各クラスに分類された化学物質の NOEL 値分布の下側 5 パーセントより算出された値を基にしているが、各 Cramer クラスには、NOEL 値の大きい物質も多数含まれており、それらの物質については、過剰に安全側の値である。図 3-11 に本研究班で構築した Caco-2 透過性モデルの予測値と Munro のデータベースに含まれる化学物質の NOEL 値を各 Cramer クラスの分布を示す。

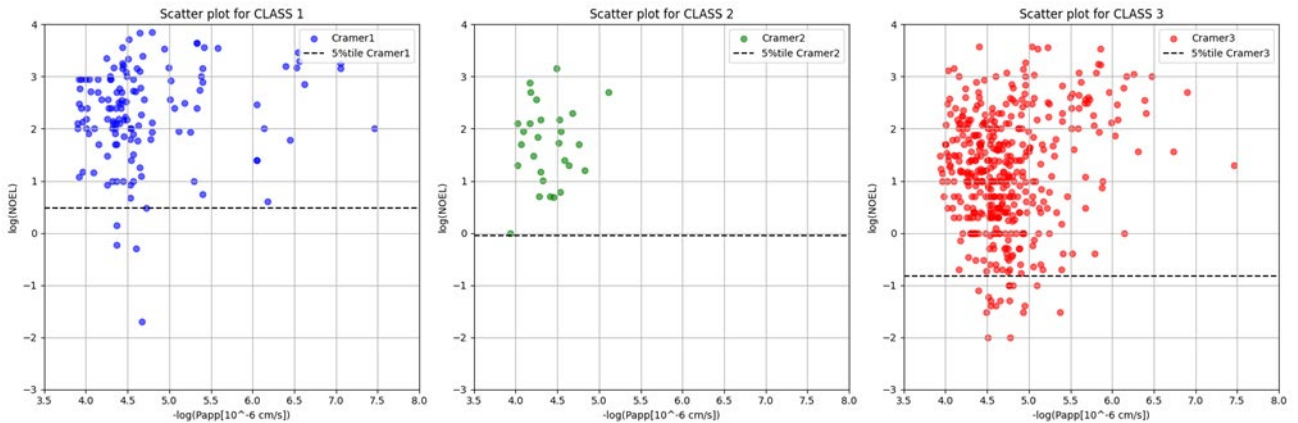


図 3-11 Munro データベースの Cramer クラスにおける Caco-2 透過性予測値と NOEL 値の関係  
 青 : Class I、緑 : Class II、赤 : Class III

いずれの Cramer クラスにおいても、Caco-2 透過性予測値が高い領域（透過性が低い領域、X 軸右側）では、NOEL 値の低い物質は非常に限られていることが明らかである（Y 軸下側）。そのため、Caco-2 透過性予測値を指標とした連続的 TTC を算出するため Caco-2 透過性予測値 (-logPapp) を 0.2 ずつの幅で区分し、各区分に含まれる化学物質の NOEL 値の分布の下側 5 パーセント値を求めた結果を図 3-12 に示す。本解析では、各 Caco-2 透過性予測値区分に含まれる物質数を増やすため全ての Cramer クラスの物質を使用して各区分の下側 5 パーセント値を求めている。Caco-2 透過性予測値(-logPapp 値)  $\approx 4.8$  を最小として、-logPapp 値の増加に比例して logNOEL 値の閾値（下側 5 パーセント値）の増加が示された。本解析における両者の回帰直線（緑線）は、 $\log\text{NOEL}=1.756 \cdot (-\log\text{Papp}) - 9.678$  であった。図 3-12 には、Munro らによる TTC 値の基準となった Cramer クラス I と III の NOEL 値の分布の下側 5 パーセント値をそれぞれ青、赤の破線で示した。結果から、緑線で示す -logPapp 値から計算される TTC 値が各 Cramer クラスの TTC 値より大きい値になる領域では -logPapp 値から計算される TTC 値を採用し、小さい値になる領域では Munro らの TTC 値を採用することでヒト健康に有害な影響を与えない閾値設定の可能性が示唆された。ただし、本解析では、-logPapp 値が高い値を示す領域に含まれる化学物質数が限られているため連続的 TTC そのものについては更なる検証が必要ではあるが、本研究班で構築した Caco-2 透過性 *in silico* モデルの NOEL (NOAEL) 値評価における有用性を示す結果であると考察された。

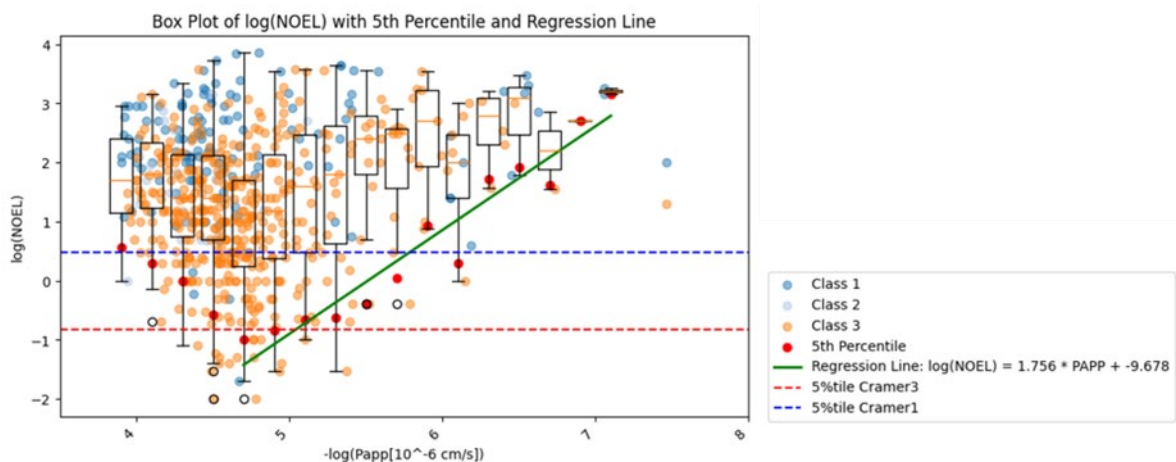


図 3-12 Caco-2 透過性予測値を基準にした連続的 TTC の算出

### ・各種ソフトウェアで計算可能な TK 関連指標等の NOAEL 評価における有用性の検討

本研究では、パブリックに公開されているソフトウェアにおいて計算可能な TK 関連パラメータについて調査を行い、実際に予測計算を行って反復投与毒性の NOEL (NOAEL) 値との関連について解析を行った。解析対象として、米国 EPA で開発された OPERA 及び欧州のプロジェクトで開発された VEGA を対象とした。これらのソフトウェアは、いずれもリスク評価での使用を想定して開発されたものである。OPERA では、TK 関連パラメータとして計算可能な Human plasma fraction unbound、Human hepatic intrinsic clearance、Membrane permeability measured using Caco-2 cell の 3 種について解析を行った。また毒性評価に関して CATMoS Acute Tox 2.6 LD50 が計算可能であることから併せて解析を行った。一方、VEGA では、TK 関連パラメータとして Plasma Protein Binding、Adipose tissue - blood model (INERIS)、Total body elimination half-life (QSARINS) (version 1.0.1) の 3 種と毒性関連指標として NOAEL (IRFMN-CORAL) (version 1.0.1)、Acute Tox (LD50) model (KNN) の 2 種のモデルについて解析を行った。結果を図 3-13～図 3-16 に示した。いずれのプロットとも、X 軸は *in silico* 予測値、Y 軸は NOEL (NOAEL) 値の対数値であり、プロットの色は、OECD QSAR Toolbox4.6 を用いた Cramer 毒性分類による毒性クラス (赤 : Class III、緑 : Class II、青 : Class I) を示す (農薬セットについては、Cramer 分類を行っていないが、全てが Class III である。)。OPERA で計算可能な TK 関連パラメータのうち、Human plasma fraction unbound は、本研究班で検討を行った血漿タンパク質結合率と逆の関係にありプロットは、図 3-4 と左右逆の傾向が認められる。また、Membrane permeability measured using Caco-2 cell は、本研究班でモデル構築した Caco-2 透過性と同じ指標であるが、本研究ではマイナス値をプラスに変換してモデル構築しているためプロットは左右逆の関係にある。本研究班で構築したモデルによる分布と比べてばらつきはあるものの、本研究班で構築したモデルによる予測値の解析結果と同様、膜透過性の低い領域 (X 軸左側の領域) では、NOEL (NOAEL) 値の低い物質は少ない傾向が認められ、このパラメータの有用性が示された。一方、OPERA で計算可能な LD50 値は、反復投与毒性の NOEL (NOAEL) 値とある程度の相関性が認められた。VEGA で計算可能な TK 関連パラメータのうち、Plasma Protein Binding、Adipose tissue - blood model (INERIS) については、反復投与毒性の NOEL (NOAEL) 値との関係に特定の傾向は認められないが、Total body elimination half-life (QSARINS) (version 1.0.1) については、half-life が長くなるに従い (X 軸右側)、NOEL (NOAEL) 値が低くなる傾向が認められた。VEGA では、毒性関連パラメータとして NOAEL 値と LD50 値のモデルが利用可能である、両パラメータとも反復投与毒性の NOEL (NOAEL) 値と相関性が認められた。特に LD50 予測値は、NOAEL 予測値および OPERA で計算される LD50 値に比べ、より実験で得られた NOEL (NOAEL) 値と 4 つの化学物質セットいずれにおいても良い相関性を示した。LD50 予測値は本研究で目的とする TK 関連パラメータではないが、反復投与毒性のリードアクロスにおける信頼性指標として有用であると考察された。

### 結論

本研究では、化学物質の反復投与毒性のリードアクロスの信頼性向上に向けた NAM 候補として各種 TK 関連パラメータの有用性について検討を行った。TK 関連パラメータとして、腸管吸収性の *in vitro* 指標として用いられている Caco-2 細胞を用いた膜透過性を、代謝安定性としてラット肝 S9 を用いた *in vitro* 代謝安定性、組織分布に關与する指標として血漿タンパク結合性について、独自に *in silico* モデルを構築して、*in vivo* 反復投与毒性試験による NOEL (NOAEL) 値との相関性について解析を行った結果、Caco-2 透過性予測値では、膜透過性が低くなるに従い NOEL (NOAEL) 値の低い物質が少なくなる傾向が認められ、Caco-2 透過性の反復投与 NOEL (NOAEL) 値のリードアクロスにおける TK 関連 NAM と

しての有用性が示された。Caco-2 透過性の有用性が示されたことから *in silico* モデル構築に用いる物質数を増やしてモデルの再構築を行い、テストセットにおける  $R^2 \approx 0.79$  のモデル構築に成功した。新たに構築したモデルによる Caco-2 透過性予測値と反復投与 NOEL (NOAEL) 値の相関性が認められた構造類似化合物群について Caco-2 透過性試験による検証の結果、物質によって予測値と実測値の違いは認められるものの、Caco-2 透過性(-logPapp 値)と無毒性量(Log(NOEL)値)との関係は、予測値と同様に、無毒性量が高い物質では Caco-2 透過性(-logPapp 値)が大きく Caco-2 透過性が低い傾向が明らかであり、Caco-2 透過性が反復投与 NOEL (NOAEL) 値のリードアクロスに有用な TK 関連 NAM であることが示された。また、物質によっては、LC-MS/MS での測定が困難であるなどの問題もあり、リードアクロスのための指標として QSAR モデルによる *in silico* 予測値は有用であり十分実用的であると考えられた。一方、Munro らにより提唱された TTC 値導出に用いられた化合物群について *in silico* Caco-2 透過性予測値と NOEL 値の分布から、Caco-2 透過性予測値から導出される連続的 TTC 値設定の可能性が示された。米国 EPA で開発された OPERA 及び欧州のプロジェクトで開発された VEGA で計算可能な TK 関連パラメータ及び毒性関連パラメータについて反復投与 NOEL (NOAEL) 値との関連を解析した結果、TK 関連パラメータのうち OPERA で計算された Membrane permeability measured using Caco-2 cell では、本研究で構築した Caco-2 透過性モデルと同様の分布を示したことから反復投与毒性のリードアクロスにおける有用性が示された。また、VEGA で計算された Total body elimination half-life (QSARINS) (version 1.0.1) については、half-life が長くなるに従い NOEL (NOAEL) 値が低くなる傾向が認められた。また、VEGA で計算される毒性関連パラメータのうち LD50 値は反復投与 NOEL (NOAEL) 値と良い相関性を示し、反復投与毒性のリードアクロスにおける信頼性指標として有用であると考察された。

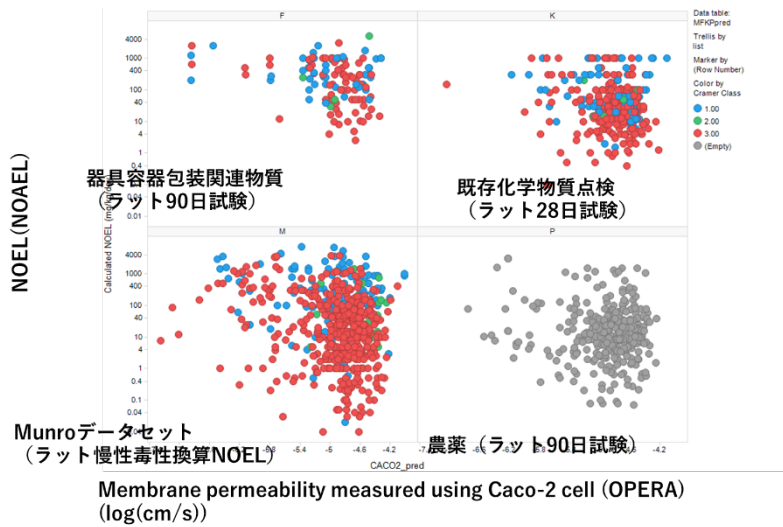
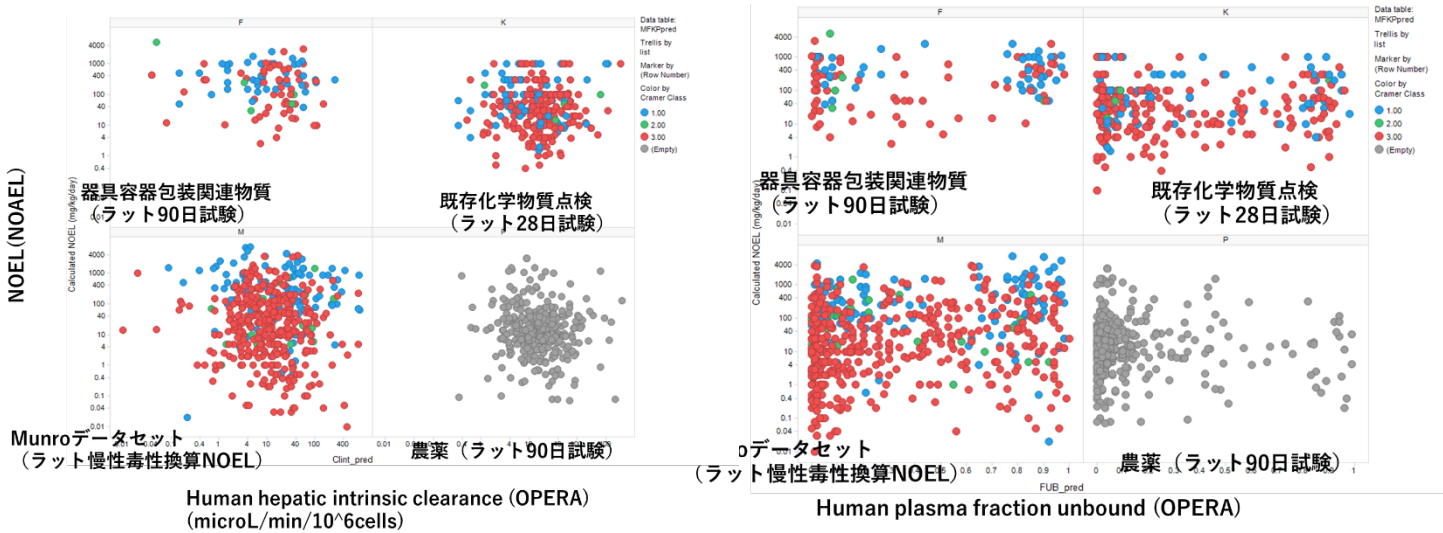


図 3-13 OPERA で計算可能な TK 関連パラメータと反復投与毒性 NOEL (NOAEL) 値との関係

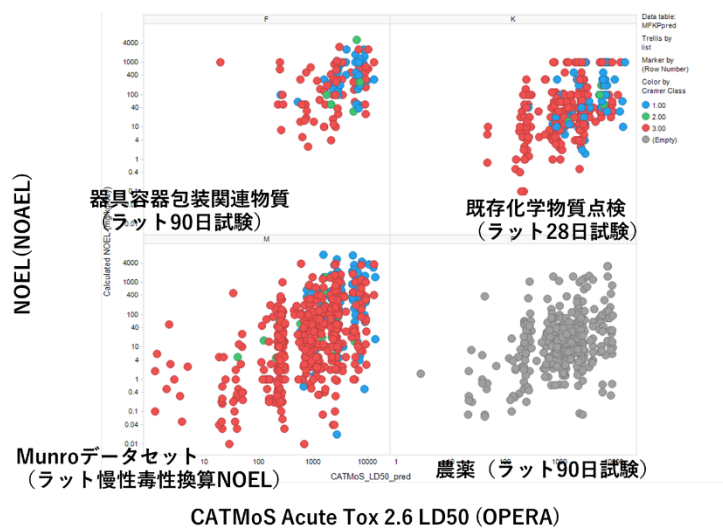


図 3-14 OPERA で計算可能な毒性関連パラメータと反復投与毒性 NOEL (NOAEL) 値との関係

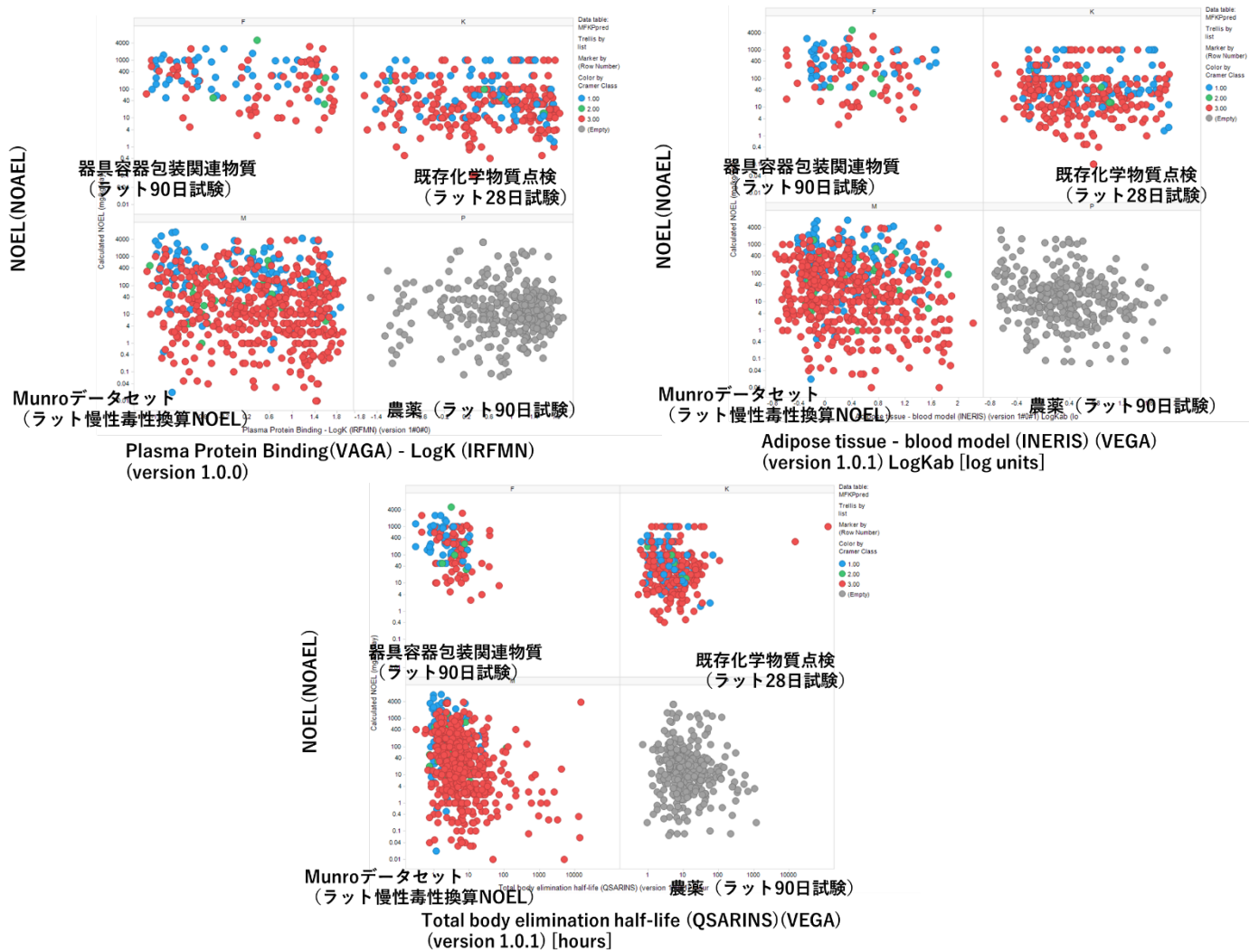


図 3-15 VEGA で計算可能な TK 関連パラメータと反復投与毒性 NOEL (NOAEL) 値との関係

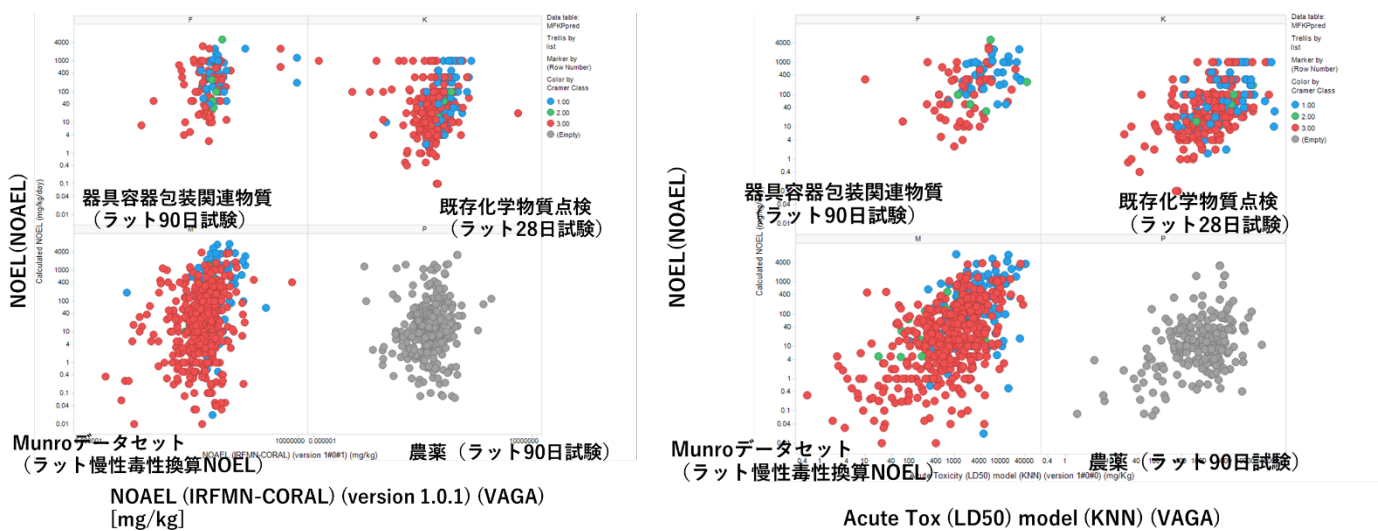


図 3-16 VEGA で計算可能な毒性関連パラメータと反復投与毒性 NOEL (NOAEL) 値との関係

3-3) リードアクロスに有用なトキシコダイナミクス (TD) 関連試験の同定およびトキシコダイナミクス (TD) 関連データを利用したリードアクロスのケーススタディ (吉成浩一 (静岡県立大学) )

#### ① 評価対象所見の解析とデータセット整備

本研究では、無毒性量の決定要因となりやすい標的臓器やエンドポイントを対象として、それら所見のリードアクロスによる評価、特に類似物質の特定における *in vitro* 試験結果の有用性を提示することを目指している。そこで、まずは対象とすべき毒性エンドポイントと化学物質群の選定を進めた。

分担研究者の吉成の研究室で構築した、農薬評価書 (約360農薬、450試験) のラット90日間反復投与毒性試験 (90日間試験) ならびにラット2年間反復投与毒性・発がん性試験 (2年間試験) のデータベースを活用して、各農薬について、いずれかの投与量で認められたすべての所見ならびにLOAELとなった用量で認められた所見を、雌雄別に90日間試験と2年間試験で集計し、比較解析した (表3-15)。なお、以下では前者を全所見ランキング、後者をLOAELランキングとする。

どのランキングでも共通してみられる所見も多かったが、雄の90日間試験では、 $\gamma$ -GTP増加及びBUN増加が全所見ランキングでのみ、死亡率増加、血中アルブミン増加がLOAELランキングでのみ15位以内に入っていた。雌の90日間試験では、 $\gamma$ -GTP増加、血中総タンパク増加、BUN増加及びALP増加が全所見ランキングでのみ、腎絶対重量増加、食餌効率減少、脾臓色素沈着、コリンエステラーゼ (ChE) 阻害がLOAELランキングでのみ15位以内に入っていた。2年間試験については、雄では、摂餌量減少が全所見ランキングでのみ、コリンエステラーゼ (ChE) 阻害がLOAELランキングでのみ15位以内に入っていた。雌では、BUN増加、MCV (平均赤血球容積) 減少が全所見ランキングでのみ、ChE阻害、胆管過形成がLOAELランキングでのみ15位以内に入っていた。

90日間試験と2年間試験の結果を比較すると、血中総タンパク増加及びALP増加、脾臓色素沈着は90日間試験でのみ、腎症、胆管過形成は2年間試験でのみ上位に入っていた。また、ランキング間の比較をすると、BUN増加、ALP増加、MCV減少が全所見ランキングでのみ、ChE阻害、脾臓色素沈着がLOAELランキングでのみ上位に認められた。全所見ランキングで上位の所見は認められる農薬数が多く、他方LOAELランキングで上位の所見は低用量で認められ、LOAELの決定要因になりやすいと考えられる。よって、それらの所見は農薬の反復投与毒性を評価する上で重要な所見と考えられる。

したがって、農薬のラット反復投与毒性試験においては、肝関連所見、腎関連所見、貧血関連 (脾臓色素沈着を含む) 所見、ChE阻害などが毒性学的に重要な所見であると考えられた。これらの所見を評価対象として、類似物質特定の信頼性向上に資するTDに関連した *in vitro* 試験を実施することとした。

肝毒性や腎毒性に関しては、所見の種類が多いが、それらの毒性学的な意味合いは異なることから、全てをまとめて「肝毒性」や「腎毒性」とすることは適切ではない。他方、毒性学的に類似した所見はグループ化して評価することは解析の効率化に繋がる。以上のことから、上記データベースで使用している約1,000種の所見について、関連性を考察して、肝毒性で6種 (LV01~LV06)、血液毒性で2種 (BL01、BL02)、腎毒性で2種 (KD01、KD02) の毒性所見グループ (group endpoint, gEP) を作成した (表3-16)。ChE阻害についてもCE01と定義した。

表3-15 毒性学的に重要な所見の同定

A. 90日間試験											
雄性					雌性						
全所見ランキング		LOAELランキング			全所見ランキング		LOAELランキング				
順位	所見	陽性率	順位	所見	陽性率	順位	所見	陽性率	順位		
1	体重-体重-減少	0.701	1	体重-体重-減少	0.315	1	体重-体重-減少	0.669	1	体重-体重-減少	0.329
2	肝臓-重量増加-相対重量	0.527	2	肝臓-重量増加-相対重量	0.301	2	肝臓-重量増加-相対重量	0.541	2	肝臓-重量増加-相対重量	0.323
3	摂餌/摂水-摂餌量-減少	0.451	3	肝臓-重量増加-絶対重量	0.2	3	摂餌/摂水-摂餌量-減少	0.442	3	肝臓-重量増加-絶対重量	0.218
4	肝臓-重量増加-絶対重量	0.358	4	摂餌/摂水-摂餌量-減少	0.169	4	肝臓-重量増加-絶対重量	0.397	4	摂餌/摂水-摂餌量-減少	0.153
5	血液学-Hb-減少	0.346	5	肝臓-細胞肥大-中心性	0.135	5	血液学-Hb-減少	0.348	5	血液生化学-コレステロール-増加	0.142
6	血液学-Ht-減少	0.301	6	血液学-Hb-減少	0.132	6	血液生化学-コレステロール-増加	0.326	6	血液学-Hb-減少	0.13
7	血液生化学-コレステロール-増加	0.268	7	血液学-Ht-減少	0.132	7	血液学-Ht-減少	0.317	7	肝臓-細胞肥大-中心性	0.119
8	肝臓-細胞肥大-中心性	0.262	8	血液生化学-コレステロール-増加	0.115	8	血液学-RBC-減少	0.252	8	血液学-Ht-減少	0.116
9	血液学-RBC-減少	0.262	9	腎臓-重量増加-相対	0.099	9	肝臓-細胞肥大-中心性	0.229	9	血液学-RBC-減少	0.096
10	腎臓-重量増加-相対	0.245	10	血液学-RBC-減少	0.087	10	腎臓-重量増加-相対	0.201	10	腎臓-重量増加-相対	0.082
11	血液生化学-総タンパク-増加	0.177	11	外観行動-死亡率-増加	0.085	11	血液生化学-GGT-増加	0.187	11	腎臓-重量増加-絶対	0.057
12	血液生化学-GGT-増加	0.172	12	血液生化学-総タンパク-増加	0.073	12	血液生化学-総タンパク-増加	0.144	12	血液学-赤血球ChE活性-減少	0.057
13	血液生化学-BUN-増加	0.158	13	肝臓-細胞肥大-びまん性	0.065	13	血液生化学-BUN-増加	0.144	13	脾臓-色素沈着-脾臓	0.045
14	肝臓-細胞肥大-びまん性	0.149	14	血液生化学-アルブミン-増加	0.059	14	肝臓-細胞肥大-びまん性	0.142	14	肝臓-細胞肥大-びまん性	0.042
15	血液生化学-中性脂肪-減少	0.149	15	血液生化学-中性脂肪-減少	0.058	15	血液生化学-ALP-増加	0.127	15	摂餌/摂水-食餌効率-減少	0.042
19	血液生化学-アルブミン-増加	0.138	23	血液生化学-GGT-増加	0.042	17	腎臓-重量増加-絶対	0.122	16	血液生化学-総タンパク-増加	0.037
35	外観行動-死亡率-増加	0.085	33	血液生化学-BUN-増加	0.031	19	摂餌/摂水-食餌効率-減少	0.119	28	血液生化学-GGT-増加	0.025
						31	脾臓-色素沈着-脾臓	0.085	42	血液生化学-BUN-増加	0.02
						43	血液学-赤血球ChE活性-減少	0.059	48	血液生化学-ALP-増加	0.017

B. 2年間試験											
雄性					雌性						
全所見ランキング		LOAELランキング			全所見ランキング		LOAELランキング				
順位	所見	陽性率	順位	所見	陽性率	順位	所見	陽性率	順位		
1	体重-体重-減少	0.696	1	体重-体重-減少	0.385	1	体重-体重-減少	0.75	1	体重-体重-減少	0.421
2	肝臓-重量増加-相対重量	0.382	2	肝臓-重量増加-相対重量	0.19	2	肝臓-重量増加-相対重量	0.372	2	肝臓-重量増加-相対重量	0.155
3	摂餌/摂水-摂餌量-減少	0.352	3	肝臓-細胞肥大-中心性	0.152	3	肝臓-重量増加-相対重量	0.353	3	摂餌/摂水-摂餌量-減少	0.155
4	肝臓-重量増加-絶対重量	0.293	4	摂餌/摂水-摂餌量-減少	0.146	4	血液学-Hb-減少	0.239	4	肝臓-細胞肥大-中心性	0.111
5	肝臓-細胞肥大-中心性	0.22	5	肝臓-重量増加-絶対重量	0.138	5	血液学-Ht-減少	0.239	5	血液生化学-コレステロール-増加	0.092
6	血液学-Hb-減少	0.209	6	腎臓-重量増加-相対	0.087	6	肝臓-重量増加-絶対重量	0.236	6	肝臓-重量増加-絶対重量	0.087
7	血液学-Ht-減少	0.201	7	腎臓-腎症-腎	0.081	7	肝臓-細胞肥大-中心性	0.201	7	血液学-Hb-減少	0.082
8	腎臓-重量増加-相対	0.201	8	肝臓-細胞肥大-びまん性	0.068	8	血液生化学-コレステロール-増加	0.198	8	腎臓-重量増加-相対	0.079
9	血液学-RBC-減少	0.16	9	腎臓-重量増加-絶対	0.068	9	血液学-RBC-減少	0.188	9	血液学-Ht-減少	0.073
10	腎臓-重量増加-絶対	0.157	10	血液学-赤血球ChE活性-減少	0.065	10	腎臓-重量増加-相対	0.179	10	血液学-RBC-減少	0.065
11	腎臓-腎症-腎	0.144	11	血液生化学-コレステロール-増加	0.062	11	腎臓-腎症-腎	0.12	11	血液学-赤血球ChE活性-減少	0.065
12	血液生化学-コレステロール-増加	0.138	12	血液学-Hb-減少	0.06	12	血液生化学-BUN-増加	0.106	12	肝臓-細胞肥大-びまん性	0.063
13	血液生化学-GGT-増加	0.108	13	血液学-Ht-減少	0.06	13	摂餌/摂水-食餌効率-減少	0.106	13	腎臓-腎症-腎	0.063
14	肝臓-細胞肥大-びまん性	0.108	14	血液生化学-GGT-増加	0.051	14	肝臓-細胞肥大-びまん性	0.103	14	摂餌/摂水-食餌効率-減少	0.054
15	摂餌/摂水-食餌効率-減少	0.108	15	血液学-RBC-減少	0.051	15	血液学-MCV-減少	0.103	15	肝臓-増殖-胆管	0.046
29	血液学-赤血球ChE活性-減少	0.076	21	摂餌/摂水-食餌効率-減少	0.035	22	血液学-赤血球ChE活性-減少	0.079	23	血液学-MCV-減少	0.033
						23	肝臓-増殖-胆管	0.076	32	血液生化学-BUN-増加	0.024

全所見ランキングとLOAELランキングについて、上位15所見を示した。また、両ランキングのどちらかでのみ15位に入った所見については、他のランキングの順位も示した。

表3-16 本研究で定義したグループ所見

gEP ID	標的	概要	含まれる代表的所見
LV01	肝臓	細胞死	ALT↑、肝細胞壊死、肝臓炎症
LV02		肝機能低下	血中ALB↓、血中総タンパク↓、肝絶対重量低下
LV03		肝機能亢進	血中ALB↑、血中総タンパク↑
LV04		胆管障害	血中Bil↑、ALP↑、γ-GTP↑
LV05		肥大	肝細胞肥大、肝肥大、肝絶対重量増加
LV06		脂質代謝異常	血中総Chol↑↓、TG↑↓、肝空胞変性
BL01	血液	凝固障害	PT延長、APTT延長
BL02		貧血	RBC減少、Hb減少、Ht減少
KD01	腎臓	腎重量増加	腎絶対重量増加
KD02		腎障害	BUN↑、血中Cre↑、尿タンパク↑、尿細管壊死
CE01	ChE	ChE活性低下	脳ChE活性阻害、赤血球ChE活性阻害

## ② 毒性エンドポイントと*in vitro*試験の関連性

肝毒性、血液毒性、腎毒性で設定したgEPに関しては、無毒性量の決定要因となることがしばしばあるものの、多くの場合、発現機序が明確になっていない。そのため、機序に基づいて*in vitro*試験を選定することは困難な場合も多い。そこで、毒性所見と*in vitro*試験結果の関連性を統計学的に解析し、関連性の高い試験を選択することで、リードアクロスの類似物質選定の信頼性向上に有用な試験を見出すことができるのではないかと考えた。この仮説を検証するため、過去に当研究室で取得した325種の一般化学物質（有害性評価支援システム統合プラットフォーム（HESS）搭載物質）の*in vitro*試験結果と、雄性ラットの反復投与毒性試験（28日又は42日間試験が中心）結果の関連性をWilcoxonの順位和検定により解析した。解析には、ラットシトクロムP450（P450）/UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ阻害試験、ラット肝細胞におけるP450（CYP2B1、CYP3A1、CYP4A1）誘導試験、ラット核内受容体（AHR、PXR、LXR $\alpha$ 、RXR $\alpha$ 、FXR）活性化試験、HepG2細胞（ヒト肝がん由来）及びNRK-52E細胞（ラット腎由来）の細胞傷害性試験（LDHアッセイ、CellTiter（ATP）アッセイ、細胞内GSHレベル測定）、ならびにHepG2細胞及びNRK-52E細胞のハイコンテンツ解析（核、ミトコンドリア、アクチン、トリグリセリド蓄積、リン脂質蓄積）の結果を使用した。これら試験に関しては、市販のキットを活用して研究室で定めたプロトコールに基づいて実施され、実験データの採用基準も設定されている。

解析の結果、LV02（肝機能低下）ではハイコンテンツ解析によるトリグリセリド蓄積、アクチンやミトコンドリアに関するパラメータと、LV05（肝肥大）では、CYP2B1誘導とCYP2B1阻害、LV06（脂質代謝異常）ではCYP2B1阻害とCYP3A2阻害、BL01（血液凝固障害）ではHepG2細胞のハイコンテンツ解析パラメータ（核、ミトコンドリア、アクチン、中性脂肪）、BL02（貧血）ではCYP2B1誘導とCYP3A1誘導との間に、 $P < 0.001$ の強い有意な関連性が認められた。LV01（肝細胞壊死）、LV03（肝機能亢進）、LV04（胆管障害）、KD01（腎絶対重量増加）においても $P < 0.05$ で関連性を示すパラメータが認められた。一方、KD02（腎障害）では該当するパラメータは見出されなかった。

P450の誘導や活性阻害が肝毒性発現にどのように関与するのは必ずしも明確になっていないが、吉成らは、ヒトCYP1A1やCYP1B1の活性を強く阻害する薬物のほとんどは臨床で肝障害を誘発すること（Shimizu *et al.*, 2022）<sup>21</sup>、またラットで持続的にCYP1A1を阻害するとAHRの内因性リガンドの代謝が阻害され、AHRシグナルの亢進に伴う肝毒性が生じることを見出している（Yoda *et al.*, 2022）<sup>22</sup>。

そこで、農薬におけるP450阻害活性と肝毒性との関連性を解析し、類似性評価におけるP450阻害試験の有用性を調べることにした。農薬評価書が入手可能な126農薬を被験物質として選択し、6種のラットP450（CYP1A1、CYP1A2、CYP2B1、CYP2C6、CYP2D1、CYP3A2）に対する0.1、1、10  $\mu$ Mでの被験物質の阻害活性をP450-Glo CYP1A1 Assay、P450-Glo CYP1A2 Induction/Inhibition Assay、P450-Glo Rat CYP2B1 Induction/Inhibition Assay、P450-Glo Rat CYP2C6 Induction/Inhibition Assay、P450-Glo CYP2D6 Assay（Luciferin-ME EGE）及びP450-Glo CYP3A2 Assayを用いて測定した。酵素源には各P450分子種の組換え酵素（Corning）を用いた。溶媒対照群の残存活性（100%）から被験物質の残存活性を引くことで阻害活性（%）を算出した。3濃度での阻害活性値のうち最も大きい阻害活性値を被験物質の阻害活性値とし、その分布を図3-17に箱ひげ図で示した。調べた6分子種のうち、CYP1A1、CYP2B1、CYP2C6及びCYP3A2は他の2分子種に比べて阻害を受けやすい傾向が見られた。

<sup>21</sup> Association of CYP1A1 and CYP1B1 inhibition in *in vitro* assays with drug-induced liver injury. Shimizu Y, et al., J Toxicol Sci. 2021;46(4):167-176. doi: 10.2131/jts.46.167.PMID: 33814510

<sup>22</sup> Involvement of the CYP1A1 inhibition-mediated activation of aryl hydrocarbon receptor in drug-induced hepatotoxicity. Yoda T, et al., J Toxicol Sci. 2022;47(9):359-373. doi: 10.2131/jts.47.359.PMID: 36047110

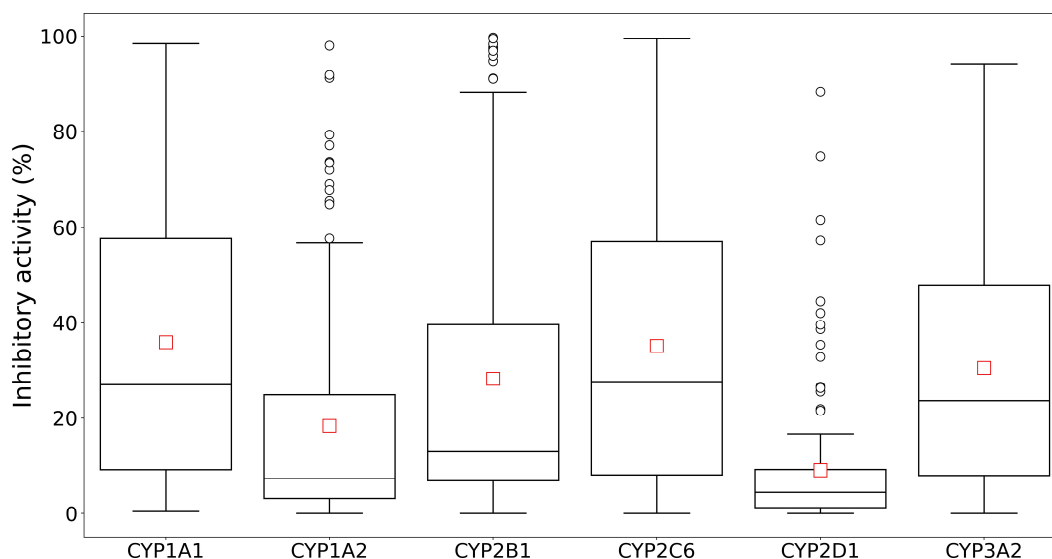


図3-17 農薬のラットP450分子種に対する阻害活性の分布

次に肝毒性とP450阻害の関連性を調べた。阻害活性については、阻害活性が15%以上の場合に陽性と判定し、陽性・陰性の2値とした。また、126農薬のラット2年間試験及びラット90日間試験結果を参照し、肝毒性に関する6種のgEP (LV01～LV06) について、gEP内のいずれかの所見が陽性であれば該当gEPを陽性とした。これらの結果とP450阻害試験の関連性についてFisherの正確確率検定を実施した。また、各gEPの陽性農薬群と陰性農薬群とのP450阻害活性の中央値をWilcoxonの順位和検定により比較した。結果を表3-17に示した。Fisherの正確確率検定の結果を見ると、医薬品候補化合物における最近の研究成果 (Yoda et al., 2022) と一致して、CYP1A1阻害とLV05 (肥大) 及びLV06 (脂質代謝異常) において、両期間の試験においてともに有意な関連が認められた。90日間試験では、LV04 (胆管障害) もCYP1A1阻害と有意な関連を示した。興味深いことに、LV05及びLV06との関連性はCYP2C6阻害においても認められた。これら以外では、CYP3A2とLV04の間にも有意な関連が認められた。Wilcoxonの順位和検定の結果はこれらとほぼ同様のパターンを示し、LV04、LV05、LV06の陽性・陰性物質の間ではCYP1A1、CYP2C6及びCYP3A2に対する阻害活性に差があることが示された。

表3-17 肝毒性関連gEPとラットP450阻害活性の関連性

Study	gEP	n	CYP1A1	CYP1A2	CYP2B1	CYP2C6	CYP2D1	CYP3A2	
毒性試験及びP450阻害試験の陽性/陰性の比較 (p values of Fisher's exact test)									
2-year	LV01	27	0.173	0.813	1	0.122	0.554	1	
	LV02	20	1	0.596	1	0.804	0.502	0.220	
	LV03	26	0.247	0.814	1	0.071	0.223	0.127	
	LV04	31	0.285	0.496	0.213	0.091	0.245	<b>0.006</b>	
	LV05	60	<b>&lt;0.001</b>	0.847	<b>0.049</b>	<b>0.006</b>	0.455	0.108	
	LV06	59	<b>0.003</b>	0.331	0.721	<b>0.003</b>	0.327	0.073	
	gEPの陽性群と陰性群のP450阻害活性の中央値比較 (p values of Wilcoxon rank-sum test)								
	LV01	27	0.461	0.854	0.521	0.14	0.849	0.780	
	LV02	20	0.633	0.456	0.756	0.543	0.195	0.239	
	LV03	26	0.553	0.304	0.873	0.133	0.774	0.163	
	LV04	31	0.181	0.768	0.411	<b>0.037</b>	0.485	<b>0.008</b>	
	LV05	60	<b>0.001</b>	0.742	<b>0.017</b>	<b>0.008</b>	0.485	<b>0.031</b>	
LV06	59	<b>0.003</b>	0.174	0.42	<b>0.024</b>	0.645	0.063		
毒性試験及びP450阻害試験の陽性/陰性の比較 (p values of Fisher's exact test)									
90-day	LV01	24	0.345	0.803	0.820	0.162	0.204	0.503	

LV02	33	0.394	0.827	0.543	1	1	0.412
LV03	36	0.095	0.831	1	0.231	0.790	0.320
LV04	47	<b>0.006</b>	1	0.711	<b>0.001</b>	0.201	<b>0.016</b>
LV05	61	<b>&lt;0.001</b>	1	0.368	<b>0.002</b>	0.222	0.205
LV06	60	<b>0.022</b>	0.558	0.281	<b>0.026</b>	0.215	0.717
gEPの陽性群と陰性群のP450阻害活性の中央値比較 ( <i>p</i> values of Wilcoxon rank-sum test)							
LV01	24	0.343	0.219	0.394	0.185	0.09	0.134
LV02	33	0.769	0.902	0.236	0.920	0.801	0.957
LV03	36	0.179	0.669	0.923	0.119	0.465	0.517
LV04	47	<b>0.026</b>	0.371	0.461	<b>0.009</b>	0.979	<b>0.006</b>
LV05	61	<b>0.003</b>	0.331	0.333	<b>0.014</b>	0.887	0.067
LV06	60	0.143	0.763	<b>0.046</b>	<b>0.017</b>	0.859	0.089

*n*は各gEPにおける陽性所見数を示す。90日間試験では3農薬は結果がなかったため123農薬の結果を用いて解析した。

CYP1A1及びCYP2C6阻害の有無とLV05及びLV06の有無との間に関連性が認められたことから、これらP450阻害活性とLV05及びLV06のLOAELとの間に定量的な関連があるかを確かめるため、2年間試験においてLOAELが認められた農薬（LV05: 60種、LV06: 59種）について、CYP1A1及びCYP2C6の阻害活性値とLOAEL値を用いた単回帰分析を行った（図3-18A）。その結果、CYP1A1及びCYP2C6阻害とLV05及びLV06のLOAELのいずれの組合せについても、決定係数（ $R^2$ ）は0.04未満と小さく、有意な相関は認められなかった。

対象とした毒性EPは多様な機序で生じると考えられること、また、構造類似物質は代謝反応や生物学的応答、毒性発現機序を共有する場合があることから、次に、農薬クラスに基づいて作成した類似化学構造物質のグループにおいて定量的な関連性を調べた。具体的には、有機リン系農薬などの農薬クラスを参考に126農薬を分類・グループ化し、少なくとも5農薬を含み、かつLV05又はLV06陽性の農薬を3つ以上含むグループであったカルバメート系農薬（5種）、トリアゾール系農薬（5種）、酸アミド系農薬（5種）について、P450阻害活性値とLOAEL値の単回帰分析を実施した（図3-18B-D）。その結果、カルバメート系農薬におけるLV05及びLV06のLOAELとCYP2C6阻害の組合せにおいて、逆相関の関係性が認められ、決定係数も大きな値（ $R^2 > 0.50$ ）となった。

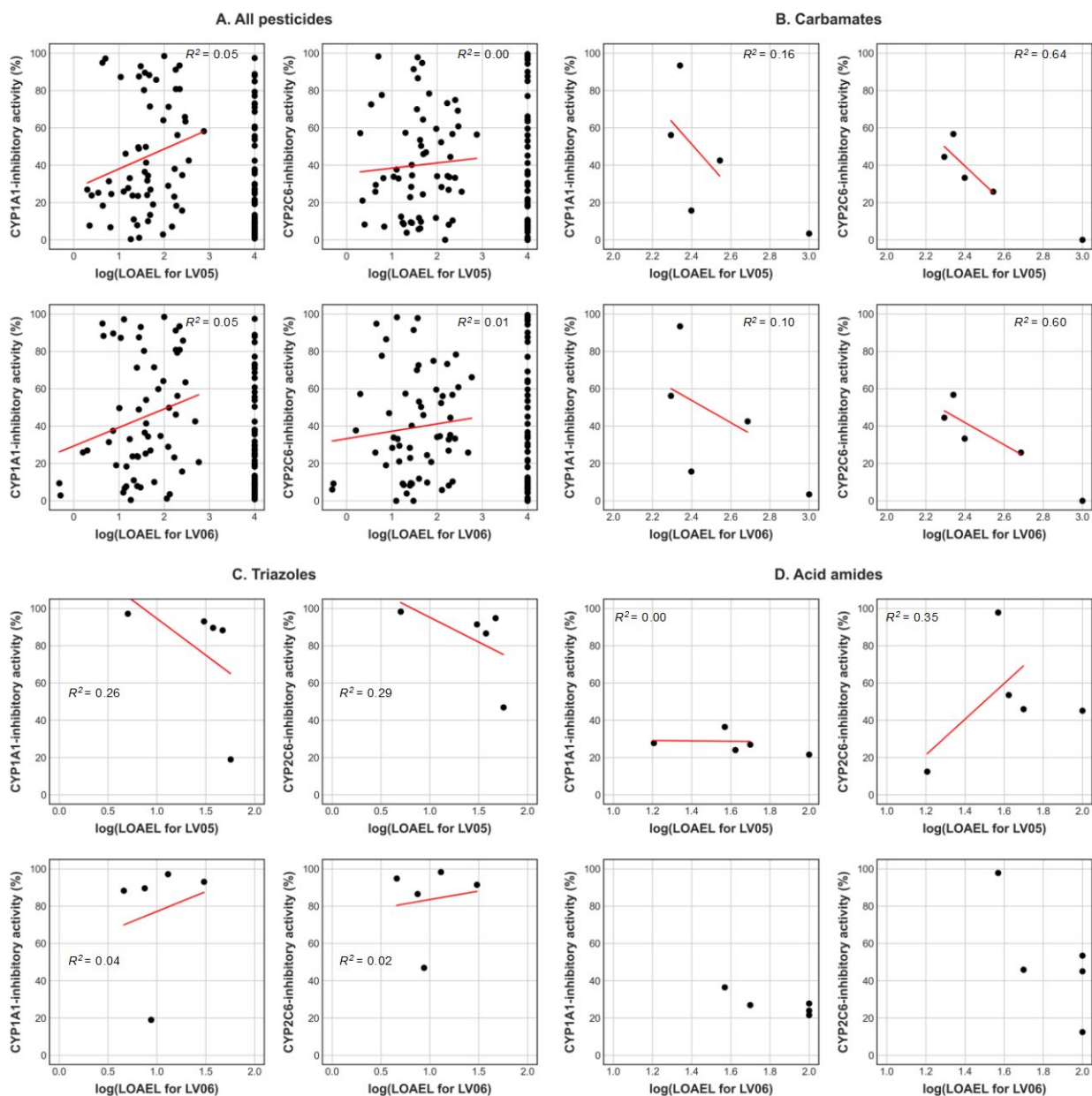


図3-18 CYP1A1及びCYP2C6阻害活性値とLV05及びLV06のLOEL値の定量的関連性

③ リードアクロスのケーススタディに向けた神経毒性の*in vitro*試験系の評価

①項で評価対象とした毒性所見のうち、ChE阻害はしばしばNOAELの決定要因となっており、また、当該毒性所見と関連性があり再現性が期待される*in vitro*活性測定キットも市販されていることから、毒性評価対象としてCE01を選択し、それと関連する*in vitro*活性阻害試験を実施することとした。

令和5年度の検討結果を踏まえて、酵素源をラット血清からヒトAChEの組換え酵素（Sigma-Aldrich, #C1682）に変更し、予備検討の結果から、AChEの終濃度は0.0125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。測定キットはAmplite Colorimetric Acetylcholinesterase Assay Kit（AAT Bioquest, Inc.）を用いた。チオノ型有機リン系農薬のように、ChE活性阻害には代謝活性化が必要な物質が存在することから、試験系にラット肝ミクロソーム（Ms；雄性SDラット肝由来, pooled; Corning, #452501）及びNADPH生成系（Promega）を添加した。予備検討結果から、Msの終濃度は0.1  $\text{mg}/\text{mL}$ とし、対照群には95°Cで5分間加熱して酵素を失活させたMsを

添加した。被験物質として有機リン系農薬27種、カルバメート系農薬20種を使用し（表3-18、図3-18）、終濃度は1、10及び100 µMとしてtriplicateで実験を行った。結果は溶媒対照群を100%とした残存活性で示し、残存活性が90%未満の場合、阻害活性ありと判定した。

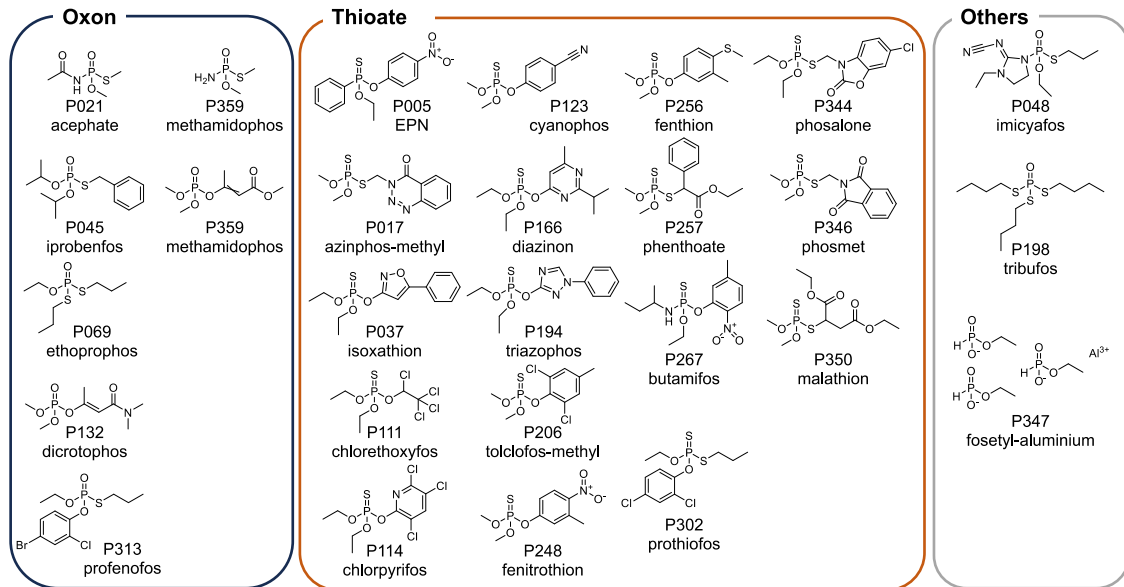
表3-18 AChE阻害試験で使用した農薬とその90日間及び2年間試験の最小LOAEL/NOAEL値

ID	名称	分類	用途	CE01	LOAEL/NOAEL (mg/kg体重/日)			
					90日間 LOAEL	90日間 NOAEL	2年間 LOAEL	2年間 NOAEL
<b>有機リン系農薬</b>								
P005	EPN	Thioate	殺虫剤	1	1.48	0.3	0.73	0.14
P017	アジンホスメチル	Thioate	殺虫剤	1	0.86	0.215	0.75	0.25
P021	アセフェート	Oxon	殺虫剤	1	0.41	0.33	2.4	0.24
P037	イソキサチオン	Thioate	殺虫剤	1	1.19	0.408	2.38	1.19
P045	イプロベンホス	Oxon	殺虫剤	1	-	47.5	36.8	3.54
P048	イミシアホス	Others	殺線虫剤	1	0.93	0.28	0.51	0.15
P069	エトプロホス	Oxon	殺虫剤	1	0.015	0.26	2.44	0.04
P111	クロロエトキシホス	Thioate	殺虫剤	1	0.357	0.071	0.416	0.208
P114	クロロピリホス	Thioate	殺虫剤	1	1	0.1	10	1.0
P123	シアノホス (CYAP)	Thioate	殺虫剤	1	1.35	0.2	0.338	0.101
P132	ジクロトホス	Oxon	殺虫剤	1	0.04	-	0.05	0.05
P166	ダイアジノン	Thioate	殺虫剤	1	1.7	0.018	1.5	0.1
P194	トリアゾホス	Thioate	殺虫剤	1	1.6	0.08	1.3	0.15
P198	トリブホス	Others	植物成長調整剤	1	4.5	0.9	1.8	0.2
P206	トルクロホスメチル	Thioate	殺虫剤	1	696	71	-	41.6
P248	フェントロチオン	Thioate	殺虫剤	1	3.99	1.32	1.45	0.49
P256	フェンチオン	Thioate	殺虫剤	1	1	0.13	0.72	0.14
P257	フェントエート	Thioate	殺虫剤	1	1.95	0.66	-	16.2
P267	ブタミホス	Thioate	殺虫剤	1	6.5	0.6	3	0.8
P302	プロチオホス	Thioate	殺虫剤	1	2.26	0.37	2.67	0.27
P313	プロフェノホス	Oxon	殺虫剤	1	0.87	0.21	0.56	0.017
P344	ホサロン	Thioate	殺虫剤	1	3.9	-	1.8	0.2
P346	ホスメット	Thioate	殺虫剤	1	5	1	9.4	1.8
P347	ホセチルアルミニウム	Others	殺菌剤	0	-	1270	-	1370
P350	マラチオン	Thioate	殺虫剤	1	340	4	50	5
P359	メタミドホス	Oxon	殺虫剤	1	0.6	0.067	0.288	0.095
P375	メビンホス	Oxon	殺虫剤	1	0.35	0.025	0.35	0.025
<b>カルバメート系農薬</b>								
P016	アシュラム	Carbamate	除草剤	0	-	1330	-	953
P033	アルジカルブ	Carbamate	殺虫剤	1	0.05	0.5	1.45	0.1
P034	アルドキシカルブ	Carbamate	殺虫剤	1	5.4	1.8	-	2.4
P058	エスプロカルブ	S-Thio	除草剤	0	-	328	-	73
P087	カルバリル	Carbamate	殺虫剤、植物成長調整剤	1	10	1	78.6	12.6
P125	ジエトフェンカルブ	Carbamate	殺菌剤	0	-	571	-	219
P175	チオベンカルブ	S-Thio	除草剤	0	-	131	-	22
P180	デスメディファム	Carbamate	除草剤	0	-	26	-	64.4
P234	ピリブチカルブ	O-Thio	除草剤	1	367	35.4	-	197
P238	ピリミカーブ	Carbamate	殺虫剤	0	-	38.8	-	37.3
P251	フェノチオカルブ	S-Thio	殺ダニ剤	0	-	59.8	-	83.7
P252	フェノブカルブ	Carbamate	殺虫剤、外部寄生虫の駆除	0	-	69.6	-	4.1
P265	フェンメディファム	Carbamate	除草剤	0	-	92.3	-	25
P300	プロスルホカルブ	S-Thio	除草剤	0	-	200	-	48
P312	プロファム	Carbamate	除草剤、植物成長調整剤	0	-	384	-	150

P337	ベンチアバリカルブイ ソプロピル	Carbamate	殺菌剤	0	-	1440	-	518
P349	塩酸ホルメタネート	Carbamate	殺虫/殺ダニ剤	1	-	18.4	2.3	0.45
P361	メタムアンモニウム塩	Dithio	殺線虫剤、殺菌剤、 殺虫剤、除草剤	0	-	50	-	10
P365	メチオカルブ	Carbamate	殺虫剤	0	NT	NT	-	29
P379	モリネート	S-Thio	除草剤	1	13.9	4.5	13	1.8

90日間LOAEL/NOAELは、ラット90日間亜急性毒性試験、90日間亜急性神経毒性試験及び相当する試験の雌雄のLOAEL/NOAEL値のうち最小値、2年間LOAEL/NOAELは、ラット2年間慢性毒性試験、2年間発がん性試験、2年間慢性毒性発がん性併合試験及び相当試験の雌雄のLOAEL/NOAEL値のうち最小値を示す。-, not available; NT, not tested.

### 有機リン系



### カルバメート系

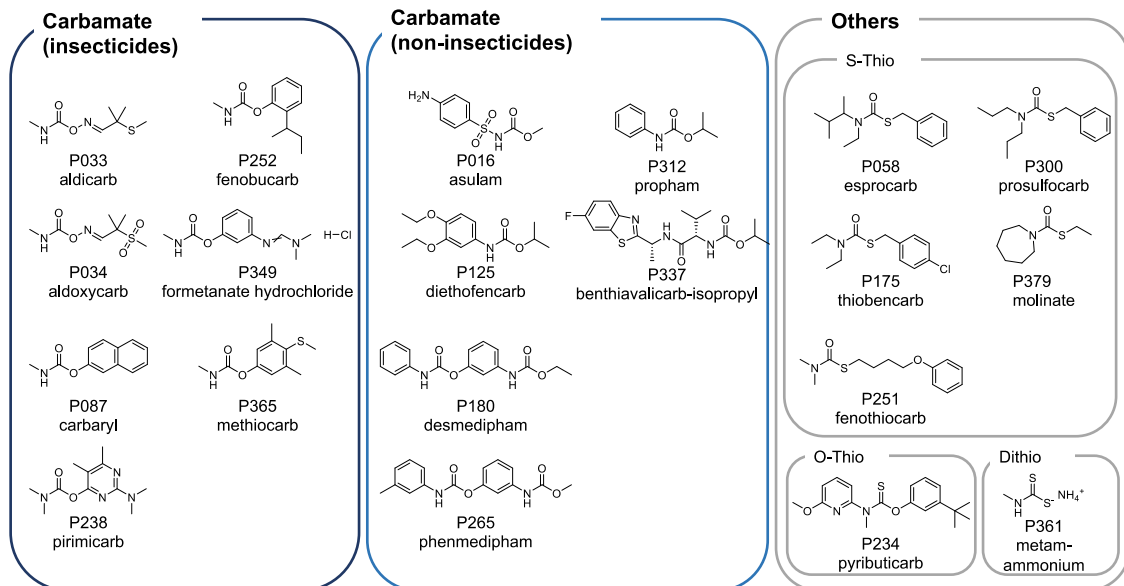
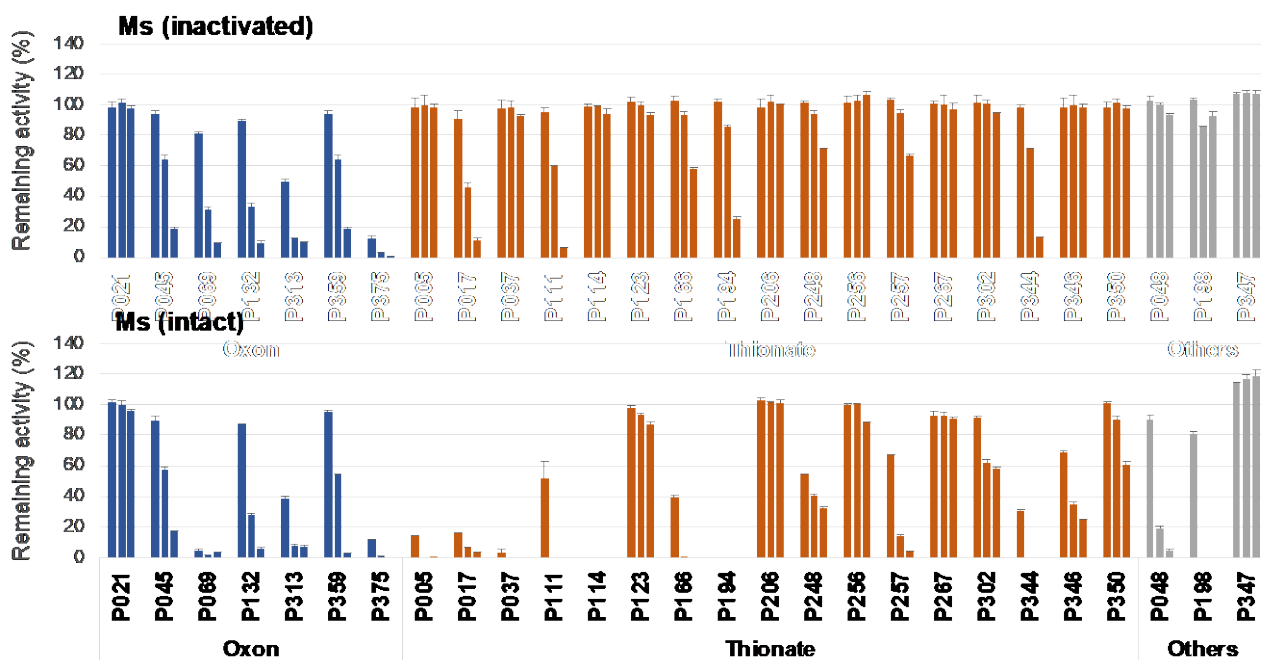


図3-18 被験物質の化学構造式

図3-19にAChE活性阻害試験の結果を示した。有機リン系農薬のうち、オキソン型農薬では、7農薬中6農薬がMs非存在下（失活Ms添加時）においても阻害活性を示した。阻害を示さなかった1農薬（P021）では、Ms添加時においても阻害は認められなかった。チオノ型農薬では、Ms非添加時では17農薬中7農薬が阻害活性を示した。これらの阻害活性はMs添加時では増強した。8農薬はMs添加時においてのみ阻害した。2農薬（P206、P267）はいずれの条件においても阻害しなかった。以上、チオノ型農薬においてMs添加により阻害活性を示す農薬が存在したことから、おおよそ予期した試験結果が得られた。

カルバメート系農薬では、有機リン系農薬とは異なり、Ms添加の影響は大きくなかった。カルバメート系殺虫剤では、7農薬すべてがMsの存在下、非存在下のいずれにおいても阻害活性を示した。非殺虫剤のカルバメート系農薬では、6農薬すべてにおいてMsの非存在下、存在下にかかわらず、阻害活性を示さなかった。その他のカルバメート系においては、2農薬でMs添加時においてのみ阻害活性を示したが、残りの5農薬ではMsの存在下、非存在下にかかわらず、阻害活性を示さなかった。

A. 有機リン系農薬



B. カルバメート系農薬

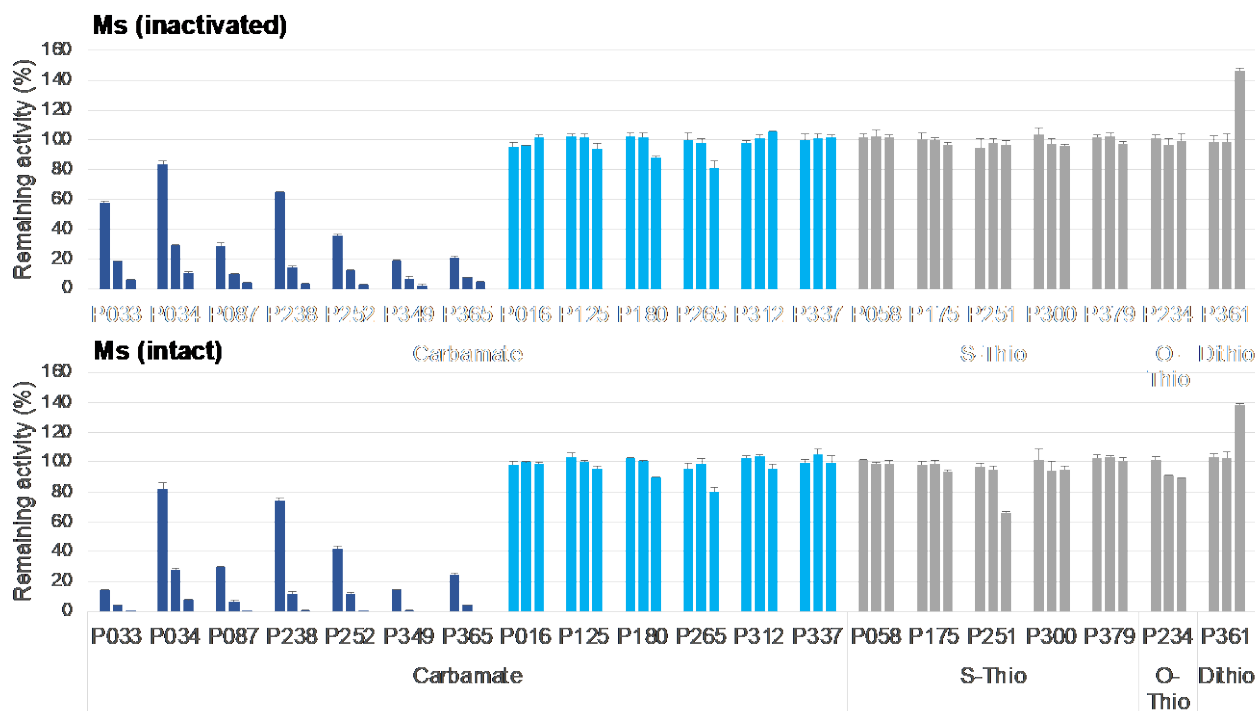


図3-19 有機リン系農薬 (A) 及びカルバメート系農薬 (B) のヒトAChE阻害活性

縦軸は溶媒群を100%とした残存活性を平均値と標準偏差で示した。各農薬の3つのバーは、左から被験物質濃度が1、10、100 μMの結果を示す。カルバメート系農薬の紺色は殺虫剤、水色は非殺虫剤を示す。

得られた*in vitro*試験結果と農薬評価書における*in vivo*でのAChE活性阻害所見の有無について、分割表を作成し、比較した(表3-19)。

有機リン系農薬では、チオノ型農薬でAChE阻害活性を示した農薬数がMs非添加時に比べて添加時に多くなったため、全体の感度は0.538 (Ms非添加時) から0.885 (Ms添加時)、一致率は0.556 (Ms非添加時) から0.889 (Ms添加時) へと増加した。*In vivo*試験で陰性であった有機リン系農薬はその他に分類さ

れる1物質だけであり、この農薬はMsの添加・非添加にかかわらず、*in vitro*試験で陰性であった。

カルバメート系農薬では、カルバメート構造を有する殺虫剤及び非殺虫剤の*in vitro*試験と*in vivo*試験の一致率はMsの添加・非添加で変化せず、その他の2農薬で一致から不一致、不一致から一致への変化が認められた。全体としての感度、特異度、一致率は、それぞれMs非添加時で0.667、0.643、0.650、Ms添加時で0.883、0.571、0.650であった。

以上の結果から、Msを添加したAChE活性阻害の*in vitro*試験の結果を用いることで、少なくとも有機リン系農薬については半定量的に*in vivo*でのChE活性低下を予測できることが示唆された。

表3-19 *In vitro*試験（AChE活性阻害）と*in vivo*毒性試験結果（ChE活性低下）の比較

有機リン系農薬 (27農薬)		<i>In vivo</i> 試験 (CE01)							
		オキシソン型		チオノ型		その他		Total	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
<i>In vitro</i> 試験 (Ms非添加)	陽性	6	0	7	0	1	0	14	0
	陰性	1	0	10	0	1	1	12	1
<i>In vitro</i> 試験 (Ms添加)	陽性	6	0	15	0	2	0	23	0
	陰性	1	0	2	0	0	1	3	1
カルバメート系農薬 (20農薬)		<i>In vivo</i> 試験 (CE01)							
		殺虫剤		非殺虫剤		その他		Total	
		陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
<i>In vitro</i> 試験 (Ms非添加)	陽性	4	3	0	2	0	0	4	5
	陰性	0	0	0	4	2	5	2	9
<i>In vitro</i> 試験 (Ms添加)	陽性	4	3	0	2	1	1	5	6
	陰性	0	0	0	4	1	4	1	8

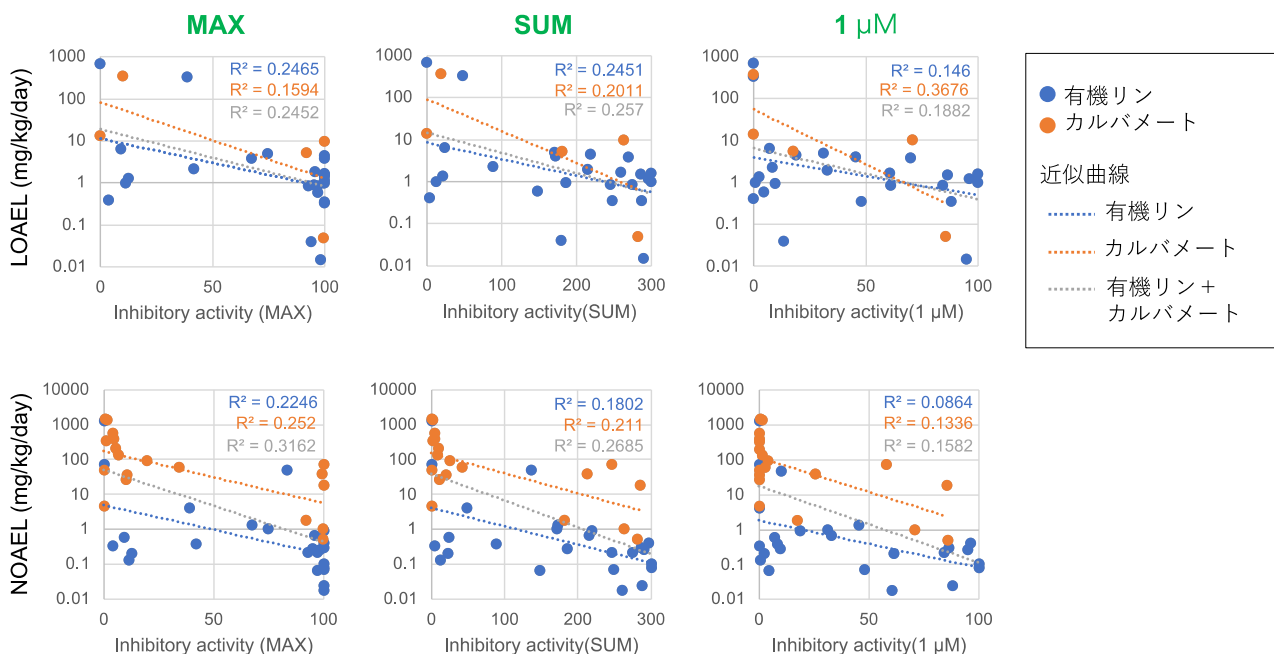
ラット90日間試験又は2年間試験の雌雄いずれかにおいて、CE01で定義した3つの所見（脳ChE活性阻害、赤血球ChE活性阻害、血漿ChE活性阻害）が認められた場合、*in vivo*試験陽性とした（表3-18参照）。

Ms添加時の*in vitro*試験結果と*in vivo*試験結果において、比較的高い一致率が認められたことから、両者の定量的な関係性を調べるため、AChE阻害活性値とラットの90日間試験又は2年間試験のLOAEL値（mg/kg体重/day）を2次元にプロットし比較した（図3-20）。AChE阻害活性に関しては、活性が完全に消失した場合を100、全く阻害が認められなかった場合を0とする阻害活性値を各被験物質濃度で計算し、用いた3濃度で最も高い阻害活性（MAX）、3濃度における阻害活性の合計値（SUM）、1 μMの阻害活性（1 μM）の3つの値を使用した。また、*in vivo*試験結果に関しては、CE01のLOAELを採用し、この値がある農薬（*in vivo*でChE阻害活性を示した農薬）を解析対象とした。

90日間試験の結果を用いた場合には（図3-20A）、MAX及びSUMにおいてはLOAELと阻害活性に逆相関の関係性が認められ、阻害活性が大きい農薬は低いLOAEL値を示した。その傾向は特にMs添加試験の結果でより明確であった。1 μMの阻害活性を用いた場合には、Ms添加時でのみそのような傾向が認められた（Ms非添加の結果は省略）。

2年間試験の結果を用いた場合には（図3-20B）、Ms添加においても、阻害活性とLOAEL値との間に明確な関係性は認められなかった。Ms非添加時も同様であった（データ示さず）。90日間試験結果とは異なる結果が認められた理由は明らかではないが、長期間の試験では農薬曝露による二次的な影響が多く認められること、体内動態が90日間とは異なることなどの理由が考えられる。

A. 90日間試験



B. 2年間試験

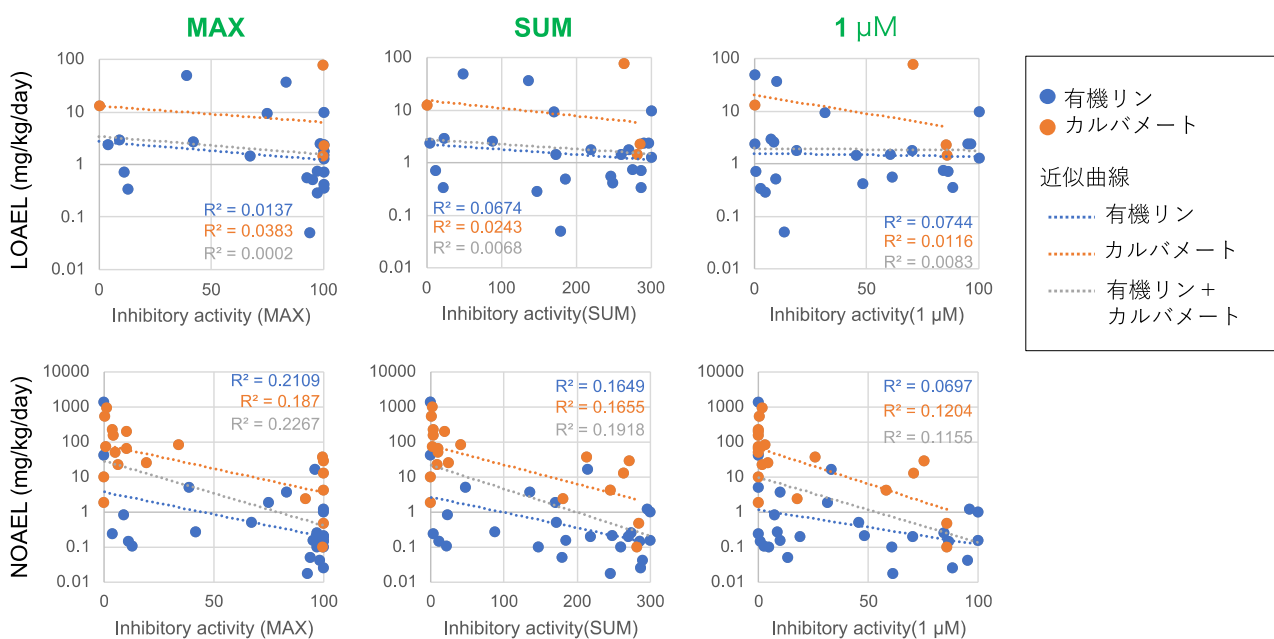


図3-20 *In vitro*試験結果 (AChE活性阻害) と *in vivo*試験結果 (ChE活性低下) の定量的比較

Ms添加時のAChE阻害活性 (MAX、SUM、1 μM) を横軸、ラット90日間試験 (A) 及びラット2年間試験 (B) におけるCE01のLOAEL値の対数を縦軸にプロットした。

有機リン農薬系であるアセフェート (P021) は、親化合物ではChE阻害活性を示さず、加水分解されメタミドホス (P359) となり阻害活性を示す。しかしながら、上記のMs添加試験系においても阻害活性は認められなかった。Ms画分にもエステラーゼは含まれていると考えられるが、活性が不十分なことを考え、酵素源としてS9を使用して、現試験系の妥当性を検証した。

その結果、比較的高濃度のラット肝S9を用いた場合においても、アセフェートはAChE阻害活性を示

さなかつた（図3-21）。用いた試験系においては、MsやS9を使用することでチオノ型からオキソン型への代謝活性化は認められるが、アセフェートのアミド加水分解は起こらない可能性が示された。Tox21におけるChE阻害評価においてもMs添加系が用いられているが、本試験系においても必ずしも*in vivo*を反映した阻害が認められない物質が存在することが明らかになり、試験系の限界の1つと考えられる。

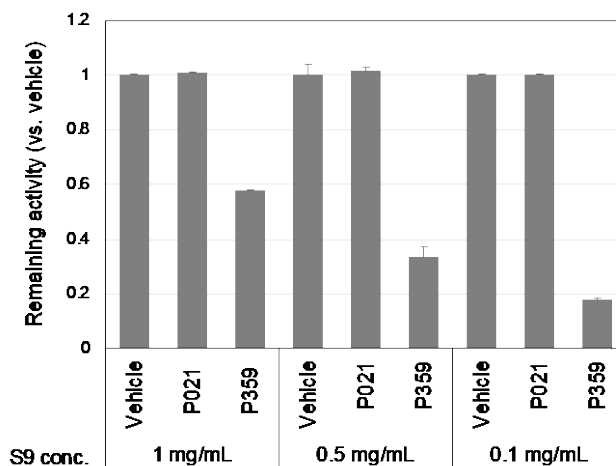


図3-21 ラット肝S9を用いたアセフェートのAChE阻害活性評価

示した3濃度でラット肝S9をAChE阻害評価系に添加し、アセフェートとメタミドホスのAChE阻害活性を測定した。

以上本項においては、肝毒性と神経毒性に焦点をあて、毒性機序と関連する*in vitro*試験結果とラット反復投与度毒性試験結果の定量的な関連性を解析した。肝毒性に関しては、これまで吉成らが医薬品で明らかにしたCYP1A1阻害と肝肥大、脂質代謝異常と関連性が、農薬においても認められることが明らかとなった。ただし、定量的な関係性は限られた物質群においてのみ認められた。一方、神経毒性については、AChE阻害作用が知られている有機リン系農薬及びカルバメート系の農薬において、*in vitro*試験における阻害活性とラット*in vivo*毒性試験におけるLOAEL値の間に定量的な関連性が認められることが明らかになった。よって、本*in vitro*試験は神経毒性の半定量的なリードアクロスに利用できる可能性が示された。

#### ④ NAMを用いたリードアクロスのケーススタディ

リードアクロスにおけるNAMの有用性を確認するために、3-1) ⑤で構築した*in silico* NAMとなるAChE活性阻害強度を予測する半定量的モデル及び3-3) ③で評価した*in vitro* NAMとなる*in vitro* AChE活性阻害試験（Ms添加系）を用い、以下に示す2つのケーススタディを試行した。また、ケーススタディ-2では3-2)で構築した3種のTK関連パラメータ（Caco-2透過性、代謝安定性及びヒト血漿タンパク結合率）の*in silico*モデルの結果も使用した。

ケーススタディ-1：AChE活性阻害に起因する神経毒性の可能性のある物質のグルーピング

ケーススタディ-2：AChE活性阻害に起因する神経毒性の可能性に関するNOAELを決定する評価

#### ケーススタディの制約

今回のケーススタディは、リードアクロスにおけるNAMの有用性を確認することを目的としたため以下の制約がある。

- AChE活性阻害による神経毒性の可能性以外の影響（遅発性の神経毒性を含む）は対象外であるこ

と

- 食品安全委員会が評価した農薬のみが対象であること  
農薬は親物質については規制上の毒性試験要求があるため、本ケーススタディのように親物質のラット90日反復投与によるNOAELを予測する場面は想定されにくい、ケーススタディとしての類似物質/参照物質の毒性情報の入手性及びデータ品質をあらかじめ確保するため、農薬を対象とした。また、毒性情報の情報源は食品安全委員会の評価書のみとしたため、毒性情報の調査範囲が限定的である。
- 農薬には実際には毒性データがあるが、ケーススタディのために標的物質とした物質については、毒性データがないものとして扱っていること
- トキシコキネティクス及び代謝物についての十分な精査が行えていない点もケーススタディとしては限定的であること（例：*in vitro* NAMを既知の代謝物に対して適用していない）
- ケーススタディ-1はグルーピングを目的としているため、本報告書で提案したリードアクロス手順を踏襲しているわけではないこと

#### a. ケーススタディ-1：AChE活性阻害に起因する神経毒性の可能性のある物質のグルーピング

##### a) 問題の定式化

評価目的：N-メチルカルバミン骨格（図3-22）を有するカルバメート系殺虫剤は、AChEのセリン残基の水酸基がカルバモイル化されることで、AChE活性阻害が起こることから、*in silico*及び*in vitro* NAMの結果と合わせて、カルバメート類のAChE活性阻害による神経毒性の可能性のある物質をグルーピングすることを目的とする。これにより、AChE活性阻害に起因する神経毒性のさらなる評価の要否の判断材料とする。

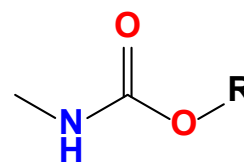


図3-22 N-メチルカルバミン骨格

受け入れ可能な不確実性：優先度が高い物質がグルーピングできれば良い。

##### b) グルーピング

「3-3) ③」の表3-18及び図3-18に示した20種のカルバメート系農薬のうち、図3-23に示すカルバメート骨格を有する物質を対象に、図3-22に示す構造の有無に基づきに大別した。さらに、3-1) ⑤で構築した*in silico*モデル及び3-3) ③で評価したAChE活性阻害試験の結果を加え、グルーピングについて検討した（表3-20）。

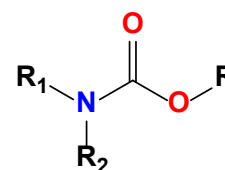


図3-23 カルバメート骨格

N-メチルカルバミン骨格を有する6物質については、*in silico*予測はいずれも「強陽性」と予想され、*in vitro*のAChE残存活性もいずれも10%以下であった。これらの結果に基づき、N-メチルカルバミン骨格を有する6物質は、「Group-1：AChE活性阻害に起因する神経毒性が生じる可能性が高い」とした。

N-メチルカルバミン骨格のない14種のカルバメート類については、*in silico*予測において、1物質（ピリミカブ（P238））で「強陽性」、その他アシュラム（P016）を除く18物質において「陽性の可能性がある」との結果となった。これらのうち、AChE残存活性が90%未満であり、3-3) ③で定義した「阻害活性あり」となり*in silico*予測及び*in vitro*の結果が陽性を示した5物質を、「Group-2：AChE活性阻害に起因する神経毒性が生じる可能性がある」とした。*in silico*予測で「陽性の可能性がある」となった8物

質及び、*in silico*予測及び*in vitro*の結果いずれも陰性となった1物質（合計9物質）については、「Group-3：AChE活性阻害に起因する神経毒性が生じる可能性は低い」とした。

c) グルーピング結果の考察

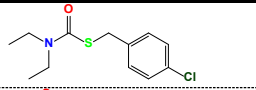
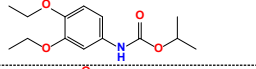
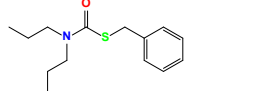
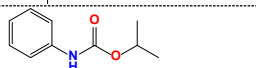
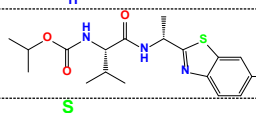

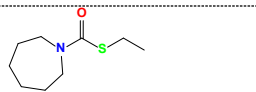
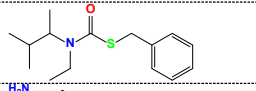
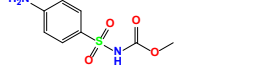
今回検討対象としたいずれの物質も農薬であるためいずれも高品質な動物実験データがあり、3-3) ①で整理した毒性EpであるCE01 (ChE活性阻害) の結果に基づき、グルーピング結果の適切さを確認した。

Group-1では6物質のうち4物質で毒性試験においてChE活性阻害が認められており、図3-24においてCE01 (ChE活性阻害) が「0」と食品安全委員会の評価ではChE活性阻害がないとされたメチオカルブ (P365) は評価機関によっては毒性試験におけるChE活性阻害を認めていた。このことからGroup-1は6物質中で5物質でChE活性阻害が認められており、「AChE活性阻害に起因する神経毒性が生じる可能性が高い」グループであったと言える。

Group-2の5物質のうち、1物質のみであるが、動物実験において血漿でChE減少を示すピリミブチカルブ (P234) がグループ化されており、「AChE活性阻害に起因する神経毒性が生じる可能性がある」グループであった。一方、Group-3となった9物質については、1物質 (モリネート (P379)) を除き、8物質はいずれも毒性試験においてChE活性阻害はなく、「AChE活性阻害に起因する神経毒性が生じる可能性は低い」グループであった。なお、モリネートは、一部の毒性試験においてのみChE活性阻害が認められたが、他の毒性影響より高用量で出現する影響であり (食品安全委員, 2013)、評価の優先度は低い影響と考えられた。

表3-20 ケーススタディ-1のグルーピング結果

ID	名称	構造	図3-22の構造の該当 *1	用途	<i>in silico</i> 予測 *2	<i>In vitro</i> 残存活性 (%) *3	グループ	CE01 (ChE活性阻害)
P349	塩酸ホルメタネート		該当	殺虫/殺ダニ剤	強陽性	0.00	Group-1	1
P365	メチオカルブ		該当	殺虫剤	強陽性	0.00		0 *4
P252	フェノブカルブ		該当	殺虫剤、外部寄生虫の駆除	強陽性	0.08		0
P087	カルバリル		該当	殺虫剤、植物成長調整剤	強陽性	0.17		1
P033	アルジカルブ		該当	殺虫剤	強陽性	0.30		1
P034	アルドキシカルブ		該当	殺虫剤	強陽性	8.15		1
P238	ピリミカーブ		該当せず	殺虫剤	強陽性	0.68	Group-2	0
P251	フェノチオカルブ		該当せず	殺ダニ剤	陽性の可能性がある	65.88		0
P265	フェンメディファム		該当せず	除草剤	陽性の可能性がある	80.58		0
P180	デスメディファム		該当せず	除草剤	陽性の可能性がある	88.60		0
P234	ピリブチカルブ		該当せず	除草剤	陽性の可能性がある	89.73		1

ID	名称	構造	図3-22の構造の該当 *1	用途	<i>in silico</i> 予測 *2	<i>In vitro</i> 残存活性 (%) *3	グループ	CE01 (ChE 活性阻害)
P175	チオベンカルチブ		該当せず	除草剤	陽性の可能性がある	93.54	Group p-3	0
P125	ジエトフェンカルブ		該当せず	殺菌剤	陽性の可能性がある	93.70		0
P300	プロスルホカルブ		該当せず	除草剤	陽性の可能性がある	94.87		0
P312	プロファム		該当せず	除草剤、植物成長調整剤	陽性の可能性がある	95.70		0
P337	ベンチアバリカルブイソプロピル		該当せず	殺菌剤	陽性の可能性がある	99.56		0
P361	メタムアンモニウム塩		該当せず	殺線虫剤、殺菌剤、殺虫剤、除草剤	陽性の可能性がある	98.68		0
P379	モリネート		該当せず	除草剤	陽性の可能性がある	97.34		1 *5
P058	エスプロカルブ		該当せず	除草剤	陽性の可能性がある	99.00		0
P016	アシュラム		該当せず	除草剤	陰性	95.42		0

NT: not tested.

\*1: HIT; N-メチルカルバミン骨格がある、HITせず; N-メチルカルバミン骨格がない

\*2: 3-1) ⑤で構築した*in silico*モデルの予測結果

\*3: 3-3) ③で評価したMsを用いたヒトAChE活性阻害試験の結果

\*4: 90日間相当の試験は実施されていない。また、ラットに2年間の慢性毒性/発がん性併合試験結果については豪州では赤血球ChE活性阻害を認めたが、JMPR及び食品安全委員会では血液学的変化のみと評価している ([食品安全委員会, 2009](#))。

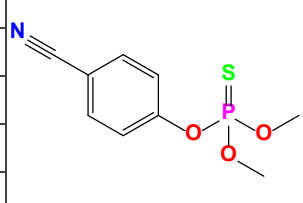
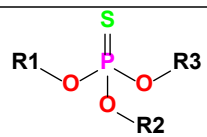
\*5: AChE活性阻害がある場合、毒性試験においてAChE活性阻害が当該物質で生じる最も低い用量で生じる毒性影響となり、ADI根拠となるNOEL/NOAEL/LOAELとなることが多いが、モリネートの一部の毒性試験で認められるAChE活性阻害は他の毒性影響より高用量で出現する影響であった (食品安全委員会, 2013)。

b. ケーススタディ-2：AChE活性阻害に起因する神経毒性に関するNOAELを導出する評価

a) Step 1：問題の定式化

- ・評価目的：ラットへの90日間反復投与におけるAChE活性阻害に起因する神経毒性の可能性に関するNOAELを導出し、その結果を食品健康影響評価に仮想的に使用する。
- ・問題の定式化：長期毒性試験データがない<sup>23</sup>シアノホス（CAS No. 2636-26-2）のラットへの90日間反復投与により、AChE活性阻害による神経毒性が生じる可能性があるか、生じる場合、そのNOAEL値はどのような値かを評価する。評価に際しては、試験済み類似物質の90日間反復投与毒性試験データ及び*in silico*予測/*in vitro*AChE活性阻害やその他関連データを統合して評価する。
- ・調査範囲：食品安全委員会の評価書がある農薬を対象とする（ケーススタディのため）。
- ・受け入れ可能な不確実性：半定量的に類推できればよい（例：参照物質と同等、参照物質より弱い、参照物質より著しく強くない、等）。不確実性に関する個別の評価項目は低、中、高の3段階で評価し、「高」は受け入れられない不確実性とした。
- ・評価対象物質の特性化（表3-21）：logPが2.71であり、経口投与において、85.9%～98.2%の吸収率があったとされる。Phosphorothioate骨格を有する有機リン化合物であり、有機リン化合物であるためAChE活性阻害による神経毒性を有する可能性がある。加水分解によりP-O-メチル結合の開裂やP-O-アールール結合の開裂による加水分解物が生成する。また、経口経路で実施された体内運命試験において、代謝により生体内でホスホリル化（-P=O）が認められているものの、30分以内に速やかに代謝され、さらに代謝された物質が検出されている。

表3-21 シアノホスに関する情報

評価対象物質のアイデンティティ	物質名	シアノホス（CYAP）	構造
	CAS No.	2636-26-2	
	SMILES	COP(=S)(OC)OC1=CC=C(C=C1)C#N	
	組成式	C9H10NO3PS	
	分子量	243.22	
	不純物	データなし	
構造特性	主骨格	 <ul style="list-style-type: none"> <li>・Phosphorothioate骨格を有する</li> </ul>	
	官能基の種類	<ul style="list-style-type: none"> <li>・チオホスホリル基（-P=S）を有する</li> <li>・リン酸基の2つの酸素にそれぞれメチル基（-CH<sub>3</sub>）を有する</li> <li>・芳香環にシアノ基（-CN）を有する</li> </ul>	
	異性化の有無（ある場合その構造）	互変異性化なし（OECD Toolbox ver.4.7, Tautomers unstableによる）	
化学反応性	<ul style="list-style-type: none"> <li>・有機リン化合物であり、リン原子がAChEのセリン残基と反応する可能性がある。</li> <li>・エステル結合部分が加水分解により以下の物質が生成される。 未変化体：72.9-82.4%</li> </ul>		

<sup>23</sup> 実際にはデータがある物質であるが、ケーススタディとして長期毒性試験データがないと仮定

物理化学的性状	融点：	14-15 °C	沸点：	119-120 °C (decomp) at 0.09 mm Hg
	対水溶解度：	46 mg/L	logPow:	2.71
	蒸気圧:	0.00079 mmHg	pKa:	データなし
	加水分解半減期：	107 日@25°C (pH4) 87.9 日@25°C (pH7)		
ADME・動態	吸収	経口投与による吸収率：85.9-98.2%		
	分布	投与後 48 時間までで臓器への蓄積傾向なし		
	代謝	代謝によりホスホリル化されるが、速やかに他の物質に代謝される。		
	排泄	48 時間で 96.2%以上が排せつされた		
	動態	Tmax：0.25 -0.5 hr Cmax: 0.5 mg/kg 投与：0.122-0.167 ug/g, 25 mg/kg 投与：6.53-8.29 ug/g T1/2: 0.5 mg/kg 投与：1.2-2.0hr, 25 mg/kg 投与：0.9-2.0[0.5-2 hr]、7.2-19.8 [8-48hr] AUC <sub>0-∞</sub> ：0.5 mg/kg 投与：0.248-0.377, 25 mg/kg 投与：36.8-53.2 hr・ug/g		
MoA/AOP	● 有機リン化合物であるため AChE 活性阻害による神経毒性を有する可能性がある。			
生物活性データ	● 有機リン化合物であり、OECD Toolbox [Repeated Dose (HESS)] profiler において「Organophosphates (Neurotoxicity) Rank A」、 「Phenyl phosphates (Lipodosis of adrenocortical) Rank C」がヒットしており、「Organophosphates (Neurotoxicity) Rank A」は今回評価対象としている神経毒性に関連し、神経毒性を有する可能性が示唆される。			
既存毒性データ	急性毒性	LD50 (経口)：580-730 mg/kg、LD50 (経皮)：560->2000 mg/kg		
	眼刺激/皮膚刺激性	眼及び皮膚への刺激性なし		
	皮膚感作性	陰性 (GMPT)		
	遺伝毒性	一部の Ames 試験で陽性、 <i>in vitro</i> 染色体異常試験で陽性 →遺伝毒性なし		
	反復投与毒性	データなし (仮定) 注1		
	生殖・発生毒性	データなし (仮定) 注1		
	発がん性	データなし (仮定) 注1		
	その他	-		

注1: 実際にはデータがある物質であるが、ケーススタディとして長期毒性試験データがないと仮定

・仮説：有機リン化合物のリン原子とAChE活性部位のセリン残基の水酸基が反応し、共有結合を形成した結果、AChEの構造が変化することでAChE活性阻害が起こる。また、一般にチオノ型 (P=S体) よりオキソン型 (P=O体) においてAChE活性阻害が強くなることが知られている。一方、評価対象物質 (シアノホス) はP=O体を生成するが30分以内に速やかに代謝され、AChE活性が減弱したと考えられる別の代謝物に代謝されている。このことから、以下の要件を満たす場合に、物質の90日間反復投与毒性試験の情報を用いることで、安全サイドで評価対象物質のAChE活性阻害の可能性を評価し、AChE活性阻害に起因する神経毒性に関するNOAELを導出できる。

- ① 評価対象物質が有するPhosphorothioateの構造を有し、リン原子の反応性が評価対象物質と類似、あるいは強いと考えられる
- ② *In silico/in vitro*のAChE活性阻害評価結果が類似している、あるいは評価対象物質より強い作用を有する
- ③ P=O体が速やかに代謝される他、O-メチルにおける脱メチル、P-O-アリアル結合の開裂、この開

- 裂により生じたフェノール体の抱合体形成といった、評価対象物質と類似の代謝経路を有する
- ④ 類似の動態、あるいは評価対象物質より強い作用を示す可能性のある動態を有する

b) Step 2 : 類似物質の特定

表3-18の27種の有機リン化合物のうち、Phosphorothioate類を対象に、RDKitフィンガープリントあるいはMorganフィンガープリントを用いた教師なし学習に相当するクラスター解析を試行した。階層クラスタリングとして一般的に使用されるウォード法を用いて、最も近接したクラスター同士で新たなクラスターを形成する作業を繰り返し、階層構造をデンドログラムにて可視化した。いずれのフィンガープリントを用いたクラスター解析においても評価対象物質と共通のクラスターに属していた3物質を類似物質候補とした（表3-22）。これら3物質はいずれも、評価対象物質であるシアノホスと同様*O,O*-dimethyl-*O*-phenyl phosphorothioate骨格（図3-24）を有していた。これら3物質及び評価対象物質について、PubChemからの物理化学的性状、OECD QSAR Toolbox ver. 4.7を用いた反応性等のProfilerの情報、*in silico/in vitro*のAChE活性阻害評価結果、食品安全委員会の評価書に基づく毒性情報等を収集し、表3-22のデータマトリクスに整理した。なお、食品安全委員会の評価書においてデータ品質は評価されていると考えられ、評価書内でデータ品質に対する言及がない情報は信頼性が高いものと判断した。

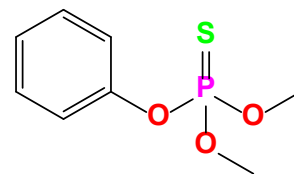


図3-24 *O,O*-dimethyl-*O*-phenyl phosphorothioate骨格

表3-22 トルクロホスメチル及び特定した類似物質のデータマトリクス（概要）

No		P206	P123	P248	P256	
評価対象物質/類似物質		類似物質（参照物質候補）	評価対象物質（標的物質）	類似物質（参照物質候補）	類似物質（参照物質候補）	
Name		トルクロホスメチル	シアノホス（CYAP）	フェニトロチオン	フェンチオン	
CAS		57018-04-9	2636-26-2	122-14-5	55-38-9	
用途		殺菌剤	殺虫剤	殺虫剤	殺虫剤	
構造及び反応性	Structure					
	Organic functional groups, Norbert Haider (check-mol)	Thiophosphoric acid derivative	Yes	Yes	Yes	Yes
		Thiophosphoric acid ester	Yes	Yes	Yes	Yes
		Aromatic compound	Yes	Yes	Yes	Yes
		Aryl chloride	Yes	No	No	No
		Nitrile	No	Yes	No	No
		Anion	No	No	Yes	No
		Nitro compound	No	No	Yes	No
Thioether	No	No	No	Yes		
タンパク質との反応性*1	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Protein binding by OECD : SN2;SN2 &gt;&gt; SN2 reaction at sp3 carbon atom;SN2 &gt;&gt; SN2 reaction at sp3 carbon atom &gt;&gt; Thiophosphates</li> <li>● Protein binding by OASIS : Acylation;Acylation &gt;&gt; Phosphorylation;Acylation &gt;&gt; Phosphorylation &gt;&gt; Phosphate and phosphorothioate esters;SN2;SN2 &gt;&gt; Nucleophilic substitution at sp3 carbon atom;SN2 &gt;&gt; Nucleophilic substitution at sp3 carbon atom &gt;&gt; Phosphate and phosphorothioate esters</li> <li>● Protein binding alerts for Chromosomal aberration by OASIS : SN2;SN2 &gt;&gt; Nucleophilic substitution at sp3- Carbon atom;SN2 &gt;&gt; Nucleophilic substitution at sp3- Carbon atom &gt;&gt; (Thio)Phosphates</li> <li>● Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS : SN2;SN2 &gt;&gt; Nucleophilic substitution at sp3 carbon atom;SN2 &gt;&gt; Nucleophilic substitution at sp3 carbon atom &gt;&gt; (Thio)Phosphates</li> <li>SN2;SN2 &gt;&gt; Alkylation;SN2 &gt;&gt; Alkylation &gt;&gt; Alkylphosphates, Alkylthiophosphates and Alkylphosphonates</li> </ul>					
DNA との反応性 *1	DNA binding by OASIS DNA binding by OECD	No alert found	No alert found	SN1;SN1 >> Nitrenium Ion formation;SN1 >> Nitrenium Ion formation >> Aromatic nitro	No alert found	
物理化学的性状	外観（常温）	固体（PubChem）	液体（PubChem）	液体（PubChem）	液体（PubChem）	
	Molecular formula	C9H11Cl2O3PS	C9H10NO3PS	C9H12NO5PS	C10H15O3PS2	
	Molecular Weight [g/mol]	301.13	243.22	277.24	278.3	
	Melting Point	75-80 °C	14-15 °C	0.3-3.4 °C	7-7.5 °C	

No	P206	P123	P248	P256	
評価対象物質/類似物質	類似物質 (参照物質候補)	評価対象物質 (標的物質)	類似物質 (参照物質候補)	類似物質 (参照物質候補)	
Name	トルクロホスメチル	シアノホス (CYAP)	フェニトロチオン	フェンチオン	
CAS	57018-04-9	2636-26-2	122-14-5	55-38-9	
用途	殺菌剤	殺虫剤	殺虫剤	殺虫剤	
Boiling Point	NA	119-120 °C (decomp) at 0.09 mm Hg	118 °C at 0.05 mm Hg	87 °C @ 0.01 mmHg 105 °C @ 0.01 mm Hg /Commercial product/	
Exp Water Solubility	1.1 mg/L	46 mg/L	38 mg/L	7.5 mg/L	
logP	4.56	2.71	3.27-3.30	3.17-4.8	
Exp Vapor Pressure [mmHg]	4.3E-04	7.9E-04	5.4E-05	1.1E-05	
Exp Henrys Law Constant [atm·m <sup>3</sup> /mole]	1.5E-04	5.5E-06	9.3E-07	1.5E-06	
pKa	-	-	-	-	
加水分解半減期	51 日@25°C (pH4) 60.8 日@25°C (pH7)	107 日@25°C (pH4) 87.9 日@25°C (pH7)	191-200 日@25°C (pH5) 180-186 日@25°C (pH7)	69 日@25°C (pH5) 5.9 日@25°C (pH7)	
加水分解生成物					
ADME・動態	T <sub>max</sub>	NA	0.5 mg/kg (単回) : 0.25 hr 25 mg/kg (単回) : 0.25-0.5 hr	15 mg/kg (単回) : 1-3 hr 10 mg/kg(単回) : 0.3-0.75 hr 100 mg/kg (単回) : 0.75 hr	
	C <sub>max</sub>	NA	0.5 mg/kg (単回) : 0.122-0.167 ug/g 25 mg/kg (単回) : 6.53-8.29 ug/g	15 mg/kg (単回) : <sup>32</sup> P で 15.5 ug/g, <sup>14</sup> C(メチル基炭素)で 0.026-0.093 ug/g 10 mg/kg(単回) : 2.9-4.4 ug/mL 100 mg/kg(単回) : 23.1-50.1 ug/mL	
	T <sub>1/2</sub> [hr]	NA	0.5 mg/kg (単回) : 1.2-2.0 25 mg/kg (単回) : 0.9-2.0[0.5-2 hr] 7.2-19.8 [8-48hr]	15 mg/kg (単回) : <sup>32</sup> P で 10.6 hr <sup>14</sup> C(メチル基炭素)で 4.7-4.94 hr 10 mg/kg(単回) : 8.66-9.9 hr 100 mg/kg(単回) : 11.6 hr	
	AUC	NA	0.5 mg/kg (単回) : AUC0-8: 0.248-0.377 hr · ug AUC0-∞: 0.248-0.377 hr · ug/g 25 mg/kg (単回) : AUC0-8: 24.4-27.1 hr · ug/g AUC0-∞: 36.8-53.2 hr · ug/g	15 mg/kg (単回) : 365 hr · ug/g NA	
	in silico Caco-2 膜透過性	4.81	4.58	4.48	4.83
	In silico 代謝安定性 log(MS)	-0.14	-0.06	0.10	-0.17
	In silico ヒト血漿タンパク結合率 (p <sub>bind</sub> )	0.91	0.80	0.91	0.81
	吸収率	85.7-91.2%	85.9-98.2%	86-92.6%	100%近い
	分布	24-96 時間後には臓器への蓄積傾向なし	Tmax 付近で腎臓が比較的高濃度であったが 48 時間後には特定の臓器への蓄積傾向なし	ラット 1.5 mg/kg/日×14 日間経口投与：蓄積傾向を示す組織なし	ラット 10 mg/kg/日×14 日間経口投与：最も高い放射活性は脂肪（ただし、特に高いわけではない）
	排泄	48 時間後 85-90.1%が尿中へ、9.2-20%が糞中へ排せつ	48 時間後 96.2%以上が排せつ	168 時間後 95%以上が排せつ	72 時間後 93.5-111%が排せつ
代謝物	表 3-23 参照	表 3-23 参照	表 3-23 参照	表 3-23 参照	

No	P206	P123	P248	P256
評価対象物質/類似物質	類似物質 (参照物質候補)	評価対象物質 (標的物質)	類似物質 (参照物質候補)	類似物質 (参照物質候補)
Name	トルクロホスメチル	シアノホス (CYAP)	フェニトロチオン	フェンチオン
CAS	57018-04-9	2636-26-2	122-14-5	55-38-9
用途	殺菌剤	殺虫剤	殺虫剤	殺虫剤
活 生 物	AChE 残存活性 (90%未満陽性)	<b>87.2</b>	<b>32.6</b>	<b>88.8</b>
毒 性 デ ー タ	<i>In silico</i> AChE 活性阻害予測	陽性の可能性がある	弱陽性	弱陽性
	経口ラット LD50 [mg/kg]	580-730	330-1720	320-566
	経皮ラット LD50 [mg/kg]	560->2000	Not available	2000-≧2000
	急性毒性 (その他)			
	眼刺激性/	刺激性なし	眼：軽度の刺激性	刺激性なし
	皮膚刺激性	刺激性なし	刺激性なし	軽微な刺激性
	皮膚感作性	陰性 (Landsteiner & Draize 法及び Buehler 法) 中程度の陽性 (GMPT)	陰性 (Landsteiner & Draize 法)	陰性 (GMPT)
	遺伝毒性評価	Ames を含むいずれの試験でも陰性 →遺伝毒性なし	Ames 一部の菌株で弱い陽性 in vitro UDS で弱い陽性 →遺伝毒性なし	Ames 一部の菌株で弱い陽性 in vitro UDS で弱い陽性 →遺伝毒性なし
	90 日間亜急性毒性試験(ラット)	0, 10, 40, 160 ppm 雄:0, 0.75, 2.8, 10.3 雌:0, 0.75, 2.9, 11.6 40 ppm 以上: 雌雄で脳及び赤血球 ChE 活性阻害(20%以上) (投与 10 日以降)	NA	0, 1, 3, 12, 50, 200 ppm 雄:0, 0.077, <b>0.228</b> , 1, 4.04, 18.9 雌:0, 0.088, <b>0.256</b> , 1.14, 4.67, 20 12 ppm 以上: 雌雄で赤血球及び脳 ChE 活性阻害 (20%以上)
	90 日間亜急性神経毒性試験	0, 3, 20, 100 ppm 雄:0, 0.20, 1.35, 7.25 雌:0, 0.26, 1.70, 8.83 20 ppm 以上 雄:立毛(投与 8~13 週)、脳及び赤血球 ChE 活性阻害 (20%以上) (投与 2 週以降) 雌:立毛、胴体の凹み及び開脚反応の低下(投与 8~14 週)、脳及び赤血球 ChE 活性阻害(20%以上) (投与 2 週以降)	0, 6, 20, 60, 200 ppm 雄:0, 0.40, <b>1.32</b> , 3.99, 13.8 雌:0, 0.46, <b>1.56</b> , 4.85, 17.6 60 ppm 以上 雄:赤血球及び脳 ChE 活性阻害 (20%以上)(投与 4 週以降) 雌:体重増加抑制 (投与 1 週)、赤血球及び脳 ChE 活性阻害 (20%以上) (投与 4 週以降)	0, 2, 25, 125 ppm 雄:0, <b>0.13</b> , 1.63, 8.5 雌:0, <b>0.17</b> , 2.19, 12.6 25 ppm 以上 雌雄:オープンフィールドにおける活動性低下、赤血球及び脳 ChE 活性阻害 (20%以上) 雌:体重増加抑制
	6 か月間慢性毒性試験あるいは 24 週間亜急性毒性(ラット)	0, 300, 1,000, 3,000, 10,000 ppm 雄:0, 15.8, 51.2, 166, 547 雌:0, 18.3, 65.9, 186, 629 雄:体重増加抑制 a(投与 1~6 か月の累積) (10,000 ppm) 雌:肝絶対及び比重量増加、肝卵円形細胞増殖 (3,000 ppm)	■24 週間 0, 10, 20, 60, 180 ppm 雄:0, 0.56, 1.4, 3.8, 11.7 雌:0, 0.77, 1.5, 4.3, 12.7 60 ppm 以上雄及び 20 ppm 以上雌で脳 ChE 活性阻害 (20%以上)等	NA

No	P206	P123	P248	P256
評価対象物質/類似物質	類似物質 (参照物質候補)	評価対象物質 (標的物質)	類似物質 (参照物質候補)	類似物質 (参照物質候補)
Name	トルクロホスメチル	シアノホス (CYAP)	フェニトロチオン	フェンチオン
CAS	57018-04-9	2636-26-2	122-14-5	55-38-9
用途	殺菌剤	殺虫剤	殺虫剤	殺虫剤
2年間慢性毒性/発がん性併合試験(ラット)	<p>■28/30 か月間慢性毒性/発がん性併合試験</p> <p>0, 100, 300, 1,000 ppm</p> <p>雄:0, 4.12, 12.3, 41.6</p> <p>雌:0, 4.78, 14.7, 48.6</p> <p>検体投与により発生頻度が増加した腫瘍性病変は認められなかった。本試験において、いずれの投与群においても毒性影響は認められなかった。</p>	<p>0, 3, 10, 30, 180 ppm</p> <p>雄:0, 0.101, 0.338, 1.04, 7.15</p> <p>雌:0, 0.115, 0.403, 1.22, 9.09</p> <p>10 ppm 以上</p> <p>雄: T.Chol 増加、心筋萎縮/線維化、脳 ChE 活性阻害(20%以上)、前胃上皮過形成</p> <p>雌: 脳及び赤血球 ChE 活性阻害(20%以上)</p> <p>38 匹/群とガイドラインを充足していないが、最高用量の 180 ppm 雌で死亡率がやや増加している以外は生存率が対照群と同程度であり良好であるため、発がん性に関する評価は可能と判断。</p>	<p>0, 10, 30, 100 ppm</p> <p>雄:0, 0.49, 1.45, 5.05</p> <p>雌:0, 0.62, 1.81, 6.46</p> <p>30 ppm 以上の雌雄で赤血球及び脳 ChE 活性阻害(20%以上)</p>	<p>0, 5, 20, 100 ppm</p> <p>雄:0, 0.2, 0.8, 5.2</p> <p>雌:0, 0.3, 1.3, 7.3</p> <p>20 ppm 以上</p> <p>雄: 赤血球及び脳 ChE 活性阻害(20%以上)、肉芽腫性肺炎・精巢上部頭部空胞変性</p> <p>雌: 赤血球及び脳 ChE 活性阻害(20%以上)、網膜電位図抑制状態、網膜萎縮(両側性)、涙鼻管空胞変性</p>
引用	食品安全委員会 (2019) <sup>24</sup>	食品安全委員会 (2017) <sup>25</sup>	食品安全委員会 (2023) <sup>26</sup>	食品安全委員会 (2013) <sup>27</sup>

NA: Not available

\*1: OECD QSAR Toolbox ver.4.7搭載のプロファイラーによる

表 3-23 代謝物情報

No	P206	P123	P248	P256
Name	トルクロホスメチル	シアノホス (CYAP)	フェニトロチオン	フェンチオン
structure				
尿/糞中代謝物	<p>投与 48 時間後；未変化体：0.1-3.7%</p> <p></p> <p>9.3-30.1%</p> <p></p> <p>0.5-24.1%</p> <p></p> <p>10.6-22.3%</p> <p></p> <p>8.5-23.8%</p> <p></p> <p>0.1-9.0%</p>	<p>投与 24 時間後；未変化体：0.1-0.3%</p> <p></p> <p>3.3-41.5%</p> <p></p> <p>7.7-13.2%</p> <p></p> <p>0.7-7.9%</p> <p>グルクロン酸抱合体：3.4-8.4%</p> <p>硫酸抱合体：29-79.8%</p>	<p>投与 48 時間後；未変化体：ND</p> <p></p> <p>1.5-46.7%</p> <p></p> <p>7.1-26.4%</p> <p></p> <p>3.2-5.1%</p> <p>グルクロン酸抱合体：4.3-14.7%</p> <p>硫酸抱合体：15.3-56.6%</p> <p></p> <p>2.4%</p>	<p>投与後 72 時間後；未変化体：~1.3%</p> <p></p> <p>1.9-13.4%</p> <p></p> <p>3.4-13.5%</p> <p></p> <p>9.3-17.0%</p> <p></p> <p>4.3-8.8%</p> <p></p> <p>1.1-5.1%</p> <p></p> <p>0.2-3.8%</p>

<sup>24</sup> <https://www.fsc.go.jp/fscis/evaluationDocument/show/kya20120821616>

<sup>25</sup> <https://www.fsc.go.jp/fscis/evaluationDocument/show/kya20170315209>

<sup>26</sup> <https://www.fsc.go.jp/fscis/evaluationDocument/show/kya20230524084>

<sup>27</sup> <https://www.fsc.go.jp/fscis/evaluationDocument/show/kya20110117003>

No	P206	P123	P248	P256
Name	Target トルクロホスメチル  3.6-7.8% 2.0-7.5% 0.2-8.8%	Source シアノホス (CYAP)	Source フェニトロチオン  2.5-5.5% 44.7% 16.4%	Source フェンチオン  0.4-5.0% 3.7-9.0% 0.2-4.3% 0.5-6.8% 11.3-16.6% 0.3-10.9% 0.2-11.7% 7.0-30.3%
引用元	食品安全委員会 (2019) <sup>24</sup>	食品安全委員会 (2017) <sup>25</sup>	食品安全委員会 (2023) <sup>26</sup>	食品安全委員会 (2013) <sup>27</sup>
P=O 体の形成	P=O 体自体は検出なし P=O 化後の代謝物あり	P=O 体自体は検出なし P=O 化後の代謝物あり	P=O 体自体は検出なし P=O 化後の代謝物あり	P=O 体自体は検出なし P=O 化後の代謝物あり
O-メチルにおける脱メチル	あり	あり	あり	あり
P-O-アリアル結合の開裂	あり	あり	あり	あり
抱合体の形成	なし	グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体あり	グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体あり	グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体あり

c) Step 3 : 類似物質の評価

表3-24 類似性評価の概要 (不確実性評価、妥当性評価含む)

	P206 : トルクロホスメチル	P248 : フェニトロチオン	P256 : フェンチオン	
構造				
構造・反応性	類似性	<ul style="list-style-type: none"> <li>いずれもO,O-dimethyl-O-phenyl phosphorothioate骨格を有する。</li> <li>タンパク質との反応性はOECD Toolboxのいずれのプロファイラーでも同様であった。</li> </ul>		
	相違性	<ul style="list-style-type: none"> <li>2,6位のクロロ基が電子吸引性を有し、潜在的にリンの反応性が高まると考えられるが、2,6位のクロロ基がリン原子とAChEの反応時に立体障害となる可能性がある。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ニトロ基の強い電子吸引性によりリンの反応性が高まり、評価対象物質よりAChE活性阻害が強まる可能性がある</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>チオアニソール基(-S-CH<sub>3</sub>)は電子供与的に作用すると考えられ、評価対象物質よりAChE活性阻害を弱い可能性がある。</li> </ul>
	不確実性	<p>高：立体障害により評価対象物質とは異なるAChEに対する反応性を示す可能性高い。</p> <p>→in silico/in vitro NAMを用いてChE活性を確認し、不確実性を低減する (生物活性の項目を参照)</p>	<p>中：評価対象物質と異なる官能基をするが、評価対象物質と同様、電子吸引性である。電子吸引性がより強くAChE活性阻害に影響を与える可能性があるが受け入れ可能である。</p> <p>→in silico/in vitro NAMを用いてChE活性を確認し、不確実性を低減する (生物活性の項目を参照)</p>	<p>高：チオアニソール基は電子供与的に作用する可能性があるが、評価対象物質より弱いAChE活性阻害を示す可能性がある。</p> <p>→in silico/in vitro NAMを用いてChE活性を確認し、不確実性を低減する (生物活性の項目を参照)</p>
物理化学的性状・動態	類似性	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>T<sub>max</sub>及びT<sub>1/2</sub>が評価対象物質と類似している</li> </ul>	

		P206：トルクロホスメチル	P248：フェニトロチオン	P256：フェンチオン
			(logP=3.27-3.30)、水溶解度(38 mg/L)が類似している • T <sub>1/2</sub> が4.7-10.6 hrと評価対象物質(7.2-19.8 hr)と類似している	
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 吸収率はいずれも85%以上であり、蓄積傾向のある臓器はなく、最大168時間以内に90%以上が排せつされ、類似している</li> <li>• In silicoのCaco-2膜透過性、代謝安定性及びヒト血漿タンパク結合率の予測結果が類似している</li> </ul>		
	相違性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 評価対象物質に比べ疎水性が高く(logP=4.56)、水溶解度も低い(1.1 mg/L)</li> <li>• 固体である</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T<sub>max</sub>が1-3 hrと評価対象物質(0.2-0.5 hr)に比べやや長い</li> <li>• 評価対象物質のAUC<sub>0-∞</sub>に比べAUCが約7~10倍高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 評価対象物質に比べやや疎水性が高く(logP=3.17-4.8)、水溶解度も低い(7.5 mg/L)</li> </ul>
	不確実性	中：対水溶解度、疎水性の情報から評価対象物質と異なる挙動が想定されたが、吸収、分布、排せつは評価対象物質と類似している。しかし動態に関する知見がない。	中：対水溶解度、疎水性の情報から評価対象物質と異なる挙動が想定されたが、吸収、分布、排せつは評価対象物質と類似している。しかし、AUCが評価対象物質より高く安全サイドの評価になる可能性がある。	中：対水溶解度、疎水性の情報から評価対象物質と異なる挙動が想定されたが、吸収、分布、排せつは評価対象物質と類似している。AUCデータはないが、動態試験におけるT <sub>max</sub> 、T <sub>1/2</sub> 、in silico予測による膜透過性、代謝安定性及びヒト血漿タンパク結合率が類似していることから、AUCが類似している可能性がある
代謝	類似性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• いずれの物質も未変化体は殆ど排せつされず、比較的速やかに代謝を受ける。</li> <li>• オキソン体(-P=O)を介した代謝物の形成、O-メチルにおける脱メチル化、P-O-アリール結合の開裂による代謝が起こり得る。ただし、オキソン体(-P=O)は検出されておらず(投与後2.5-30分以内の測定を行ったシアノホスでは血漿中で1.5-4.6 µg/gで経時的に減衰)、オキソン体の代謝物のみが検出されている。</li> </ul>		
		—	• P-O-アリール結合の開裂によって生じるフェノール代謝物についてはグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体が形成される。	
	相違性	—	—	• 評価対象物質にはない代謝(チオアニソール基(-S-CH <sub>3</sub> )のスルフィニル化等)がある
	不確実性	低：生成する代謝物にAChE活性阻害を示す物質がある可能性があるが、オキソン体になる以外の反応は不活性化の反応であり、代謝物情報から生体内でオキソン体となる場合も速やかに不活性化が起こると考えられる。		
MoA/AOP・生物活性	類似性	<ul style="list-style-type: none"> <li>• いずれも有機リン化合物であり、潜在的にAChE活性阻害を起こす可能性がある。</li> <li>• In silico予測ではいずれも「陽性」を示す結果となった。</li> </ul>		
	相違性	• AChE活性阻害試験(Ms添加系)で陰性	• AChE阻害活性が32.6%と明確な陽性応答を示した	• 陽性判断基準値の近傍値(88.8%)であったが、AChE阻害活性あり(陽性)となった
	不確実性	低：AChE活性阻害はよく知られたMoAであり、不確実性は低い。		
		高：プロトコールが一部不明であるが、判断基準が明確でありin vitro結果は適切である。しかし、評価対象物質の結果(陽性)と異なるため受け入れられない。	低：プロトコールが一部不明であるが、明確な応答が示されており、in vitro結果は適切と考えられる。評価対象物質より強い応答であるが受け入れ可能である。	中：一方、in vitro結果は陽性判断基準値近傍値でボーダーラインの応答と考えられる。
		中：評価対象物質で認められたAChE残存活性は(87.2%)の結果は陽性判断基準値近傍値であり曖昧さが残るが、in silico及びin vitroともに陽性の結果であり、AChE活性阻害の可能性を否定できない		

		P206：トルクロホスメチル	P248：フェニトロチオン	P256：フェンチオン
毒性	類似性	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>経口急性毒性は同程度に弱い</li> <li>一部のAmes試験であるが類似物質では陽性があり、一部の染色体異常誘発性関連試験において陽性がある</li> </ul>	
	相違性	<ul style="list-style-type: none"> <li>経口急性毒性が評価対象に比べ弱い</li> <li>全てのAmes試験、染色体異常誘発性試験等の全てで陰性</li> <li>90日以上の反復投与試験でAChE活性阻害はほとんど認められず、90日試験の投与13週目の最高投与量のみで観察</li> </ul>	•	•
	不確実性	中：染色体異常試験の結果の相違からタンパク質との反応性に違いがある可能性が示唆される。	低：信頼できるデータであり、評価対象物質と一貫した所見となっている。	
仮説の充足度				
リードア クロス を 実 施 す こ と へ の 妥 当 性	データ品質	満たしている	満たしている	満たしている
	仮説充足度	評価対象物質との構造類似性、生物活性類似性が低く仮説①及び②を満たしていない。	評価対象物質と有する官能基は異なるが、リン原子により強い影響を与え得る電子吸引性官能基を有し、 <i>in vitro</i> のAChE活性阻害で評価対象物質よりも強い活性を示した。またADME、毒性が類似しており、血中濃度が高いことは評価対象物質より強いを示す可能性を示唆している。以上より、 <b>仮説を満たしている。</b>	電子供与性官能基を有し、評価対象物質と異なるため、仮説①を十分には満たしていないが、 <i>in silico/in vitro</i> の結果が評価対象物質に類似しており、仮説①の不足に基づく不確実性は軽減されている。類似の代謝プロファイル及び動態を示すことから、 <b>仮説を満たしている。</b>
	結論	妥当ではない	参照物質として妥当である	参照物質として妥当である

仮説①：評価対象物質が有するPhosphorothioateの構造を有し、リン原子の反応性が評価対象物質と類似、あるいは強いと考えられる  
 仮説②：*in silico/in vitro*のAChE活性阻害評価結果が類似している、あるいは評価対象物質より強い作用を有する  
 仮説③：P=O体が速やかに代謝される他、O-メチルにおける脱メチル、P-O-アリアル結合の開裂、この開裂により生じたフェノール体の抱合体形成といった、評価対象物質と類似の代謝経路を有する  
 仮説④：類似の動態を示す

#### d) Step 4：データギャップの穴埋め

参照物質であるフェニトロチオン及びフェンチオンはいずれも90日以上の毒性試験においてNOAELの所見としてAChE阻害活性が認められており、NOAELはそれぞれ1.32及び0.13 mg/kg/日である。ワーストケースシナリオを適用し、*in silico*及び*in vitro*の結果が評価対象物質と類似し、体内動態も類似していると考えられ、安全サイドの評価となるフェンチオンの結果に基づき評価対象物の90日試験におけるAChE活性阻害の可能性及びNOAELを推定した。

結果として、評価対象物質（シアノホス）は90日間の反復投与によりAChE阻害活性を示す可能性があり、そのNOAELは参照物質のフェンチオンのNOAEL 0.13 mg/kg/日より大きいと考えられた（表3-25）。なお、シアノホスの実際の90日間試験のNOAELは0.2 mg/kg/日であった。

表3-25 データギャップの穴埋め結果

No	P123	P248	P256
評価対象物質/類似物質	評価対象物質 (標的物質)	類似物質 (参照物質候補)	類似物質 (参照物質候補)
Name	シアノホス (CYAP)	フェニトロチオン	フェンチオン
90 日反復投与における AChE 活性阻害の有無	Data Gap 穴埋め [AChE 活性阻害あり]	既知情報 : AChE 活性阻害あり	既知情報 : AChE 活性阻害あり
90 日試験の NOAEL [mg/kg/day]	Data Gap 穴埋め [0.13]	既知情報 : 1.32	既知情報 : 0.13

e) Step 5 : リードアクロスの正当化 (Justification) /不確実性評価/Step 6 : 文書化  
類似性の観点以外に関する不確実性評価結果を表 3-26 に示した。

表 3-26 類似性以外に関する不確実性評価

問題の定式化	リードアクロス結果の評価目的での利用に対する不確実性	低 : リードアクロス結果の利用目的は明確に定義され、穴埋めするエンドポイントも明示されている。また受け入れ可能な不確実性レベルが提示されている。
標的物質	適切な識別ができているか	低 : 評価対象物質は明確に特定、定義されているが、不純物情報はなかった
参照物質	適切な識別ができているか	中 : 参照物質は明確に特定、定義されているが、不純物情報はなかった。参照物質は 2 物質である。
	DB・検索条件/網羅性	中 : 類似物質は食品安全委員会が評価した農薬を対象とした。ケーススタディであるため網羅性は限定的である。検索条件は評価対象物質の構造的な特徴とよく知られた MoA に基づくものであり、適切である。
	リードアクロスに使用したデータ品質	低 : 食品安全委員会の評価書においてデータ品質は評価されていると考えられ、評価書内でデータ品質に対する言及がない情報は信頼性が高いと考えられる。
データギャップの穴埋め方法		中 : アナログアプローチによるリードアクロスである。
データギャップの穴埋め方法の穴埋めに関する妥当性 カテゴリーの場合、データの数、分布の不確実性を含む		中 : 2 物質の情報に基づく、ワーストケースシナリオを用いたアナログアプローチである。代謝物の AChE 活性阻害が十分に評価できていないことに加え、 <i>in vitro</i> で AChE 活性阻害が見られた濃度と血中濃度の関係が解析されていない。
専門家判断		低 : 構造類似性の判断において、専門家判断を活用した
標準的要素の包含		低 : 包含されている
データマトリクス		低 : 表 3-22 参照
透明性があり、再現可能な文書化か		低 : 必要な情報源等を含め文書化している。
結論 :		低-中 : 安全サイドの評価として受け入れ可能である。

#### リードアクロスに使用する *in silico* 及び *in vitro* NAM の留意点

評価目的や受け入れ可能な不確実性に依存するが、以下に関して留意が必要と考えられる。

- 選択した *in silico/in vitro* NAM が評価対象とする MoA/AOP に基づくものであること (MoA/AOP が不明な場合はこの限りではない)
- *in silico/in vitro* NAM の詳細な方法が確認できること
- *in silico/in vitro* NAM のエンドポイント及び結果解釈 (例 : 陽性/陰性判断) が明確に定義されていること
- *in silico/in vitro* NAM が適用できる物質の評価であること
- 再現性が確認された結果であること
- 実験データの場合、陽性対象物質が適切に設定されていること
- *In silico* の場合モデル開発に用いたデータセット、そのメタデータ及びアルゴリズム等が明確であること (結果の評価者が評価できること)

(4) 個別課題：食品健康影響評価にリードアクロスを活用する際の考え方の提案（山田 隆志（国立医薬品食品衛生研究所）、小野 敦（国立大学法人 岡山大学）、吉成 浩一（静岡県公立大学法人 静岡県立大学）、安部 賀央里（公立大学法人 名古屋市立大学））

研究項目 1 から 3 で実施した最新の状況整理および研究成果を統合することにより、今後の食品健康影響評価におけるリードアクロスの必要性と適用可能範囲、リードアクロス実施にあたっての前提条件・前提理解、実施手順に含めるべき標準的要素について考察し、実施者と評価者の両視点を意識して実際の手順と留意点、さらに、リードアクロスの不確実性要素とその評価方法を提案する文書を作成し、別添した。

以下に、当該提案文書の構成を示す。

タイトル：

食品健康影響評価にリードアクロスを活用する際の考え方の提案

目次：

## 1. 背景

### 1-1. リードアクロスの概要

### 1-2. 食品健康影響評価でのリードアクロスの必要性と国際動向

## 2. 既存のガイダンス

### 2-1. OECD のグルーピングガイダンス

### 2-2. EFSA のリードアクロスガイダンス

## 3. 食品安全委員会での法的位置づけと食品健康影響評価における適用範囲

### 3-1. 食品安全委員会での法的位置づけ

### 3-2. 食品健康影響評価における適用範囲

## 4. 食品安全影響評価におけるリードアクロスの実施に関する提案

### 4-1. リードアクロスを実施するための前提条件・前提理解

### 4-2. リードアクロス手順に含めるべき標準的要素

### 4-3. 本文書で採用するリードアクロス実施手順

### 4-4. 各ステップの説明

ステップ 0：評価のための問題の定式化

ステップ 1：リードアクロスに関する問題の定式化

ステップ 2：類似物質の特定

ステップ 3：類似物質の評価

ステップ 4：データギャップの穴埋め

ステップ 5：リードアクロスの正当化（Justification）/不確実性評価

ステップ 6：リードアクロス結果の文書化

## 5. 用語集

上記提案の第1章から第3章までは個別課題1及び2で整理しているため、本項ではアンダーラインされた“第4章：食品安全影響評価におけるリードアクロスの実施に関する提案”、“第5章：食品健康影響評価へのリードアクロスの導入へ向けた提案”、“第6章：用語集”について取りまとめる。

#### 4-1) 食品安全影響評価におけるリードアクロスの実施に関する提案

既存のガイダンスの調査・分析を踏まえて、食品健康影響評価におけるリードアクロスの実施および評価に関して以下を提案する。

- リードアクロスを実施するための前提条件・前提理解
- リードアクロス手順に含めるべき標準的要素
- リードアクロスの実施手順

#### 1. リードアクロスを実施するための前提条件・前提理解

##### <実務的側面>

- リードアクロスの実施あるいはその結果の評価は、従来の実験データに基づく評価以上の工程・専門性（化学構造、*in silico*、NAM結果を扱う場合当該NAMに関する専門性等）を含む。そのため、従来評価以上の労力・専門性を要する場合は多いと想定され（特に複雑なエンドポイント）、想定される評価期間や人的リソースの確保が必要との認識が必要である。
- 上記を踏まえ、リードアクロスを選択する以前に、リードアクロス以外の手法（(Q)SAR、TTCアプローチ等）の適用可否を確認し、リードアクロスの必要性を判断することが必要である。
- リードアクロスを実施する場合は、その理由を明確にするとともに、リードアクロス評価の継続可否を適切に判断する基準を「問題の定式化」に定める必要がある。
- リードアクロスの信頼性向上のための追加データの要求可否について明らかにしておくことが必要である。その可否に応じて、リードアクロスに関わる意思決定（方法の選択、リードアクロス評価の継続可否等）を行うためである。

##### リードアクロス評価の継続不可とする場合の例

- 適切な類似物質/参照物質がない場合（類似性のある類似物質がない、適切な毒性学的データがある類似物質がない等）
- 適切な手順を実施し、追加データを加えても不確実性が低減されず、結果を受け入れられない（と想定される）場合
- 類似物質検索のためにアクセスできるデータ範囲を明らかにしておく。特に、当局に提出される企業データの利活用可否について明確にしておくことが必要である。

##### <技術的側面>

- リードアクロスを実施するための類似物質の特定方法についての画一的な方法はない。そのため、類似性を判断するための観点を利用し、客観的指標と専門家判断を併用することでその正当性を説明する必要がある。
- リードアクロスでは様々な側面からの類似性を示すことが必要となるが、その際、リードアクロスによる類推を行うエンドポイント以外の関連性があるエンドポイントにおける一貫性は、類似性の橋渡しをする重要なデータである（Bridging data）との認識が必要である。
- 手順についてはケースバイケースの対応が必要となると考えられるため、柔軟性をもたせる必要があるが、得られる結果の不確実性を低減させるために、各手順に含めるべき標準的要素の順守

が必要である（次項参照）。

- リードアクロスでは、一般的に、定性的予測に比べ定量的予測はより不確実性が大きくなることを認識しておく。
- 有害性がないことを示す場合、有害性がある場合に比べより多くの証拠が必要になる。
- 類似性の説明のひとつとして、評価対象とするエンドポイントの MoA や AOP が既知の場合、生物学的類似性の説明に NAM を使用することは有用である。しかし、NAM のデータがなくとも、説明される正当化が十分であり、不確実性が受け入れられるのであれば、そのリードアクロスの結論は受け入れられる（つまり、NAM を用いた評価が必須ではない）。
- 非標準化試験の方法を用いる場合（例：(Q)SAR、*in vitro* 試験、オミクスデータ）、通常行われる評価と同様、最終的な評価の目的に応じた、また、そのデータが評価全体に与える影響に応じたデータ品質の評価を行う。

## 2. リードアクロス手順に含めるべき標準的要素

リードアクロスを実施する実施手順は、状況に応じて開始ステップが異なる可能性があるため、柔軟性を持たせる必要がある。一方、リードアクロスの不確実性を削減し、透明性を担保するために、リードアクロスの手順に含めるべき要素を明確にし、作業内容を標準化する必要がある。具体的な要素について、EFSA ガイダンス案（EFSA, 2024; 2025）を参考に、リードアクロスに含める手順に再構成するとともに、当該項目が必要と考えられる理由を加えたものを表4-1に提案する。なお、これらの標準的要素は文書化の際に記載すべき内容にもなる。

表4-1 リードアクロスの実施手順に含めるべき標準的要素（EFSA, 2025を参考に作成）

段階	標準的要素	理由
問題の定式化*	<p>&lt;リードアクロスに依らない問題の定式化&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>□ リードアクロスにより予測した結果を活用する場面を説明する</li> <li>□ 受け入れ可能な不確実性を明確にする</li> </ul> <p>&lt;リードアクロスに関する問題の定式化&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>□ リードアクロスにより予測するエンドポイントを定義（評価により回答すべき質問含む）する</li> </ul> <p>リードアクロス評価の継続を不可能と判断する場合の説明をする</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 評価目的に適した評価に関連するアプローチ選択の不確実性を低減するために必要</li> <li>• 評価結果の判断基準に客観性を与えるために必要</li> </ul>
標的物質／参照物質	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 物質アイデンティティ（CAS、SMILES、純度、物理化学的性状（例：対水溶解度、logKow）等）を明らかにする</li> <li>□ 評価対象とするエンドポイントへの影響があるかを評価するために、（特に被験物質についての）不純物を明らかにする#</li> <li>□ 構造特性（主骨格、官能基、ある場合、（互換）異性体、変化物/分解物/代謝物等）を明らかにする（UVCB等の場合）組成、物質特性の範囲（例：炭素範囲、沸点の範囲等）、製造方法等を明らかにする</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 評価対象とすべき物質の理解の不確実性を低減するために必要。</li> <li>• リードアクロスでは構造・物性等の特性に基づく評価が含まれるため、構造・物性等の特性把握も不確実性低減に必要。</li> </ul>
類似物質の同定	<ul style="list-style-type: none"> <li>□ 検索の網羅性、データベース品質を確認するために検索対象とするデータベース及びその定義（どのようなデータベースであるか）を明らかにする</li> <li>□ 類似性/リードアクロスの妥当性説明との対応を確認するために類似物質の同定に関する以下の項目を説明する <ul style="list-style-type: none"> <li>• 検索に使用したアルゴリズム/考え/検索時のインプット情報</li> <li>• 類似物質の包含/除外の定義（閾値を用いた場合その値</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 類似物質の同定時に行われる検索の偏りや限定的になること、検索及び類似物質とする基準の不透明性による不確実性を低減するために必要</li> <li>• 検索により得られる毒性情報等の品質の不確実性を低減するために必要。</li> </ul>

	含む) 検索方法の正当化（特にプロファイラーを用いる場合）	
類似性評価	<input type="checkbox"/> 以下に関して明確な説明がある <ul style="list-style-type: none"> <li>類似性評価に用いる項目（例：構造類似性、生物活性類似性、MoA 等）</li> <li>類似性に関する各項目についての判断基準及び科学的根拠</li> <li>類似性に関する客観的評価と専門家による判断の併用類似性に関する正当化</li> </ul>	リードアクロスに含める類似物質（参照物質）の選択に関わる不確実性を低減させるために必要
データマトリクス	<input type="checkbox"/> 各データ品質を確認可能な情報（例：OECD TG/GLP、試験実施年、Klimisch コード等）を含める <input type="checkbox"/> 類似性評価に必要な情報（情報入手性含む）を含める リードアクロスに使用されるデータ	データ品質やリードアクロスに称するデータの正当化に関する不確実性を低減させるために必要
データギャップの穴埋め*	データギャップの穴埋めの具体的方法及び妥当性について説明する	データギャップの穴埋め方法に関する不確実性を低減させるために必要
不確実性評価	評価結果に対する不確実性の要因及びその影響の大きさについて説明する*	リードアクロスによる類推結果の受け入れ判断に必要
リードアクロス結果の文書化	実施したリードアクロスの正当化された結論を再現できるレベルで記載する	記載の不十分さに基づく正当性の欠如等の不確実性を低減させるために必要
その他	<input type="checkbox"/> リードアクロスの仮説（なぜ類似物質の結果に基づき予測が行えるのか）について説明する* 専門家判断がある場合、その必要性と判断内容を明確にする	<ul style="list-style-type: none"> <li>正当性の理解のために必要</li> <li>専門家判断による評価の不透明性を低減させるために必要。</li> </ul>

\*：EFSAガイドランスに含まれていない内容

#：EFSAガイドランス案（2025）では0.1%以上の不純物との記載がある。

### 3. 本文書で採用するリードアクロス実施手順

個別課題1の成果を踏まえ、食品健康影響評価で使用するリードアクロスの実施手順の主要ステップを本項で以下のように定義したい（図4-1）。

ステップ0：評価のための問題の定式化

ステップ1：リードアクロスに関する問題の定式化

ステップ2：類似物質の特定

ステップ3：類似物質の評価

ステップ4：データギャップの穴埋め

ステップ5：リードアクロスの正当化（Justification）/不確実性評価

ステップ6：リードアクロス結果の文書化

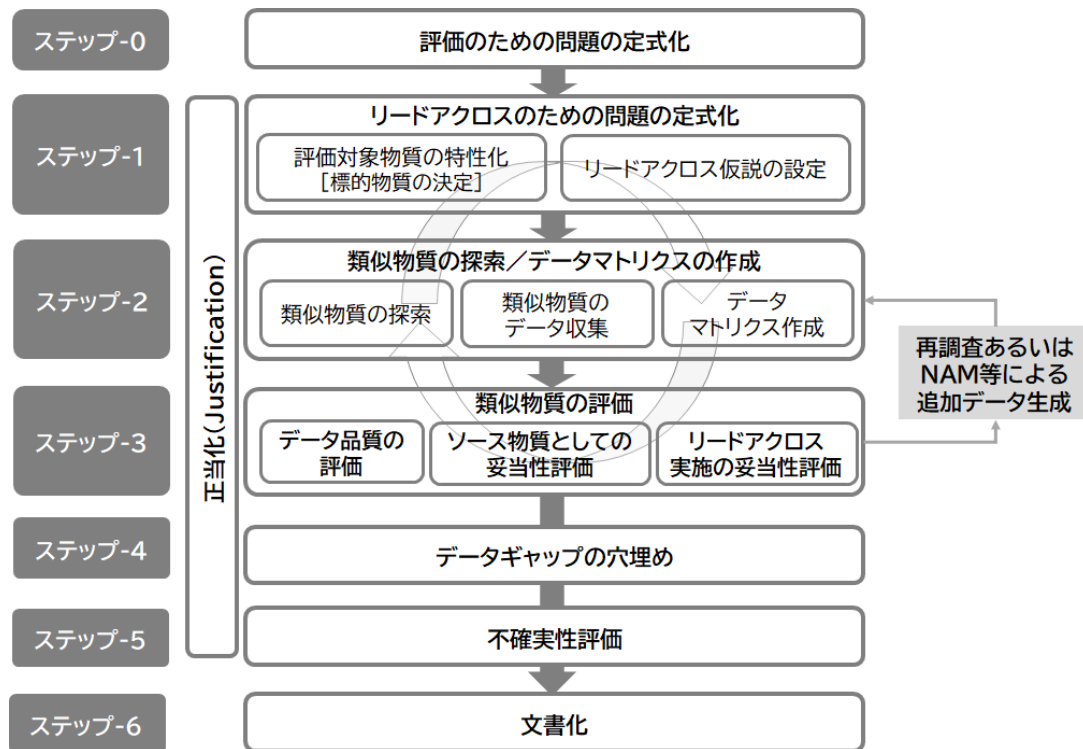


図 4-1 リードアクロスの実施手順概要

#### 4. 各ステップの説明

##### ステップ 0：評価のための問題の定式化

問題の定式化は大きく 2 種類に分けられる。ひとつは、リードアクロス以前にそもそも必要とされている評価に関する問題の定式化（リードアクロスに依らない問題の定式化）であり、もうひとつは、リードアクロスに関する問題の定式化である。ステップ 0 では、前者を行う。以下の[1]-[3]を明確にし、さらに[4]を考慮しておくことが重要である。

- [1] リードアクロスにより予測した結果を活用する場面：評価背景、評価結果がどのように利用されるのか（評価の目的含む）、なぜリードアクロスが必要なのかを含める。
- [2] 類推するエンドポイントの説明及びリードアクロスする情報品質：データギャップの穴埋めを行うエンドポイントや、評価目的（試験実施の優先順位付け、スクリーニング、ハザード特定、リスク評価など）
- [3] 受け入れ可能な不確実性：現段階で定量的な不確実性は困難であるため、低中高の半定量的な指標を用いて受け入れ可能な不確実性を明確にする。または受け入れ可能な曝露マージン (MoE: Margin of Exposure) を明確にする。

表 4-2 不確実性の半定量的分類

低	不確実性が低い	参照物質のデータ品質が要件を満たしており、リードアクロスの結果に影響を与えない不確実性がない、または殆どない場合
中	不確実性が中程度	参照物質のデータ品質が要件を満たしており、類似性の正当化に関して、一定の不確かさはあるが、受け入れ可能である場合。

高	不確実性が高い	リードアクロスの結果に重大な影響を与える不確実性があるか、参照物質のデータ品質が必要な情報品質を満たしていない場合
---	---------	---

[4] リードアクロス評価の検討継続を不可能とする考え方：リードアクロスに関する評価段階において以下が明確になった段階でリードアクロス評価の検討継続を中止する。

- 適切な類似物質/参照物質がない場合（類似性のある類似物質がない、適切な毒性学的データがある類似物質がない等）
- 適切な手順を実施し、追加データを加えても不確実性が低減されず、結果を受け入れられない（と想定される）場合
- 不確実性低減のための追加データの取得が行えない場合

### ステップ1：リードアクロスに関する問題の定式化

評価対象物質について情報を収集してデータマトリクスに整理し、評価に十分な情報が利用できるかを調査する。どのエンドポイントのどのようなデータが不足しているか（データギャップ）を特定する。これにより適したデータの穴埋め方法が判断でき、場合によっては(Q)SAR のようなリードアクロス以外の手法が適している可能性がある。また、関連するエンドポイントや代謝の情報、(Q)SAR 予測結果なども利用できる。これらの情報とステップ0を踏まえ、リードアクロスの標的物質（評価対象物質、その代謝物など）を決定し、その構造やメカニズム（MoA/AOP）といった特徴を把握する。

次に、リードアクロスの仮説を設定する。これは参照物質の特定のエンドポイントに基づき標的物質のデータギャップの穴埋めができる理由を説明するもので、何に着目して類似性を定義し、どのように類似物質を特定するか、類似物質の探索方法の根拠を示すものである。作用機序、官能基の反応性、代謝の類似性などが挙げられる。ここで仮説を設定するが、内容は随時見直しを行い、ステップ3までに最終化する。カテゴリーアプローチを取る場合は、ここで一旦、カテゴリーについても構造的特徴、適用範囲などを定義するが、次のステップ2で収集した情報に基づき最終化する。

### ステップ2：類似物質の特定

#### 類似物質の探索

ステップ1で整理した標的物質の構造的特徴（例：主要な化学骨格、官能基、特徴的な部分構造）、代謝物構造や代謝経路、利用可能な場合には MoA/AOP や生物活性を手掛かりに、リードアクロスの仮説に基づき類似物質の特定方針を設定する。類似物質を特定する観点の例として、以下がある。

- ◆ 構造・化学的類似性
- ◆ 製造工程の類似性（特に UVCB の場合）
- ◆ 物理化学的性状の類似性
- ◆ トキシコキネティクスの類似性
- ◆ メカニズム（MoA/AOP）の類似性
- ◆ 代謝物や分解物の類似性
- ◆ 毒性学的類似性

この特定方針に従って特定された物質を「類似物質<sup>28</sup>（参照物質の候補）」とする。なお、「ステップ2：類似物質の特定」と「ステップ3：類似物質の評価」は、繰り返しが必要になる可能性がステップであり、特定方針を見直す場合がある。

<sup>28</sup> EFSAガイダンス案（2025）の用語定義とは異なる。EFSAガイダンス案では類似物質と参照物質を同様の意味で用いているが、ここでは、参照物質の候補を類似物質と表現する。

類似物質を特定する際の留意点を以下に示す。

- ❑ 収載物質のタイプ、情報品質、検索アルゴリズム等の特性を把握した少なくとも2つ以上のデータベースを用いて検索を行う（例：OECD QSAR Toolbox、AMBIT、GenRA等）。評価目的に応じて適したデータベースが異なる場合もあることから、適宜、適切に選定する。
- ❑ 上記に示した類似物質特定の複数の観点に基づいて類似物質を特定する必要がある。
- ❑ 評価目的に照らして受け入れ可能と判断される場合は、類似性の差異が安全サイドに想定できる場合は、「受け入れ可能な差異」としてその差異を有する物質を類似物質に含めることができる。
- ❑ 毒性情報の収集に際しては、通常実施している有害性評価のための調査と同様の調査を行う。
- ❑ 構造・化学的類似性を用いる場合
  - 反復投与毒性や生殖発生毒性のような、メカニズム等の事前知見が得られないことが多いエンドポイントの場合、初期の検索に際して、主要な化学骨格や特徴的な部分構造、あるいは構造類似性指標から検索をスタートすることが有用な場合がある。ただし、構造類似性指標（例：Tanimoto類似性）は類似性の閾値を設定できないためケースバイケースでの判断が必要となる。
  - 変異原性のような特定の官能基が毒性に直接的に寄与することが既知の場合には、官能基からスタートすることが有用な場合がある。
  - MoA/AOPが既知の場合、MIEに関与する構造特性を利用できる（例：エストロゲン活性の場合、フェノール環等）
- ❑ 警告構造を活用する場合
  - 少なくとも2つ以上の独立したツールの警告構造等を用いて（例：OECD Toolboxのプロファイラー、ToxTree、Derek Nexus）、標的物質にある警告構造を含む類似物質を選択する。
  - 類似物質の選択に際して、標的物質にない毒性を減弱させる構造を有する物質は基本的に選択しない。
- ❑ 物理化学的性状を用いる場合
  - 実測値が望ましいが、実測値を持たない物質との比較のために(Q)SARの予測値も考慮する。
- ❑ 代謝物・代謝経路を用いる場合
  - 知見がない場合、*in silico*による予測を用いることができる。可能であれば、代謝経路を含めて予測できるものが望ましい。
- ❑ 生物活性に基づく MoA/AOP の類似性を用いる場合
  - *In silico* や *in vitro* 試験等で取得されたメカニズムに関連するデータも利用できる。ただし、類似物質検索の初期段階で *in vitro* 試験等の結果を用いるより、構造や代謝に関する情報で絞り込みをした上で *in vitro* 試験等のデータでさらに絞り込みをすることで、より望ましい類似物質を見つけやすいことが報告されている（Irwan *et al.*, 2024）<sup>29</sup>。
- ❑ 評価対象物質と構造は類似しているものの、毒性プロファイルが異なる物質も積極的に収集する。上記2つの物質群を比較・分析することで、毒性発現に寄与する構造的特徴や作用機序をより明確に特定し、予測の精度と信頼性を向上させる。

### 類似物質のデータ収集/データマトリックスの作成

正当化できる方法に基づき絞り込まれた類似物質について、添付資料4のデータマトリックステンプレートの例」に示す項目を参考に体系的な情報収集を行い、データマトリックスを作成する。評価目的に照らして受け入れ可能な場合には、収集する情報項目を削減できる。情報収集をする際は、一貫した方

<sup>29</sup> Irwan *et al.* (2024) Read-Across Application for Food or Feed Ingredients. EFSA supporting publication :EN-8811.77 pp

法に基づき実施することが重要となる。実験データがない場合、(Q)SAR の結果も参考となる。これらは、次の「ステップ 4：類似物質の評価」における参照物質選択作業に不可欠であるとともに、参照物質選択の透明性を高めるために必要である。毒性に関する情報については、試験の信頼性を評価できる情報（Klimisch コード等）を加える。

データギャップの穴埋めを行うエンドポイントの入手性に応じて「ステップ 4：類似物質の評価」に供する物質を決定する。

類似物質の特定の際に実施した手順について、少なくとも以下の記録を残す。

- 類似物質の特定方針
- 検索したデータベース・ツールの名称等（Version 含む）及びその利用目的（例：構造類似物質の特定、有害性情報の収集）
- 探索時に使用した入力情報（検索時のオプション設定含む）
- 類似物質の包含/除外基準及びその根拠（閾値を用いた場合その値の根拠を含む）（包含基準に標的物質が含まれることは確認すべきである）
- 検索時にヒットした物質及び数
- 「類似物質の評価」に供する物質

### ステップ 3：類似物質の評価

このステップでは、前項で特定した類似物質の情報を評価し、標的物質のリードアクロスに使用する参照物質として利用可能かを評価する。[1]実験データの入手可能性と品質、[2]参照物質としての妥当性の両面からの評価を行う。

#### データ品質の評価

- 実験データの入手可能性と品質に関して評価するために、一貫した方法で信頼性を評価する。データマトリクス作成時に付与した Klimisch コードも参考になる。リードアクロス対象としているエンドポイントのデータ品質が「ステップ 0：評価のための問題の定式化」で設定した情報品質に合致するか確認し、必要なデータ品質を満たす物質のみが参照物質となり得る。なお、この品質が満たない場合でも、リードアクロスを支持する説明が可能な場合、「サポート物質」として正当性の説明に利用できる。

#### 参照物質としての妥当性評価

- 参照物質としての妥当性に関して、アナログアプローチの場合には、標的物質との共通性・一貫性を、カテゴリーアプローチの場合には、標的物質を含めたカテゴリーメンバー内の共通性・（傾向の）一貫性を確認する。
  - 具体的には、リードアクロスの仮説や特定方針において設定した類似性項目（例：構造、化学的特性、物理化学的性状、MoA/AOP、代謝物/分解物、トキシコキネティクス、毒性プロファイル等）のうち、評価に使用する少なくとも 2 つ以上の類似性項目を明らかにした上で、具体的な証拠と共に類似性に関する科学的評価を行う（表 4-3 類似性評価のチェックリストを参照）。
  - ツールを用いて定量的な構造類似性指標等を算出する場合には（例：Tanimoto 係数）、評価対象とする類似物質及び標的物質について共通の方法で算出した指標に基づき判断をすること。これは、方法やツールが違う場合、横並び比較できないためである。なお、類似性評

価の際にツール（アルゴリズム）を用いる場合、複数のアルゴリズムを用いるとともに、類似性の指標（数値）に依存し過ぎないことも重要である。類似性だけでなく、相違（構造、物理化学的性状、代謝/トキシコキネティクス、生物学的特性等）が評価対象とするエンドポイントにおける有害性の種類（例：標的臓器の違い）や強さの違いを生じる可能性があるかも評価する。

表 4-3 類似性評価のチェックリスト

チェックリスト（暫定）	
構造的・化学的類似性	<input type="checkbox"/> 共通の官能基又は部分構造があるか？ <input type="checkbox"/> 標的物質にない、評価対象エンドポイント影響する構造があるか？ <input type="checkbox"/> ある場合、その影響は有害性の増強か？減弱か？
物理化学的性状	<input type="checkbox"/> 評価対象エンドポイントに関連する性状について類似あるいは一定の変化があるか？ <input type="checkbox"/> 相違がある場合、その相違に基づく影響は有害性の増強か？減弱か？
MoA/AOP	<input type="checkbox"/> 共通の MoA があるか？ <input type="checkbox"/> AOP の場合、MIE/KE に類似あるいは一定の変化があるか？ <input type="checkbox"/> 相違がある場合、その相違に基づく影響は有害性の増強か？減弱か？
代謝物/分解物	<input type="checkbox"/> 共通あるいは類似した代謝物を生成するか？ <input type="checkbox"/> 標的物質が生成しない代謝物を生成するか？ <input type="checkbox"/> 代謝経路が類似しているか？ <input type="checkbox"/> 相違がある場合、その相違に基づく影響は有害性の増強か？減弱か？
ADME/動態	<input type="checkbox"/> 標的臓器が同じか？ <input type="checkbox"/> 吸収、排泄の挙動が類似しているか？ <input type="checkbox"/> 相違がある場合、その相違に基づく影響は有害性の増強か？減弱か？
毒性プロファイル	<input type="checkbox"/> 従来毒性試験による毒性プロファイルが類似又は一定の変化があるか？
UVCB の場合、製造方法、構造範囲等	<input type="checkbox"/> 含有される化学物質の特性が類似していると言えるか？

### リードアクロス実施に関する妥当性評価

参照物質としてリードアクロスを実施する（データギャップの穴埋めをする）ことの妥当性について検討する。妥当性ではないと判断場合の選択肢として以下がある。

- 他の類似物質を探す（ステップ 2 に戻る）。
- カテゴリーアプローチの場合、サブカテゴリー化を検討する。
- 作用の強さの傾向を確認する必要がある等のデータギャップが特定された場合、そのデータの入手可能性（試験によるデータ生成を含む）について検討する。
- 評価の中止を判断する。

### ステップ 4：データギャップの穴埋め

データギャップの穴埋めは、参照物質の試験データを用いてリードアクロスにより評価対象物質に関する予測を行うプロセスであり、これは専門家による推論、またはアルゴリズムによって導き出される。まずは、データギャップの穴埋めのための戦略を決定する。

- ワーストケース（類似物質が示す最も強い毒性値を用いる）。外挿を許容可能なため、アナログアプローチでの使用が適している。
  - 類似性に基づく最近傍値
  - 類似物質の毒性値の統計学に基づく傾向分析からの予測値
- どの方法を選択するかは、「ステップ 1：リードアクロスのための問題の定式化」で定義した評価目的、予測対象エンドポイント及び作成したデーマトリクスのデータに依存する。なお、必要に応じて、専門家判断に基づき、データギャップの穴埋めの際に調整係数を使用できる。

### ステップ 5：リードアクロスの正当化（Justification）/不確実性評価

このステップでは、科学的証拠の重み付け（WoE：Weight of Evidence）に相当する工程である。リードアクロスの正当性を説明するとともに、リードアクロスの各ステップでの不確実性における要因及びリードアクロスによる評価結果への影響の大きさを明らかにしたうえで、低中高の三段階で半定量的に各不確実性の項目を評価する。不確実性評価では最終的に全体の不確実性を評価し、「ステップ 0：評価のための問題の定式化」で規定した目的においてリードアクロスの評価結果が含む不確実性の受け入れ可否を低中高で評価する。不確実性評価で評価すべき内容を添付資料 5 に示した。

評価の結果、不確実性が受容できる場合、リードアクロスによる評価について結論し、次のステップに進む。

不確実性が受容できない場合、その原因を特定し、その低減対策を検討する。新しいデータを作成した場合は「類似物質の評価」からの工程を再度実行し、不確実性が受け入れ可能になったかを確認する。手続きの不備の改善や証拠を追加しても不確実性が受容できない場合にはリードアクロスが現実的ではない可能性がある。

不確実性に関する留意点を以下に示す。

- カテゴリー評価であっても、実際にカテゴリーメンバーが有するデータ数/密度が少ない場合、明確な傾向をとらえられないため、不確実性が増す。
- 物質間、類似性評価項目間のデータの一貫性に欠け、その説明ができない場合、不確実性が増す。
- MoA/AOP をリードアクロスの仮説に含むが、提示した証拠が実際の毒性と直接的関連性を示すものではない場合、不確実性が増す（例：エストロゲン活性がないことが、生殖毒性がないことを示すわけではない）。
- 反復投与毒性や生殖毒性等の複雑なエンドポイントについては MoA/AOP やキネティクスに関する知見がない場合、ある場合に比べ、不確実性が増大する。

表 4-4 リードアクロスの不確実性評価項目と不確実性に関する質問

本調査に基づき提案した不確実性評価項目		提案する不確実性に関する質問
問題の定式化	リードアクロス結果の評価目的での利用に対する不確実性	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ リードアクロス結果の利用目的が明確に定義されているか？</li> <li>◆ 穴埋めするエンドポイントは明示されているか？</li> <li>◆ 定義された利用目的において、許容できる不確実性のレベルが適切に定義されているか？</li> </ul>
標的物質	適切な識別ができているか	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 標的物質は明確に特定され、明確に定義されているか（例：構造、光学異性、組成等）？</li> <li>◆ 含有しうる不純物が特定されているか？</li> </ul>
参照物質	適切な識別ができているか	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 参照物質は明確に特定され、明確に定義されているか（例：構造、光学異性、組成等）？</li> <li>◆ 含有しうる不純物が特定されているか？</li> </ul>

		◆ 参照物質は複数あるか？1物質のみか？	
	<b>DB・検索条件/網羅性</b>	◆ 類似物質探索に使用したデータベースは質、網羅性の観点で適切か？ ◆ 使用した検索条件、類似物質選定条件は適切か？ ◆ 毒性情報は十分に探索されているか？	
	リードアクロスに使用したデータ品質（※問題の定式化で定義されたレベルの品質か？）	◆ 類推に使用される毒性データは、問題の定式化で定義された品質を満たし、標的エンドポイントに適しているか？	
<b>(カテゴリーの場合)カテゴリーの定義</b>		◆ アナログまたはカテゴリーの適用領域が適切に定義されているか？	
<b>類似性/相違*</b>	<b>(1) 構造/反応性</b>	データの品質・入手性	◆ データの情報源が明確で、十分な質があるか？ ◆ データには一貫性、一貫した傾向があるか？ ◆ 相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？
		(複数のデータがある場合)個別物質内での一貫性	
		物質間（類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー）での一貫性	
		相違に関する説明	
	<b>(2) 代謝</b>	データの品質・入手性	◆ データの情報源が明確で、十分な質があるか？ ◆ データには一貫性、一貫した傾向があるか？ ◆ 相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？
		(複数のデータがある場合)個別物質内での一貫性	
		物質間（類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー）での一貫性	
		相違に関する説明	
	<b>(3) 物理化学的性状</b>	データの品質・入手性	◆ データの情報源が明確で、十分な質があるか？ ◆ データには一貫性、一貫した傾向があるか？ ◆ 相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？
		(複数のデータがある場合)個別物質内での一貫性	
		物質間（類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー）での一貫性	
		相違に関する説明	
	<b>(4) 吸収、分布、排せつ／動態</b>	データの品質・入手性	◆ データの情報源が明確で、十分な質があるか？ ◆ データには一貫性、一貫した傾向があるか？ ◆ 相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？
		(複数のデータがある場合)個別物質内での一貫性	
		物質間（類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー）での一貫性	
		相違に関する説明	
	<b>(5) MoA/AOP、その他生物活性</b>	MoA/AOP の情報の確からしさ	◆ 標的エンドポイントの毒性を説明できる、適切な MoA/AOP が明確に定義されているか？ ◆ そのもっともらしさは評価目的に照らして適切か？ ◆ MoA/AOP に係る情報を提供する試験法やデータがあるか？ ◆ それらは、毒性を引き起こす可能性について十分説明できるものか？ ◆ データの情報源が明確で、十分な質があるか？ ◆ データには一貫性、一貫した傾向があるか？ ◆ 相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？
		MoA/AOP に係る情報を提供する方法論の適正	
		データの品質・入手性	
		(複数のデータがある場合)個別物質内での一貫性	
物質間（類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー）での一貫性			
相違に関する説明			
<b>(6) 毒性プロファイル</b>	データの品質・入手性	◆ データの情報源が明確で、十分な質があるか？	

	(複数のデータがある場合) 個別物質内での一貫性	あるか？ ◆ データには一貫性、一貫した傾向があるか（曝露期間の違いに基づく差異、毒性の強さ、標的性含む）？ ◆ 相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？
	物質間（類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー）での一貫性	
	相違に関する説明	
	類似性に関する全体としての評価	◆ 類似性項目(1)～(6)のうち、類似性の説明に使用した項目について、全て適切に正当化されているか？ ◆ それらの項目間の内容に一貫性があるか？（例：特定の官能基による毒性減弱が示唆されている場合、動物試験で毒性の減弱が見られる等） ◆ 全体として、参照物質を類推に用いることは適切か？
類似性/相違項目全体として評価対象エンドポイントへの影響/仮説（類推を可能とする説明）に対する充足度		◆ 問題の定式化で定義した目的を満たすためのリードアクロスとして、標的とする毒性エンドポイントを類推する上で十分な仮説となっているか？（仮説に含まれ得る情報の例：構造との関連。代謝が関与する場合、速さや代謝物。既知の場合、MoA/AOP。これらと標的エンドポイントとの関連性） ◆ これらの仮説に対して十分なデータに基づく正当化が行われているか？ ◆ 橋渡しデータの種類や密度は、リードアクロスに類推を十分に支持しているか？
データギャップの穴埋め方法		◆ リードアクロス・アプローチ（例：アナログ、カテゴリー）が明確に報告されているか？ ◆ 標的物質と参照物質は、定義された適用範囲内に収まっているか。 ◆ 最も保守的な結果が採用されていない場合、なぜそうでないかを説明できる堅牢な論拠があるか？
データギャップの穴埋め方法の穴埋めに関する妥当性 カテゴリーの場合、データの数、分布の不確実性を含む		◆ 複数物質のデータがある場合、同じ毒性を示す一貫性が示されているか？ ◆ 既知のメカニズムがある毒性エンドポイントを類推する場合、利用可能な情報は標的毒性エンドポイントでの影響の有無を十分に説明しているか？不足するデータがある場合、それはどの程度か？ ◆ 弱い毒性あるいは毒性がないことを示す類推である場合、そのことを示す根拠が十分にあるか？
専門家判断		◆ 専門家判断が行われた内容が説明されているか？
標準的要素の包含		◆ 必要な標準的要素が適切に包含されているか？
データマトリクス		◆ 適切なデータマトリクスが整備されているか？
透明性があり、再現可能な文書化か		◆ 一貫性があり、目的に適した文書が行われているか？

\*：(1)～(6) の項目のうち、実施したリードアクロスに用いた項目について評価する。

## ステップ6：リードアクロス結果の文書化

リードアクロス結果の文書化に際しては、実施したリードアクロスを再現できるレベルで記載することが望ましい。なお、「ステップ3：類似物質の特定」で作成したデータマトリクスにおける類似物質が多い場合、理解しやすさの観点から、最終的なリードアクロスに用いる参照物質と標的物質のみを抜き出したデータマトリクスを作成する。

ステップ3では、リードアクロスの仮説を支援するために、評価対象物質と類似物質のトキシコキネティクスやトキシコダイナミクスの特性、AOPや作用機序などに関する追加情報を得るためにNAMを実施するかを考慮してもよい。

ステップ5の不確実性の低減策には、ステップ3同様に、評価対象物質の追加情報を得るために、NAMを実施して不足する情報を穴埋めするデータを得ること等が含まれる。NAM試験などにより新し

い情報が得られた場合、再度、データギャップ穴埋めを実行し、不確実性の評価により、不確実性のレベルが許容できるかを確認する。

## 5. 食品健康影響評価へのリードアクロスの導入へ向けて

リードアクロスの導入には、その科学的妥当性と信頼性の確保が不可欠である。専門家が限られている状況下では、本研究事業での調査および研究の成果等を踏まえて、以下の点を重視し、段階的に進めていくことが現実的であると考えられる。

### 5-1. 基礎知識の習得と意識の変革

勉強会やトレーニングの実施：

食品健康影響評価にかかる関係者を対象に、リードアクロスの基本的な考え方、適用範囲、限界、評価のポイント（類似性評価、データギャップの扱いなど）について、外部専門家を招いた研修やオンライン教材を活用した学習機会を設ける。本研究事業で取りまとめた海外の規制当局における導入事例やガイダンスを紹介し、具体的なイメージを掴めるように務める。

意識変革の促進：

動物実験代替への意識を高めていくとともに、将来的にはリードアクロスを「単なるデータ不足を補う手段」ではなく、「科学的根拠に基づいた WoE による合理的な評価手法の一つ」として認識することも必要である。成功事例だけでなく、受け入れ不可の事例や課題も共有し、現実的な理解を深めていくことが重要である。

### 5-2. 段階的な導入と経験の蓄積

限定的な範囲からの開始：

EFSA 等の海外のリスク評価機関で評価されたリードアクロスの結果を食品健康影響評価に受け入れることが可能か、検討することから始めることは現実的である。

次のステップとして、国内、例えば厚生労働省などによるリードアクロスの結果の評価を食品健康影響評価において検討することが考えられる。また、食品健康影響評価で食品安全委員会が自らリードアクロスを実施していくことも考えられる。構造が非常に類似しており、作用機序が共通していると考えられる物質群や、曝露レベルが極めて低い物質群から試験的に導入を開始することは一案である。データが比較的豊富で、評価のコンセンサスが得られやすい物質群を優先することが望ましい。

パイロットプロジェクトの実施：

特定の化学物質群や評価項目に絞り、専門家のアドバイスを受けながらパイロットプロジェクトを実施することも一案である。その過程で、評価手順、判断基準、必要な情報、内部でのコミュニケーション体制などを具体的に検討し、課題を洗い出すことが求められる。

事例を集約したデータベースの構築と共有：

実施したリードアクロスの事例（受け入れ可能な例・不可の例、判断根拠、議論のポイントなど）を内部でデータベース化し、共有する。これにより、担当者間の知識や経験のばらつきを減らし、専門委員会の枠を超えて評価の一貫性を高める。

簡易的なチェックリストやガイダンスの作成：

専門家でなくても、リードアクロスの妥当性を評価する上で最低限確認すべき項目（構造類似性、作用機序の共通性、データの質など）をまとめた本提案書をもとにチェックリストや簡易ガイダンスを理解する。初期段階では、専門家のレビューを受けることを前提とするのがよい。

既存ツールの活用検討：

OECD QSAR Toolbox などの国際的に利用されているリードアクロス支援ツールについて、その機能や利用方法を学び、限定的な利用から試みる。ただし、ツールの結果を鵜呑みにせず、あくまで判断の一助として活用することが重要である。

「受け入れ不可」の判断基準の明確化：

どのような場合にリードアクロスが適用できないか、あるいは追加情報が必要となるかの判断基準を、実経験をもとにできる限り具体的に定めていく。これにより、不確実性の高い評価を避けることができる。

### 5-3. 専門家との連携体制の構築

外部専門家ネットワークの活用：

国内外の研究機関のリードアクロスの専門家、既存のリスク評価の専門家など関係者と連携できる体制を構築し、個別の案件に対してアドバイスを求めることができる仕組みを作ることが望ましい。

海外機関との情報交換：

海外で先行してリードアクロスを活用している規制当局や関連機関とリードアクロスの評価事例を共有し、その課題について積極的に情報交換を行うことが推奨される。これにより、自機関だけでは得られない知見やノウハウを学ぶことができると期待される。

人材育成の視点：

長期的な視点では、内部の職員を国内外の専門的な研修に派遣するなど、専門知識を持つ人材を育成することも検討すべきである。

### 5-4. 透明性と説明責任の確保

評価プロセスの文書化：

リードアクロスを用いた評価プロセスや判断根拠を明確に文書化し、記録として残すことが必要である。これにより、後日の検証や説明責任を果たすことができる。

内部レビュー体制の確立：

複数の担当者による内部レビュープロセスを導入し、判断の客観性を高めることが必要である。初期段階では、複数の専門家の意見を必ず聴取するプロセスを組み込む。広い範囲の専門性を必要とすることから、化学、生化学、毒性学などに詳しい専門家が相補する体制を確立することが望ましい。

### 5-5. 導入にあたっての留意点

着実に経験を蓄積する：

リードアクロスの導入は一朝一夕には達成できない。小さな成功体験を積み重ねながら、徐々に適用範囲を広げていくことが重要である。

再評価の必要性：

NAM の利用など発展途上の要素もあることから、場合によっては年月をおいて再評価を実施し、必要に応じてその結果の見直しや修正も行う柔軟性も求められる。

不確実性の受容と管理：

リードアクロスには本質的に不確実性が伴う。その不確実性を認識し、適切に評価・管理する方法を学ぶ必要がある。

コミュニケーションの重要性：

関係部署間や専門家との円滑なコミュニケーションが、導入を成功させるための鍵となりうる。

これらの工夫を通じて、専門家が限られた行政機関においても、リードアクロスを少しずつ導入し、動物実験の削減と化学物質評価の効率化・高度化に貢献していくことが期待される。

添付資料1 RAAFにおける各シナリオに対する評価要素（ただし、評価要素の表現はわかりやすいように改変）（ECHA, 2007）

アプローチ	アプローチ共通のAE	シナリオ	仮説	シナリオ特異的なAE
アナログアプローチ	<p><b>AE A.1</b>：参照物質の同定と特性化（不純物プロファイルを含む）</p> <p><b>AE A.2</b>：提案された予測と構造の類似性・違いとの関連</p> <p><b>AE A.3</b>：参照物質の試験に関する信頼性及び妥当性</p> <p><b>AE A.4</b>：予測に影響を与えるバイアス<sup>30</sup></p>	シナリオ1：共通の生成物を生成する	代謝/変換により共通の物質が生成し、その物質が有害性を引き起こす。	<p><b>AE1.1</b>：共通の物質が（どのように）生成されているか？★</p> <p><b>AE1.2</b>：生成物が同じ標的に影響し、同じ影響を生じるか？</p> <p><b>AE1.3</b>：共通の物質に対する標的への曝露が類似しているか？</p> <p><b>AE1.4</b>：親物質や不純物による全身曝露（局所標的の場合は接触部位での曝露）が検討されているか？また、予測対象とする特性に影響がないか？</p> <p><b>AE1.5</b>：類似しない物質が生成されるか？また、その影響が考慮されているか？</p>
		シナリオ2：異なる物質が類似した影響をもつ	構造的に類似した異なる物質が類似した有害影響を引き起こす	<p><b>AE2.1</b>：標的物質・参照物質投与後に試験生物が曝露される物質が特定されているか？</p> <p><b>AE2.2</b>：共通のメカニズムが確立されているか？また、質的に共通の影響を予測することが可能か？</p> <p><b>AE2.3</b>：予測対象とする特性に関して、共通のメカニズムが量的に同じ影響を引き起こすか？</p> <p><b>AE2.4</b>：予測に関連しない他の物質が生成される可能性があるか？また、その物質が予測対象とする特性の予測に影響はあるか？</p> <p><b>AE2.5</b>：仮説でカバーされない他の影響が生じる可能性があるか？（標的物質・参照物質の毒性プロファイルが他の機序を示唆するか？また、他の機序による影響が生じる用量はリードアクロスの正当化において十分に説明されているか？）</p>
カテゴリーアプローチ	<p><b>AE C.1</b>：カテゴリーメンバーのアイデンティティ及び不純物プロファイルは十分に詳細か？</p> <p><b>AE C.2</b>：カテゴリー内での構造類似性及びカテゴリー内で許容される相違構造的が示されているか？</p> <p><b>AE C.3</b>：カテゴリーの仮説が提供され（一定のパターンがあるか）、すべてのカテゴリーメンバーに当てはまるか（妥当性があるか）？</p> <p><b>AE C.4</b>：データマトリックスにおける影響に一貫性があるか？強度が異なる場合、その違いが説明されているか？</p>	シナリオ3：共通の生成物を生成する（定量的）	カテゴリー内の複数の物質が共通の物質を生成し、その物質が有害性を引き起こすが、 <b>構造の違いに関連した規則的パターンで影響の強さに定量的差が生じる。</b>	<p><b>AE 3.1/AE 5.1</b>：仮説で想定されている共通の物質が（カテゴリー内で）生成されているか？また、共通物質の生成に関する科学的説明が、一つ以上のカテゴリーメンバーについて欠けている場合、予測対象とする性状の予測に影響があるか？（AE.1.1と類似）</p> <p><b>AE 3.2/AE 5.2</b>：カテゴリー内生成する共通の物質が共通の標的に曝露されるか？また生じる影響が共通か？（AE 1.2と類似）</p> <p><b>AE 3.4/AE 5.4</b>：親物質や不純物による全身曝露（局所標的の場合は接触部位での曝露）が検討されているか？また、予測対象とする特性に影響がないか？（AE.14と類似）</p> <p><b>AE 3.5/AE 5.5</b>：他の経路で共通しない物質が生成されるか？また、予測対象の性状の予測に影響を与えるか？</p>
		シナリオ5：共通の生成物を生成する（定量的差異なし）	カテゴリー内の複数の物質が共通の物質を生成し、その物質が有害性を引き起こすが、 <b>影響の強さに有為な定量的差が生じない。</b>	<p><b>AE 3.3</b>：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>共通物質の生物学的標的への曝露が予測可能な方法で変化することが示されているか？</li> <li>評価対象の性状とカテゴリー内の順番を定義する独立変数の間にある一定のパターンに基づく予測か？あるいはカテゴリー内のワーストケースに基づく予測か？</li> </ul> <p><b>AE5.3</b>：標的物質と参照物質からの共通物質の標的への定量的曝露量が類似しているか？1つ以上のカテゴリーメンバーについて類似性が確立されていない場合、予測に与える影響はあるか？</p>

<sup>30</sup> RAAFでは、バイアスについて(1)類似物質の選択（関連のある特性が著しく異なる他の類似物質である場合、提案された予測の信頼度は減弱する）、(2)試験の選択（ソース試験として提案された試験以外の情報で、より高い懸念が生じる）、(3)独立変数（一定のパターンを説明する独立変数の実測あるいは予測結果が、特定の構造的特徴を持つカテゴリーメンバーにおいて系統的かつ不適切に変更されている場合、予測に影響を与える可能性がある）、の3種が示されている。

アプローチ	アプローチ共通の AE	シナリオ	仮説	シナリオ特異的な AE	
	<p><b>AE C.5</b> : ソース試験の信頼性及び妥当性 (評価目的に合致するか) があるか?</p> <p><b>AE C.6</b> : 予測に影響を与えるバイアスエラー<sup>1</sup> ブックマークが定義されていません。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>他の構造的に類似した物質がカテゴリーメンバーとして考慮されたか、及び他の構造的に類似した物質がカテゴリーメンバーに加わり得るかをどの程度説明できるか?</li> <li>これらの物質の入手可能な情報が評価対象とする特性の予測に違いをもたらすか?</li> <li>予測の根拠として使用される参照物質の試験が、予測対象とする性状に関して、利用可能な信頼できる研究の中で最も懸念の高い結果を示しているものに対応しているか?</li> </ul>	<p><b>シナリオ 4</b> : 異なる物質が質的に類似した影響をもつ (<b>定量的</b>)</p>	<p>カテゴリー内の複数の物質が構造的類似性による質的に類似した有害性を引き起こすが、<b>構造の違いに関連した規則的パターンで影響の強さに定量的差異が生じる。</b></p>	<p><b>AE 4.1/AE 6.1</b> : 標的物質・参照物質投与後に試験生物が曝露される物質が特定されているか? (AE2.1 と類似)</p> <p><b>AE 4.2/AE 6.2</b> : 共通のメカニズムが確立されているか? また、質的に共通の影響を予測することが可能か? (AE2.2 と類似)</p> <p><b>AE 4.4/AE 6.4</b> : 予測に関連する物質以外の物質が存在または形成される可能性 (例: 他の (生体) 変換経路を通じて。または、親物質・不純物通して) があるか? ある場合、予測に影響するか?</p> <p><b>AE 4.5/AE 6.5</b> : 仮説でカバーされない他の影響が生じる可能性があるか? (標的物質・参照物質の毒性プロファイルが他の機序を示唆するか? また、他の機序による影響が生じる用量はリードアクロスの正当化において十分に説明されているか?)</p>	<p><b>AE 4.3</b> (AE 3.3 と類似) :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>共通物質の生物学的標的への曝露が予測可能な方法で変化することが示されているか?</li> <li>評価対象の性状とカテゴリー内の順番を定義する独立変数の間にある一定のパターンに基づく予測か? あるいはカテゴリー内のワーストケースに基づく予測か?</li> <li>予測対象の特性の予測に使用されたアプローチ (一定のパターンまたはワーストケースに基づく) が、カテゴリー仮説における共通のメカニズムと一致しているか?</li> </ul> <p><b>AE 6.3</b> : 予測対象とする特性に関して、共通のメカニズムに基づき、標的物質と参照物質に同じ定量的結果をもたらすか?</p>
		<p><b>シナリオ 6</b> : 異なる物質が質的に類似した影響をもつ (<b>定量的差異なし</b>)</p>	<p>カテゴリー内の複数の物質が構造的類似性による質的に類似した有害性を引き起こすが、<b>影響の強さに有為な定量的差が生じない。</b></p>		

添付資料 2 OECD ガイダンス案におけるリードアクロスの正当化に含まれ得る要素

要素		含まれ得る情報
化学的同一性	化学構造	<input type="checkbox"/> 全体的な構造の傾向、構造類似性 <input type="checkbox"/> 官能基/部分構造 <input type="checkbox"/> 炭素鎖 <input type="checkbox"/> 直鎖・分岐鎖 <input type="checkbox"/> 分岐の程度及び位置 <input type="checkbox"/> 環状か、芳香環か <input type="checkbox"/> 異性化 <input type="checkbox"/> 塩及び参照物質の親物質の関係性 <input type="checkbox"/> 純度/不純物
	組成	UVCB のように複数成分を含有する物質の場合、以下の組成に関する特性化を実施する <input type="checkbox"/> 特定の組成の範囲（例：一般的な範囲） <input type="checkbox"/> 製造に由来する情報として、原料、沸点範囲、酸価、炭素鎖長等
	不純物	<input type="checkbox"/> 有害性に影響を与え得る不純物
	官能基	<input type="checkbox"/> 特定のメカニズムに関連する官能基など
物理化学的性状/分子記述子		<input type="checkbox"/> <i>logPow</i> <input type="checkbox"/> <i>logKoa</i> <input type="checkbox"/> 対水溶解度 <input type="checkbox"/> 分子量・分子サイズ ( <i>Dmax</i> 等) <input type="checkbox"/> 蒸気圧 <input type="checkbox"/> ヘンリー定数 <input type="checkbox"/> 酸解離定数 <i>pKa</i> <input type="checkbox"/> <i>logD</i>
化学反応性（例：警告構造、 <i>in chemico</i> 試験）		<input type="checkbox"/> 警告構造の類似性（OECD Toolbox の Profiler など） <input type="checkbox"/> 官能基の類似性 <input type="checkbox"/> 二重結合の位置 <input type="checkbox"/> 反応性を有する以外の官能基 <input type="checkbox"/> （利用可能な場合） <i>in chemico</i> の結果
動態・ADME		<input type="checkbox"/> ADME 情報の適用性/分子量や <i>logPow</i> による影響 <input type="checkbox"/> 曝露経路、エンドポイントとの関係 <input type="checkbox"/> ADME データを得た生物種 <input type="checkbox"/> 経路間外挿
MoA/AOP		<input type="checkbox"/> ある毒性の MoA と類似の構造又は官能基と同じか <input type="checkbox"/> NAMs も利用可能
MIE/生物活性		<input type="checkbox"/> NAMs の利用（警告構造でカバーできない領域もカバーできる可能性）
他のエンドポイントの情報（生物種、投与経路含む）		
想定される曝露経路・曝露期間		
環境運命		

添付資料3 EFSA ガイダンス案における段階的ステップ及び各ステップの説明等

ステップ No.	ステップ名	目的及びステップの説明	関連するアクション	アウトプット
ステップ 1	問題の定式化	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 評価が目的とする内容を定義し、それを達成するために利用可能な選択肢を明確化する。</li> <li>- 標的物質の特定のエンドポイントにおけるデータのギャップを特定する。</li> <li>- データのギャップの穴埋めをする目的を定義する。</li> <li>- 規制の文脈及びその中で許容される不確実性のレベルについて説明する</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- データのギャップを分析し特定する：出発点は、標的物質が関心のあるエンドポイントに対して全くデータがないか、信頼できるデータがないことである。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 標的物質の特定のエンドポイントに対するデータのギャップが特定される。</li> <li>- 規制の文脈及びその中で許容される不確実性のレベルが定義される。</li> </ul>
ステップ 2	標的物質の特性化	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 標的物質に関する有害性情報及び対処が必要なデータのギャップ（リードアクロスに不足するデータ）を検討する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 物理化学的性状、TK 及び TD に関する、標的物質に関連する全ての情報を <i>in silico</i> 予測も含めて（データマトリックスに）収集・整理する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- データマトリックスに情報を整理する。</li> <li>- 得られたデータマトリックスの評価により、ステップ 3 で実施されるリードアクロス戦略と参照物質選定を導く最初のリードアクロス仮説が導出される。</li> </ul>
ステップ 3	参照物質の特定	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 標的物質に類似した候補となる参照物質を検索する</li> <li>- 検索戦略は構造の類似性だけでなく、官能基/反応性/代謝経路の共通性を含められる。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 検索戦略に従って参照物質を検索する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ステップ 4 での更なる評価のため、参照物質のリストを作成し、情報をデータマトリックスに整理する。</li> </ul>
ステップ 4	参照物質の評価	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 前のステップで特定された候補となる参照物質を評価することを目的とする。</li> <li>- 候補参照物質が標的物質とどの程度類似性または非類似性を持つか、またその違いが有害作用や効力に違いを引き起こす可能性があるかをよりよく理解する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 既存の <i>in vivo</i>、<i>in vitro</i>、<i>in silico</i> データを収集し文書化する。</li> <li>- 共通性/相違点を示す可能性のあるシグナルや警告を特定する。</li> <li>- 類似性/非類似性を評価する。</li> <li>- 利用可能なデータはその関連性と信頼性について評価されるべきである。</li> <li>- 参照物質の選定または非選定を科学的に正当化する。</li> <li>- 情報をデータマトリックスに組み込む。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- データマトリックスが更に充実される。</li> <li>- リードアクロス戦略に関する結論を導き出す。</li> <li>- ワークフローのステップ 5 に進むか、またはリードアクロス仮説を確認するために新たな情報を収集/生成する新しい反復を開始する（ステップ 2）。</li> </ul>
ステップ 5	データギャップの穴埋め	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 前のステップで収集された証拠に基づき、標的物質の関心のあるエンドポイントを予測するため、リードアクロスを支援するデータギャップ充填戦略を定義することを目的とする。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- リードアクロス予測のために、データ駆動型または専門家駆動型のプロセスを適用する。</li> <li>- データマトリックスを最終化する。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 結果は問題の定式化、例えば出発点や対象物質の特性に依存する。</li> </ul>
ステップ 6	不確実性評価	<ul style="list-style-type: none"> <li>- リードアクロスの要素（上記のステップ）の不確実性の分析。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 定性的及び/または半定量的な分析。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 不確実性は、標的物質の最終的な予測値/特性に関するものである。</li> <li>- 不確実性評価の結果が、リードアクロス戦略の不確実性を減らすことでさらに進めるか進める必要があるかを決定する。</li> <li>- 問題の定式化で定義した受け入れ可能な不確実性に基づいて許容できない場合は、さらなるデータ生成/収集が検討され、統合される可能性がある（ステップ 4）。</li> </ul>
n/a	結論及び文書化	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 目的は、所定の目的のために構造化された適切な文書を提供することである。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 報告書テンプレート作成に利用可能なツールがいくつかある。</li> </ul>

ステップ No.	ステップ名	目的及びステップの説明	関連するアクション	アウトプット
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- リードアクロスの結論を不確実性の記述とともに報告する。</li> <li>- リードアクロスのプロセス全体は明確に文書化され、再現可能でなければならない（戦略の根拠、科学的正当性、検索基準、検索した情報源等）。</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 特に注目すべきものには、異なる種類のデータに対応し、継続的な更新や調整を受ける</li> <li>- 非ガイドラインデータが使用される場合は、方法の記述が必要であり、方法の有効性と信頼性についての正当化とともに、不確実性の説明を提供する必要がある。</li> </ul>

添付資料4：データマトリクスのテンプレート例

項目		標的物質	参照物質-1	参照物質-X
評価対象物質のアイデンティティ	物質名			
	CAS No.			
	SMILES			
	構造			
	組成式			
	分子量			
	不純物			
	評価対象とするエンドポイントに影響するか？			
UVCBの場合	組成			
	製造方法			
	製造方法等により規定される特性	例：炭素範囲、沸点の範囲等		
構造特性	官能基の種類			
	異性化の有無（ある場合その構造）			
	主骨格			
化学反応性		OECD ToolboxのProfiler等に基づく	OECD ToolboxのProfiler等に基づく	OECD ToolboxのProfiler等に基づく
物理化学的性状	融点	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]
	沸点	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]
	対水溶解度	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]
	logKow	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]
	蒸気圧	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]
	Henry定数	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]
	pKa	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]
その他	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	[実測か予測か][方法]	
環境中運命	安定性	空気中、水溶液中(pH)、光 [実測か予測か][方法][信頼性]	空気中、水溶液中(pH)、光 [実測か予測か][方法][信頼性]	空気中、水溶液中(pH)、光 [実測か予測か][方法][信頼性]
	生分解性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	生物蓄積性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
ADME・動態	吸収	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	分布	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	代謝	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	排泄	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	動態	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
MoA/AOP	MIE [イベント]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	KE-1 [イベント]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	KE-2 [イベント]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	KE-...[イベント]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
その他の生物活性データ		[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
既存毒性データ	急性毒性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	眼刺激/皮膚刺激性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	皮膚感作性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]

	遺伝毒性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	反復投与毒性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	生殖・発生毒性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	発がん性	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
	その他	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]	[実測か予測か][方法][信頼性]
評価に必要な場合、曝露シナリオ				
その他				

- 削減可能と判断された情報項目は削減可能
- 方法には、公定法の種類/番号、試験実施年（ガイドラインが改訂され、プロトコルが変更されている場合もあるため）GLP か否かを記載、あるいは、引用文献、URL を付与する。
- 信頼性には、Klimisch コードを記載
- 情報が入手できない場合は、「情報なし」を明示する。
- ひとつの項目に複数のデータがある場合、データタイプ (*in silico/in vitro/in vivo*) や試験期間、生物種等に応じて、分かり易く整理する。

添付資料5：リードアクロス結果の報告テンプレート

		正当化	不確実性評価の観点、質問のまとめ	不確実性評価 (不確実性の要因を特定)	評価全体への影響の 大きさ	不確実性ランク
問題の定式化：	リードアクロス結果の評価目的での利用に対する不確実性		<ul style="list-style-type: none"> <li>リードアクロス結果の利用目的の意図が明確に定義されているか？</li> <li>穴埋めするエンドポイントは明示されているか？</li> <li>定義された利用目的において、許容できる不確実性のレベルが適切に定義されているか。</li> </ul>			低./中/高
標的物質	適切な識別ができていますか		<ul style="list-style-type: none"> <li>標的物質は明確に特定され、明確に定義されているか（例：構造、光学異性、組成等）？</li> <li>含有しうる不純物が特定されているか？</li> </ul>			
参照物質	適切な識別ができていますか		<ul style="list-style-type: none"> <li>参照物質は明確に特定され、明確に定義されているか（例：構造、光学異性、組成等）？</li> <li>含有しうる不純物が特定されているか？</li> <li>参照物質は複数あるか？1物質のみか？</li> </ul>			
	DB・検索条件/網羅性		<ul style="list-style-type: none"> <li>類似物質探索に使用したデータベースは質、網羅性の観点で適切か？</li> <li>使用した検索条件、類似物質選定条件は適切か？</li> <li>毒性情報は十分に探索されているか？</li> </ul>			
	リードアクロスに使用したデータ品質（※問題の定式化で定義されたレベルの品質か？）		<ul style="list-style-type: none"> <li>類推に使用される毒性データは、問題の定式化で定義された品質を満たし、標的エンドポイントに適しているか？</li> </ul>			
(カテゴリーの場合)カテゴリーの定義			<ul style="list-style-type: none"> <li>アナログまたはカテゴリーの適用領域が適切に定義されているか？</li> </ul>			
類似性/ 相違*	(1) 構造/反応性	データの品質・入手性	<ul style="list-style-type: none"> <li>データの情報源が明確で、十分な質があるか？</li> <li>データには一貫性、一貫した傾向があるか？</li> <li>相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？</li> </ul>			
		(複数のデータがある場合) 個別物質内での一貫性				
		物質間（類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー）での一貫性				
		相違に関する説明				
	(2) 代謝	データの品質・入手性	<ul style="list-style-type: none"> <li>データの情報源が明確で、十分な質があるか？</li> <li>データには一貫性、一貫した傾向があるか？</li> <li>相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？</li> </ul>			
		(複数のデータがある場合) 個別物質内での一貫性				
		物質間（類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー）での一貫性				
		相違に関する説明				
	データの品質・入手性					

(3) 物理化学的性状	(複数のデータがある場合) 個別物質内での一貫性		<ul style="list-style-type: none"> <li>データの情報源が明確で、十分な質があるか？</li> <li>データには一貫性、一貫した傾向があるか？</li> <li>相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？</li> </ul>			
	物質間 (類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー) での一貫性					
(4) 吸収、分布、排せつ/動態	相違に関する説明					
	データの品質・入手性					
(4) 吸収、分布、排せつ/動態	(複数のデータがある場合) 個別物質内での一貫性		<ul style="list-style-type: none"> <li>データの情報源が明確で、十分な質があるか？</li> <li>データには一貫性、一貫した傾向があるか？</li> <li>相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？</li> </ul>			
	物質間 (類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー) での一貫性					
(5) MoA/AOP、その他生物活性	相違に関する説明					
	MoA/AOP の情報の確からしさ					
(5) MoA/AOP、その他生物活性	MoA/AOP に係る情報を提供する方法論の適正		<ul style="list-style-type: none"> <li>標的エンドポイントの毒性を説明できる、適切な MoA/AOP が明確に定義されているか？</li> <li>そのもっともらしさは評価目的に照らして適切か？</li> <li>MoA/AOP に係る情報を提供する試験法やデータがあるか？</li> <li>それらは、毒性を引き起こす可能性について十分説明できるものか？</li> </ul>			
	データの品質・入手性					
(5) MoA/AOP、その他生物活性	(複数のデータがある場合) 個別物質内での一貫性		<ul style="list-style-type: none"> <li>データの情報源が明確で、十分な質があるか？</li> <li>データには一貫性、一貫した傾向があるか？</li> <li>相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？</li> </ul>			
	物質間 (類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー) での一貫性					
(6) 毒性プロファイル	相違に関する説明					
	データの品質・入手性					
(6) 毒性プロファイル	(複数のデータがある場合) 個別物質内での一貫性		<ul style="list-style-type: none"> <li>データの情報源が明確で、十分な質があるか？</li> <li>データには一貫性、一貫した傾向があるか (曝露期間の違いに基づく差異、毒性の強さ、標的性含む)？</li> <li>相違がある場合、その相違は、類推を行う上でどのような影響を与えるか？また、その影響は受け入れ可能か？</li> </ul>			
	物質間 (類似物質及び参照物質/カテゴリーメンバー) での一貫性					
(6) 毒性プロファイル	相違に関する説明					
	データの品質・入手性					
類似性に関する全体としての評価			<ul style="list-style-type: none"> <li>類似性項目(1)~(6)のうち、類似性の説明に使用した項目について、全て適切に正当化されているか？</li> <li>それらの項目間の内容に一貫性があるか？ (例：特定の官能基による毒性減弱が示唆されている場合、動物試験で毒性の減弱が見られている等)</li> <li>全体として、参照物質を類推に用いることは適切か？</li> </ul>			

類似性/相違項目全体として評価対象エンドポイントへの影響/仮説（類推を可能とする説明）に対する充足度		<ul style="list-style-type: none"> <li>・問題の定式化で定義した目的を満たすためのリードアクロスとして、標的とする毒性エンドポイントを類推する上で十分な仮説となっているか？（仮説に含まれる情報の例：構造との関連。代謝が関与する場合、速さや代謝物。既知の場合、MoA/AOP。これらと標的エンドポイントとの関連性）</li> <li>・これらの仮説に対して十分なデータに基づく正当化が行われているか？</li> <li>・橋渡しデータの種類や密度は、リードアクロスに類推を十分に支持しているか？</li> </ul>			
データギャップの穴埋め方法		<ul style="list-style-type: none"> <li>・リードアクロス・アプローチ（例：アナログ、カテゴリー）が明確に報告されているか？</li> <li>・標的物質と参照物質は、定義された適用範囲内に収まっているか。</li> <li>・最も保守的な結果が採用されていない場合、なぜそうでないかを説明できる堅牢な論拠があるか？</li> </ul>			
データギャップの穴埋め方法の穴埋めに関する妥当性カテゴリーの場合、データの数、分布の不確実性を含む		<ul style="list-style-type: none"> <li>・複数物質のデータがある場合、同じ毒性を示す一貫性が示されているか？</li> <li>・既知のメカニズムがある毒性エンドポイントを類推する場合、利用可能な情報は標的毒性エンドポイントでの影響の有無を十分に説明しているか？不足するデータがある場合、それはどの程度か？</li> <li>・弱い毒性あるいは毒性がないことを示す類推である場合、そのことを示す根拠が十分にあるか？</li> </ul>			
専門家判断		<ul style="list-style-type: none"> <li>・専門家判断が行われた内容が説明されているか？</li> </ul>			
標準的要素の包含		<ul style="list-style-type: none"> <li>・必要な標準的要素が適切に包含されているか？</li> </ul>			
データマトリクス		<ul style="list-style-type: none"> <li>・適切なデータマトリクスが整備されているか？</li> </ul>			
透明性があり、再現可能な文書化か		<ul style="list-style-type: none"> <li>・一貫性があり、目的に適した文書が行われているか？</li> </ul>			
結論：					

\*：(1)~(6) の項目のうち、実施したリードアクロスに用いた項目について評価する。

## 2 研究全体の成果、考察及び結論

個別課題 1 では、経済協力開発機構 (OECD)、欧州食品安全機関 (EFSA)、欧州化学機関 (ECHA) 及び米国環境保護庁 (EPA) などから公表されたガイダンス文書の調査に引き続き、OECD のグループニングガイダンス改訂版及び EFSA リードアクロスガイダンスの作成中の草稿、ECHA RAAF について調査を行い、関連する論文も参照しながら、リードアクロスの手順や不確実性評価方法について整理した。

個別課題 2 では、OECD が主導した高生産量化学物質 (HPV) プログラム、EU の化学物質規制 (REACH)、OECD Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA, 試験と評価のための統合的アプローチ) Case Studies Project などでのリードアクロス活用事例を解析し、特に、リードアクロスの仮説、類似物質選定における類似性の考え方、リードアクロスの正当化について詳細に整理した。また、食品安全委員会で扱う品目のうち、リードアクロスが適用可能もしくは必要な分野を挙げた。

個別課題 3 では、NAM (New Approach Method, 新たなアプローチによる評価方法) の開発状況の調査を行い整理した。次いでトキシコキネティクス (TK) に関連するいくつかの *in vitro* 試験の *in silico* 予測モデルを構築し、*in vivo* 毒性試験の NOEL (NOAEL) 値との相関を検討した結果、有用性が示唆された腸管吸収性 NAM (Caco-2 透過性予測) モデルについて、精度を向上させ、*in vitro* Caco-2 透過性試験と比較した。予測値、実測値いずれも NOEL (NOAEL) 値との同様の相関傾向が見られ、Caco-2 透過性予測の TK 関連 NAM としての有用性が示された。一方、Munro らにより提唱された TTC 値導出に用いられた化合物群について *in silico* Caco-2 透過性予測値と NOEL 値の分布から、Caco-2 透過性予測値から導出される連続的 TTC 値設定の可能性が示された。また、公開されている TK 関連パラメータ予測ツールで得られたパラメータにも NOEL (NOAEL) 値と相関の良いものが複数あり、NAM として有用と考えられる。

また、トキシコダイナミクス (TD) に関連する NAM として、AOP (Adverse Outcome Pathway, 有害性発現経路) のキーイベントの *in silico* モデル (アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害予測モデル) を複数構築し、AChE 阻害活性を持つ物質が多いことで知られる有機リン系、カルバメート系の物質を対象に、モデルの能評価を行った。さらにこれらの複数のモデルを組み合わせたフローにより AChE 阻害を精度よく予測できることを示した。TD 関連 NAM の構築では肝毒性と神経毒性の毒性機序と関連する *in vitro* 試験を実施し、ラット反復投与毒性試験結果の定量的な関連性を解析した結果、肝毒性に関しては定量的な相関は限られた物質群においてのみ認められた。一方、神経毒性と関連する *in vitro* AChE 阻害活性は反復投与毒性データベースより得た LOAEL 値と定量的な関係性が明らかとなった。

そこで、AChE 阻害活性に焦点を当て、本研究で構築した TD 関連 *in silico* モデル、TD 関連 *in vitro* 試験、TK 関連 *in silico* モデルを NAM として活用し、リードアクロスのケーススタディを行い、留意点を整理した。

個別課題 4 では 1 から 3 で実施した最新の状況整理および研究成果を統合することにより、今後の食品健康影響評価におけるリードアクロスの必要性和適用可能範囲、リードアクロス実施にあたっての前提条件・前提理解、実施手順に含めるべき標準的要素について考察し、実施者と評価者の両視点を意識して実際的な手順と留意点、さらに、リードアクロスの不確実性要素とその評価方法を提案する文書を作成し、別添した。

### III 本研究を基にした論文等

#### 1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

なし

#### 2 本研究を基にした学会発表の実績

- 芝田南美, 保坂卓臣, 志津怜太, 吉成浩一. 農薬のラット反復投与毒性試験結果を利用した CYP1A1 阻害活性と肝毒性関連所見の関連性解析. 第 51 回日本毒性学会学術年会 (福岡, 2024.7.3)
- Shibata M, Hosaka T, Shizu R, Yoshinari K. Analysis of the relationship between cytochrome P450 inhibition and hepatotoxicity using the results of rat repeated-dose toxicity studies of pesticides. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2024) (Copenhagen, Denmark, 2024.9.10)
- Ono A, Akahori Y, Ambe K, Yoshinari K, Yamada T. Evaluation of the Caco-2 permeability assay as NAM, New approach methodologies, for *in vivo* repeated dose toxicity NOAEL assessment. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2024) (Copenhagen, Denmark, 2024.9.11)
- 早川知里, 安部賀央里, 山田隆志, 吉成浩一, 頭金正博. 機械学習によるヒトアセチルコリンエステラーゼ活性阻害の *in silico* 予測モデルの開発. 日本動物実験代替法学会第 37 回大会 (宇都宮, 2024.11.29-12.1)
- 山田隆志, 赤堀有美. リードアクロス: 現状、課題、将来への展望. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (沖縄, 2025.7.4)
- 小野 敦. 反復投与毒性リードアクロスのための NAMs としてのトキシコキネティクス関連パラメータの活用. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (沖縄, 2025.7.4)
- 吉成浩一. 全身毒性評価のためのインシリコ・インビトロ手法を統合したリードアクロス手法の開発. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (沖縄, 2025.7.4)
- 早川知里, 山田隆志, 吉成浩一, 安部賀央里. ヒトアセチルコリンエステラーゼ活性阻害の半定量的予測のための機械学習モデルの開発. 第 52 回日本毒性学会学術年会 (沖縄, 2025.7.2-7.4)

#### 3 特許権等の出願・申請等の状況

該当しない

#### 4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

該当しない

#### 5 その他 (各種受賞、プレスリリース等)

該当しない

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
<p>(1) リードアクロスの国際ガイダンス、総説に関する最新の情報を収集・解析して、食品健康影響評価における活用を想定した基本手順と留意点を整理し、提案する。</p>	<p>5</p>	<p>OECD グルーピングガイダンスの改定、EFSA リードアクロスガイダンスの作成の検討状況など最新の国際動向を踏まえて、リードアクロスの手順を整理し、本研究事業としての実施手順と留意点を提案した。不確実性の評価項目および評価のための質問を整理した。類似物質の特定における信頼性強化、リードアクロスの不確実性の低減のために NAM の活用を位置づけた。以上より当初の目的は十分に達成されたと考える。しかし、OECD、EFSA でのガイダンスの最終化は遅れ、令和 7 年 7 月頃に完成版が公開される予定とされている。本研究事業終了後も最新動向をフォローし、執筆予定の総説において更新したいと考えている。</p>
<p>(2) 海外リスク評価機関におけるリードアクロスの活用状況と最新の研究事例を収集し、リードアクロスを用いた安全性評価の現状把握を行う。それらをもとに、食品健康評価における適用可能領域を同定し、提案する。</p>	<p>5</p>	<p>リスク評価機関におけるリードアクロスの主な活用事例を特定し、リードアクロスの結果の利用目的、グルーピングの妥当性説明に利用された要素を整理した。海外でのリードアクロスの活用事例、行政的必要性、技術的可能性などをもとに食品健康評価における適用可能領域を取りまとめた。以上より、当初の目的は十分に達成されたと考える。</p>
<p>(3) 類似物質の同定・評価とリードアクロスの正当化を強化する NAM について、開発状況を調査し、利用可能性について整理する。並行して、その開発に資する基礎研究を行い、NAM の活用方法の確立に寄与する。</p>	<p>5</p>	<p>NAMの開発状況を調査・整理した。TK関連では、腸管吸収性NAM (Caco-2透過性予測) モデルの精度を向上させ、<i>in vitro</i> Caco-2透過性試験と比較し、NOEL/NOAEL値との相関からその有用性を示した。TD関連では、AChE阻害予測モデルを複数構築・評価し、組み合わせることで予測精度が向上した。肝毒性に関する<i>in vitro</i>と<i>in vivo</i>との定量的相関は限定的だったが、神経毒性では<i>in vitro</i> AChE阻害活性とLOAEL値との間に定量的な関係が明らかになった。これらのNAMを活用したリードアクロスのケーススタディを行い、留意点を整理できた。ただ、活用例も限定的であることから今後の継続研究が必要である。</p>

食品健康影響評価へのリードアクロスの適用可能範囲、実際的な手順、活用にあたっての留意点、予測結果の受入促進へ向けた段階的なアプローチ、今後整備すべき評価支援体制などについて考察し、提案する。	5	達成目標では明示していないが、上記3項目において得られた知見を統合し、食品健康影響評価にリードアクロスを活用する際の考え方を包括的かつ体系的にとりまとめ、提案した。
---	---	--

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

## 2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	当初計画はほぼ変更はなかった。OECD、EFS Aでのガイダンスの公開は遅れたが、両ガイダンス案のレビューおよびコメントングに参加・貢献して最新動向を把握し、本研究事業での調査・提案に反映させた。TD関連のNAMの検討は、当初計画に無理があり実施できないところがあったが、代わりにリードアクロスのケーススタディを充実化させることにより、全体として目標は達成することができた。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究で実施するリードアクロスの最新の国際動向の把握、食品関連物質のリスク評価における適用可能範囲の同定、リードアクロスの正当性を強化するためのNAMの開発とその利用方法の検討により得られた成果は、食品安全委員会の食品健康影響評価へリードアクロスの導入へ向けて議論を開始するときの基盤となる。
<p>総合コメント</p> <p>本研究から得られる成果は、食品関連物質のリスク評価において活用が期待されるリードアクロスについて、国際的な調和を考慮し、諸外国の機関で提案・実施されている評価の手法や考え方を参照しながら、今後の食品安全委員会における使用に即した個別の実践的なガイダンスの作成に寄与するものである。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。  
本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

(別添1)

## 研究成果の概要 (和文)

国際機関や各国規制機関によるガイダンス文書を調査し、OECD、米国環境保護庁、欧州化学機関のリードアクロスガイダンスやフレームワークを基に手順や不確実性評価法を整理した。

リードアクロス活用事例を解析し、特にリードアクロスの仮説、物質の類似性の考え方、正当化について整理した。また食品健康影響評価でリードアクロスが適用可能又は必要な分野を挙げた。

リードアクロス関連技術 NAM (新たなアプローチによる評価法) の調査と開発を行った。腸管吸収性を表す Caco-2 透過性の *in silico* 予測モデルと *in vitro* 試験に動物試験の無毒性量との相関が見られ、そのトキシコキネティクス (TK) 関連 NAM としての有用性を示した。

またトキシコダイナミクス (TD) 関連 NAM として、神経毒性機序と関連するアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害活性の *in silico* 予測モデルを構築した。また *in vitro* AChE 阻害活性と最小毒性量との定量的な関係性を示した。

本研究で構築した各種 NAM を活用し AChE 阻害活性を対象にリードアクロスのケーススタディを行い、留意点を整理した。

上記の成果を統合し、食品健康影響評価におけるリードアクロスの必要性和適用可能範囲、実施の際の前提や標準的要素を考察し、実施者と評価者の両視点を意識し手順と留意点、不確実性要素とその評価法を提案する文書を作成した。

(別添2)

### 研究成果の概要 (英文)

Title of research project	A Study on the application and reliability evaluation of the read-across method for the risk assessment of food-related chemical substances
Research project number	JPCAFSC20232301
Research period	FY 2023 – 2024
Name of principal research investigator (PI)	Takashi Yamada

#### Abstract/Summary

We investigated guidance documents from international organizations and national regulatory agencies, and organized procedures of read-across and methods for uncertainty assessment based on read-across guidance and frameworks from the OECD, the U.S. Environmental Protection Agency, and the European Chemicals Agency.

We analyzed read-across use cases in various organizations, and summarized essential points in read-across hypothesis, the concept of substance similarity, and justification. We also listed areas in which read-across is applicable or necessary in food health risk assessment.

We surveyed new approach methodologies (NAM), known as useful for read-across, and also developed some NAMs. We observed a correlation between the *in silico* prediction or *in vitro* test of Caco-2 permeability, known as an index for intestinal absorption, and the “no-observed-(adverse)-effect level” in animal tests, which demonstrates its usefulness as a toxicokinetics (TK)-related NAM.

As a toxicodynamics (TD)-related NAM, we developed an *in silico* prediction model for acetylcholinesterase (AChE) inhibition activity, which is related to the mechanism of neurotoxicity. We also illustrated a quantitative relationship between our *in vitro* AChE inhibition test results and the “lowest observed adverse effect level”.

Using various NAMs developed in this study, we conducted a read-across case studies targeting AChE inhibition activity and summarized the points to note for read-across.

By integrating the above findings, we discussed the necessity and scope of applicability of read-across in the food health risk assessment, as well as the assumptions and standard components for read-across implementation. Then we drew up a document proposing read-across procedures, points to note, uncertainties and their assessment methods, taking into account both perspectives of user/conductor and assessor/regulator sides.

#### (英文概要の和訳)

国際機関や各国規制機関によるガイダンス文書を調査し、OECD、米国環境保護庁、欧州化学機関のリードアクロスガイダンスやフレームワークを基に手順や不確実性評価法を整理した。

リードアクロス活用事例を解析し、特にリードアクロスの仮説、物質の類似性の考え方、正当化について整理した。また食品健康影響評価でリードアクロスが適用可能又は必要な分野を挙げた。

リードアクロス関連技術 NAM (新たなアプローチによる評価法) の調査と開発を行った。腸管吸収性を表す Caco-2 透過性の *in silico* 予測モデルと *in vitro* 試験に動物試験の無毒性量との相関が見られ、そのトキシコキネティクス (TK) 関連 NAM としての有用性を示した。

またトキシコダイナミクス (TD) 関連 NAM として、神経毒性機序と関連するアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害活性の *in silico* 予測モデルを構築した。また *in vitro* AChE 阻害活性と最小毒性量との定量的な関係性を示した。

本研究で構築した各種 NAM を活用し AChE 阻害活性を対象にリードアクロスのケーススタディを

行い、留意点を整理した。

上記の成果を統合し、食品健康影響評価におけるリードアクロスの必要性和適用可能範囲、実施の際の前提や標準的要素を考察し、実施者と評価者の両視点を意識し手順と留意点、不確実性要素とその評価法を提案する文書を作成した。

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose.

All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

### 1. List of papers published on the basis of this research

None

### 2. List of presentations based on this research

- Shibata M, Hosaka T, Shizu R, Yoshinari K. Association analysis of CYP1A1 inhibition with hepatotoxicity using the results of rat repeated-dose toxicity study of pesticides. The 51st Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology, Fukuoka, Japan, 2024.7.3.
- Shibata M, Hosaka T, Shizu R, Yoshinari K. Analysis of the relationship between cytochrome P450 inhibition and hepatotoxicity using the results of rat repeated-dose toxicity studies of pesticides. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2024) (Copenhagen, Denmark, 2024.9.10)
- Ono A, Akahori Y, Ambe K, Yoshinari K, Yamada T. Evaluation of the Caco-2 permeability assay as NAM, New approach methodologies, for *in vivo* repeated dose toxicity NOAEL assessment. 58th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2024) (Copenhagen, Denmark, 2024.9.11)
- Hayakawa C, Ambe K, Yamada T, Yoshinari K, Tohkin M. Development of the *in silico* prediction model of human acetylcholinesterase inhibition activity with machine learning. The 37th annual meeting of the Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments (Utsunomiya, Japan, 2024.11.29-12.1)
- Yamada T, and Akahori Y. Read-across: Current status, issues, and future prospects. The 52nd annual meeting of the Japanese Society of Toxicology (Okinawa, Japan, 2025.7.4)
- Ono A. Utilizing toxicokinetic parameters as NAMs for read-across of repeated-dose toxicity. The 52nd annual meeting of the Japanese Society of Toxicology (Okinawa, Japan, 2025.7.4)
- Yoshinari K. Development of a read-across methodology utilizing *in silico* and *in vitro* techniques to predict systemic toxicity. The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology, Okinawa, Japan, 2025.7.4.
- Hayakawa C, Yamada T, Yoshinari K, Ambe K. Development of a machine learning model for semi-quantitative prediction of human acetylcholinesterase activity inhibition. The 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicology (Okinawa, Japan, 2025.7.2-7.4)

### 3. The number and summary of patents and patent applications

None

4 . Others (awards, press releases, software and database construction)

None