

平成30年度～令和元年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

（※研究全体の期間（初年度及び2年目以降）について記載する。）

研究課題名 （研究項目名）	食品に非意図的に混入する微量化学物質のリスク評価への <i>in silico</i> 評価手法の適用に関する研究（課題番号：1803） （3 新たなリスク評価方法等の確立 （1） <i>in silico</i> 手法を用いた評価方法の確立に関する研究）
主任研究者	研究者名：小野 敦 所属機関：国立大学法人 岡山大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

平成30年度～令和元年度（2年間）

2 研究目的

食品安全委員会でリスク評価の対象とする化学物質のうち非意図的に食品に含まれる可能性のある不純物や器具容器からの溶出物などについては、十分な毒性試験情報が得られていない、もしくはその量自体が微量であり試験実施が困難で評価が難しい化学物質も多くある。近年、そうした評価が困難な化学物質のリスク評価において、これまでに蓄積されてきた様々な化学物質の毒性試験情報をもとに、毒性情報の得られていない評価対象物質について化学構造の特徴や化学構造等が類似した化学物質の毒性情報から毒性を評価する *in silico* 評価手法のリスク評価への適用の検討が欧米のリスク評価機関を中心として進められてきており、医薬品不純物の遺伝毒性評価など一部で既に実用化されている。それらの *in silico* 評価手法は、食品安全委員会におけるリスク評価においても、非常に有用であると考えられる。

本研究では、食品安全委員会でのリスク評価における *in silico* 評価手法の適用に向けた検証を行うこと目的として、まずは非意図的に食品に微量に含まれる化学物質の例として器具容器包装関連物質を対象に、これまでに有用性が示唆されている *in silico* 評価手法として、変異原性について、医薬品 ICH M7 で示された医薬品不純物の変異原性評価手法を、*in vivo* 反復投与毒性については、工業用化学物質の評価への適用が検討されているカテゴリーアプローチや欧州における食品香料等の毒性学的閾値設定の根拠として利用されている Cramer 毒性ルール及び評価支援ツールなどを用いた検証を行うとともに、本研究独自の評価手法についてもあわせて検証を行い、各手法の信頼性や適用限界、利用にあたっての注意点や今後、整備すべきデータベース、支援ツール及び評価支援体制など、さらには食安委で評価対象とする器具容器包装関連化学物質以外の様々な化学物質の評価への適用性等について整理して提案する。

3 研究体制 （※研究項目ごと個別課題ごとに研究担当者及び所属機関名を記入するこ

と。)

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
器具容器包装関連物質情報を検証用データとして用いた変異原性および反復毒性の <i>in silico</i> 評価手法適用の検討	1) <i>in silico</i> 評価のためのデータベース登録項目の検討と検証用データとしての器具容器包装関連物質の毒性情報の収集と整理	山田 隆志（国立医薬品食品衛生研究所）
	2) 検証用データへの <i>in silico</i> 変異原性評価手法の適用の検討	本間 正充、杉山 圭一（国立医薬品食品衛生研究所）
	3) 検証用データへの反復投与毒性の <i>in silico</i> 評価アプローチ適用性の検討	小野 敦（岡山大学）、山田 隆志（国立医薬品食品衛生研究所）
食品関連化学物質のリスク評価における <i>in silico</i> 評価手法の適用のあり方の提案		小野 敦（岡山大学）、山田 隆志、本間 正充、杉山 圭一（国立医薬品食品衛生研究所）

4 倫理面への配慮について

本研究では、人を対象とした研究や遺伝子解析、疫学研究及び動物試験を実施する予定はない。

II 研究内容及び成果等

（1）研究項目名：器具容器包装関連物質情報を検証用データとして用いた変異原性および反復毒性の *in silico* 評価手法適用の検討

1) 個別課題名：*in silico* 評価のためのデータベース登録項目の検討と検証用データとしての器具容器包装関連物質の毒性情報の収集と整理（研究担当者：山田 隆志（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所））

食品接触用プラスチック材料製品に関する欧州委員会規則 No. 10/2011 に掲載されている器具容器包装関連物質（EU 物質）のうち、国衛研で平成 28 年度に毒性情報の調査・文献収集を行った 822 物質について、CAS、物質名称、SMILES をもとに物質リストを整理した。

In vitro 変異原性については、主に Ames 試験結果について試験菌株、S9 の有無、試験結果、レファレンス情報を以下のように整理した。822 物質のうち、435 物質について Ames 変異原性データを得た。435 物質中 226 物質については、既に OECD QSAR Toolbox に Ames 変

異原性データが掲載されていたので、これらを OECD QSAR Toolbox から取り出して精査し、OECD TG471 で定められた 5 菌株が揃っているかを確認した。226 物質のうち、菌株情報が記載されていなかったデータや、TG471 で定められていない菌株を使った試験のデータが 10 物質あった。残りの 216 物質のうち、TG471 で定められた 5 菌株が揃っていたデータは 56 物質あり、160 物質については菌株不足であった。菌株不足の 160 物質のうち、96 物質について、国衛研で調査・文献収集を行った毒性情報から 5 菌株のデータを補完できた。以上国衛研での EU 物質の毒性情報の調査・文献収集の結果に基づいたデータ精査により、OECD QSAR Toolbox に既に収載されている Ames データを補完できた物質と、Toolbox に未収載で当該調査によりあらたに Ames データを収集できた物質を整理した（付録 1）。

反復投与毒性試験について、収集した試験データの信頼性を評価し、OECD のテストガイドライン試験またはそれに準じる試験を選抜した。このうち、これまでに HESS 及び OECD QSAR Toolbox においてデータベース化されていないのは 132 試験（107 物質）であり、これらをデータベース化の対象とした。動物種、系統、雌雄、投与量、被験物質投与による毒性所見及び各所見ごとの LO(A)EL/NO(A)EL 値、レファレンス情報を、平成 28～29 年度の食品健康影響評価技術研究（課題番号 1602）において構築された HESS 及び QSAR Toolbox と互換性のあるデータ形式で整備を行った。これまで、反復投与毒性のデータベース化の作業は、①毒性専門家による試験レポートの精査に基づく毒性徴候表の作成、②データ入力者による毒性徴候表情報のデータシートへの入力、③毒性専門家による入力データのチェックの 3 段階の作業を二人で行っていた。試験レポートの病理・一般状態の所見の表記にはゆれがあり、②のデータ入力と③の入力データのチェックの際に手間を要していた。そこで、本項目では、過去に作成した毒性徴候表に記載されている試験報告書の病理・一般状態の所見とデータベースの病理・一般状態のデータ項目と紐づけを行うとともに、その他の数百の検査項目も併せて毒性徴候表と毒性データシートを機能的にリンクさせた。毒性専門家が毒性徴候表を作成すると、毒性データの入力作業が自動的に行われるようになり、①の作業のみで、②と③の作業を省力化できるようになった。以上、毒性データベースの拡充作業を効率的に進めていく基盤を整備することができた。データベース化した反復投与毒性の物質と試験のリストを付録 2 に示す。

付録 1

本研究事業で整理した Ames 変異原性試験物質のリスト

分類	CAS No.	Chemical Name
菌株情報の記載がなかった、または TG471 で定められていない菌株を使った試験のデータ (10 物質)	75-38-7	vinylidene fluoride
	100-52-7	benzaldehyde
	100-97-0	hexamethylenetetramine
	112-27-6	triethyleneglycol
	115-07-1	propylene
	119-36-8	salicylic acid, methyl ester
	461-58-5	dicyanodiamide
	818-61-1	acrylic acid, monoester with ethyleneglycol
	3290-92-4	1,1,1-trimethylolpropane trimethacrylate
	7456-68-0	4,4'-oxybis(benzenesulphonyl azide)
	56-81-5	glycerol
	60-00-4	ethylenediaminetetraacetic acid
	64-19-7	acetic acid
	65-85-0	benzoic acid
TG471 で定められた 5 菌株が揃っていたデータ (56 物質)	67-64-1	acetone
	67-68-5	dimethyl sulphoxide

分類		CAS No.	Chemical Name
		80-09-1	4,4'-dihydroxydiphenyl sulphone
		88-99-3	o-phthalic acid
		91-76-9	2,4-diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine
		92-88-6	4,4'-dihydroxybiphenyl
		96-69-5	4,4'-thiobis(6-tert-butyl-3-methylphenol)
		97-88-1	methacrylic acid, butyl ester
		98-83-9	α -methylstyrene
		99-96-7	p-hydroxybenzoic acid
		100-21-0	terephthalic acid
		100-51-6	benzyl alcohol
		103-90-2	N-(4-hydroxyphenyl) acetamide
		106-91-2	methacrylic acid, 2,3-epoxypropyl ester
		107-92-6	butyric acid
		108-24-7	acetic anhydride
		108-31-6	maleic anhydride
		108-39-4	m-cresol
		108-95-2	phenol
		110-16-7	maleic acid
		110-17-8	fumaric acid
		110-63-4	1,4-butanediol
		111-46-6	diethyleneglycol
		111-87-5	1-octanol
		112-30-1	1-decanol
		115-11-7	isobutene
		115-77-5	pentaerythritol
		117-81-7	phthalic acid, bis(2-ethylhexyl) ester
		119-47-1	2,2'-methylene bis(4-methyl-6-tert-butylphenol)
		120-61-6	terephthalic acid, dimethyl ester
		120-80-9	1,2-dihydroxybenzene
		121-79-9	gallic acid, propyl ester
		126-30-7	2,2-dimethyl-1,3-propanediol
		126-98-7	methacrylonitrile
		137-66-6	ascorbyl palmitate
		141-78-6	acetic acid, ethyl ester
		144-62-7	oxalic acid
		552-30-7	trimellitic anhydride
		585-07-9	methacrylic acid, tert-butyl ester
		599-64-4	4-cumylphenol
		822-06-0	hexamethylene diisocyanate
		868-77-9	methacrylic acid, monoester with ethyleneglycol
		872-50-4	N-methylpyrrolidone
		924-42-5	N-methylolacrylamide
		1241-94-7	phosphoric acid, diphenyl 2-ethylhexyl ester
		1302-78-9	bentonite
		1477-55-0	1,3-benzenedimethanamine
		7632-00-0	sodium nitrite
		13463-67-7	titanium dioxide
		14807-96-6	talc
		16219-75-3	5-ethylidenebicyclo[2,2,1] hept-2-ene
		25013-16-5	tert-butyl-4-hydroxyanisole
菌株不足だったデータ (160 物質)	国衛研で調査・文献収 集を行った毒性情報から 5 菌株のデータを補完できた (96 物質)	50-70-4	sorbitol
		57-10-3	palmitic acid
		57-11-4	stearic acid
		57-13-6	urea
		69-72-7	salicylic acid
		75-35-4	vinylidene chloride
		75-37-6	1,1-difluoroethane
		75-45-6	chlorodifluoromethane
		77-99-6	1,1,1-trimethylolpropane
		78-08-0	vinyltriethoxysilane
		78-79-5	2-methyl-1,3-butadiene
		79-09-4	propionic acid
		79-39-0	methacrylamide
		79-41-4	methacrylic acid
		80-05-7	2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane
		80-08-0	4,4'-diaminodiphenyl sulphone
		80-56-8	α -pinene
		85-44-9	phthalic anhydride
		91-97-4	3,3'-dimethyl-4,4'-diisocyanatobiphenyl
		95-48-7	o-cresol
		96-49-1	ethylene carbonate
		97-53-0	eugenol
		98-54-4	4-tert-butylphenol
		99-76-3	4-hydroxybenzoic acid, methyl ester
		100-20-9	terephthalic acid dichloride
		101-68-8	diphenylmethane-4,4'-diisocyanate
		102-60-3	N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylenediamine
		102-71-6	triethanolamine
		104-76-7	2-ethyl-1-hexanol
		106-97-8	butane
		106-98-9	1-butene
		107-01-7	2-butene
		107-21-1	ethyleneglycol
		108-78-1	2,4,6-triamino-1,3,5-triazine
		109-43-3	sebacic acid, dibutyl ester
		109-99-9	tetrahydrofuran
		110-88-3	trioxane
		111-20-6	sebacic acid

分類	CAS No.	Chemical Name
	111-40-0	diethylenetriamine
	112-80-1	oleic acid
	112-85-6	behenic acid
	121-91-5	isophthalic acid
	123-28-4	thiodipropionic acid, didodecyl ester
	124-04-9	adipic acid
	124-07-2	caprylic acid
	124-09-4	hexamethylenediamine
	124-26-5	stearamide
	131-17-9	phthalic acid, diallyl ester
	131-57-7	2-hydroxy-4-methoxybenzophenone
	141-43-5	2-aminoethanol
	142-62-1	hexanoic acid
	151-56-4	ethyleneimine
	301-02-0	oleamide
	544-63-8	myristic acid
	629-11-8	1,6-hexanediol
	646-06-0	1,3-dioxolane
	693-57-2	12-aminododecanoic acid
	840-65-3	2,6-naphthalenedicarboxylic acid, dimethyl ester
	1120-36-1	1-tetradecene
	1309-64-4	antimony trioxide
	1321-74-0	divinylbenzene
	1338-41-6	sorbitan monostearate
	1663-39-4	acrylic acid, tert-butyl ester
	1675-54-3	2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane bis(2,3-epoxypropyl) ether
	1843-05-6	2-hydroxy-4-n-octyloxybenzophenone
	2416-94-6	2,3,6-trimethylphenol
	2432-99-7	11-aminoundecanoic acid
	2768-02-7	vinyltrimethoxysilane
	3173-72-6	1,5-naphthalene diisocyanate
	3896-11-5	2-(2'-hydroxy-3'-tert-butyl-5'-methylphenyl)-5-chlorobenzotriazole
	4130-42-1	2,6-di-tert-butyl-4-ethylphenol
	4457-71-0	3-methyl-1,5-pentanediol
	6197-30-4	2-cyano-3,3-diphenylacrylic acid, 2-ethylhexyl ester
	6846-50-0	2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate
	7631-86-9	silicon dioxide
	7664-38-2	phosphoric acid
	7664-41-7	ammonia
	7757-83-7	sodium sulphite
	7773-01-5	manganese chloride
	7782-50-5	chlorine
	8001-79-4	castor oil
	8006-44-8	candelilla wax
	8012-89-3	bees wax
	9000-01-5	gum arabic
	9004-67-5	methylcellulose
	9005-37-2	1,2-propyleneglycol alginate
	10022-31-8	barium nitrate
	10043-52-4	calcium chloride
	10043-84-2	manganese hypophosphite
	10094-45-8	octadecylceramide
	24800-44-0	tripropylene glycol
	26741-53-7	bis(2,4-di-tert-butylphenyl) pentaerythritol diphosphite
	27676-62-6	1,3,5-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione
	54849-38-6	monomethyltin tris(isooctyl mercaptoacetate)
	61788-85-0	polyethyleneglycol ester of hydrogenated castor oil
	68855-54-9	diatomaceous earth, soda ash flux-calcined
データを補完できなかった (64 物質)	50-21-5	lactic acid
	50-81-7	ascorbic acid
	50-99-7	glucose
	57-50-1	sucrose
	57-55-6	1,2-propanediol
	60-33-3	linoleic acid
	64-18-6	formic acid
	67-56-1	methanol
	74-85-1	ethylene
	77-90-7	tri-n-butyl acetyl citrate
	77-92-9	citric acid
	93-58-3	benzoic acid, methyl ester
	94-13-3	4-hydroxybenzoic acid, propyl ester
	97-23-4	2,2'-dihydroxy--5,5'-dichlorodiphenylmethane
	97-63-2	methacrylic acid, ethyl ester
	97-86-9	methacrylic acid, isobutyl ester
	97-90-5	methacrylic acid, diester with ethyleneglycol
	102-08-9	N,N'-diphenylthiourea
	102-70-5	triallylamine
	103-11-7	acrylic acid, 2-ethylhexyl ester
	103-23-1	adipic acid, bis(2-ethylhexyl) ester
	106-44-5	p-cresol
	106-46-7	1,4-dichlorobenzene
	106-63-8	acrylic acid, isobutyl ester
	106-99-0	butadiene
	107-15-3	ethylenediamine
	108-01-0	dimethylaminoethanol

分類	CAS No.	Chemical Name
	108-30-5	succinic anhydride
	108-45-2	1,3-phenylenediamine
	108-91-8	cyclohexylamine
	111-14-8	heptanoic acid
	111-41-1	N-(2-aminoethyl)ethanolamine
	115-28-6	hexachloroendomethylenetetrahydrophthalic acid
	115-96-8	phosphoric acid, trichloroethyl ester
	119-61-9	benzophenone
	122-20-3	triisopropanolamine
	131-53-3	2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone
	143-07-7	lauric acid
	334-48-5	n-decanoic acid
	502-44-3	caprolactone
	514-10-3	abietic acid
	872-05-9	1-decene
	1309-48-4	magnesium oxide
	1310-58-3	potassium hydroxide
	1401-55-4	tannic acids
	1761-71-3	bis(4-aminocyclohexyl)methane
	2082-81-7	methacrylic acid, diester with 1,4-butanediol
	2210-28-8	methacrylic acid, propyl ester
	2425-79-8	1,4-butanediol bis(2,3-epoxypropyl)ether
	2682-20-4	2-methyl-4-isothiazolin-3-one
	2855-13-2	1-amino-3-aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexane
	4080-31-3	1-(3-chloroallyl)-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantane chloride
	4098-71-9	1-isocyanato-3-isocyanatomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexane
	4655-34-9	methacrylic acid, isopropyl ester
	6422-86-2	terephthalic acid, bis(2-ethylhexyl)ester
	6915-15-7	malic acid
	7732-18-5	water
	7758-02-3	potassium bromide
	9000-16-2	dammar
	9000-30-0	guar gum
	10043-35-3	boric acid
	13983-17-0	wollastonite
	26401-97-8	di-n-octyltin bis(isooctyl mercaptoacetate)
	36653-82-4	1-hexadecanol

付録 2

本研究事業でデータベース化した EU 物質の反復投与毒性試験のリスト

CAS No.	Chemical Name	Test Protocol
77-90-7	tri-n-butyl acetyl citrate	OECD Guideline 408
77-90-7	tri-n-butyl acetyl citrate	OECD Guideline 408
80-09-1	4,4'-dihydroxydiphenyl sulphone	OECD Guideline 408
88-99-3	o-phthalic acid	35-day Oral (feed) repeated-dose toxicity study
91-97-4	3,3'-dimethyl-4,4'-diisocyanatobiphenyl	OECD Guideline 407
94-13-3	4-hydroxybenzoic acid, propyl ester	OECD Guideline 422
96-05-9	methacrylic acid, allyl ester	OECD Guideline 422
97-53-0	eugenol	OECD Guideline 408
97-65-4	itaconic acid	OECD Guideline 408
97-65-4	itaconic acid	EU Method B.7 (Repeated Dose (28 Days) Toxicity (Oral))
97-88-1	methacrylic acid, butyl ester	OECD Guideline 408
99-76-3	4-hydroxybenzoic acid, methyl ester	OECD Guideline 407
102-08-9	N,N'-diphenylthiourea	OECD Guideline 407
102-60-3	N,N,N',N'-tetrakis(2-hydroxypropyl)ethylenediamine	OECD Guideline 422
107-92-6	butyric acid	OECD Guideline 408
110-31-6	N,N'-ethylenebisoleamide	OECD Guideline 408
110-60-1	1,4-diaminobutane	6-week Oral (feed) repeated-dose toxicity study
110-88-3	trioxane	OECD Guideline 408
110-88-3	trioxane	OECD Guideline 407
112-84-5	erucamide	OECD Guideline 408
123-28-4	thiodipropionic acid, didodecyl ester	OECD Guideline 408
123-28-4	thiodipropionic acid, didodecyl ester	OECD Guideline 407
124-09-4	hexamethylenediamine	90-day Oral (feed) repeated-dose toxicity study
126-58-9	dipentaerythritol	OECD Guideline 422
127-63-9	diphenyl sulphone	Similar to OECD Guideline 408
498-66-8	bicyclo[2.2.1]hept-2-ene	OECD Guideline 422
504-63-2	1,3-propanediol	OECD Guideline 408
505-65-7	1,4-butanediol formal	OECD Guideline 407
652-67-5	1,4:3,6-dianhydrosorbitol	OECD Guideline 408
693-57-2	12-aminododecanoic acid	OECD Guideline 422
1072-63-5	1-vinylimidazole	OECD Guideline 422
1141-38-4	2,6-naphthalenedicarboxylic acid	OECD Guideline 422
1761-71-3	bis(4-aminocyclohexyl)methane	OECD Guideline 422
1843-03-4	1,1,3-tris(2-methyl-4-hydroxy-5-tert-butylphenyl) butane	90-day Oral (feed) repeated-dose toxicity study
2082-79-3	octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propionate	OECD Guideline 407
2082-81-7	methacrylic acid, diester with 1,4-butanediol	OECD Guideline 422
2146-71-6	lauric acid, vinyl ester	OECD Guideline 422
2146-71-6	lauric acid, vinyl ester	OECD Guideline 408
2162-74-5	bis(2,6-diisopropylphenyl) carbodiimide	OECD Guideline 407
2495-37-6	methacrylic acid, benzyl ester	OECD Guideline 422

CAS No.	Chemical Name	Test Protocol
2867-47-2	methacrylic acid, 2-(dimethylamino)-ethyl ester	OECD Guideline 408
3290-92-4	1,1,1-trimethylolpropane trimethacrylate	OECD Guideline 408
3290-92-4	1,1,1-trimethylolpropane trimethacrylate	OECD Guideline 422
3965-55-7	5-sulphoisophthalic acid, monosodium salt, dimethyl ester	OECD Guideline 407
4191-73-5	4-hydroxybenzoic acid, isopropyl ester	OECD Guideline 408
4724-48-5	n-octylphosphonic acid	OECD Guideline 407
4767-03-7	2,2-bis(hydroxymethyl) propionic acid	OECD Guideline 408
5232-99-5	2-cyano-3,3-diphenylacrylic acid, ethyl ester	OECD Guideline 422
6197-30-4	2-cyano-3,3-diphenylacrylic acid, 2-ethylhexyl ester	OECD Guideline 408
7128-64-5	2,5-bis(5-tert-butyl-2-benzoxazolyl)thiophene	Similar to OECD Guideline 408
7585-39-9	beta-dextrin	OECD Guideline 408
7585-39-9	beta-dextrin	Similar to OECD Guideline 452
8015-86-9	carnauba wax	OECD Guideline 408
8050-15-5	rosin, hydrogenated, ester with methanol	OECD Guideline 408
8050-15-5	rosin, hydrogenated, ester with methanol	OECD Guideline 422
8050-31-5	rosin, ester with glycerol	OECD Guideline 408
9000-01-5	gum arabic	OECD Guideline 408
9000-30-0	guar gum	90-day Repeated dose toxicity study
9004-34-6	cellulose	A 28-day oral toxicity study
9004-57-3	ethylcellulose	OECD Guideline 408
9004-57-3	ethylcellulose	OECD Guideline 408
10016-20-3	alpha-dextrin	OECD Guideline 408
10016-20-3	alpha-dextrin	OECD Guideline 407
10094-45-8	octadecylceramide	Similar to OECD Guideline 408
12542-30-2	acrylic acid, dicyclopentenyl ester	OECD Guideline 422
13811-50-2	N,N'-divinyl-2-imidazolidinone	OECD Guideline 422
16260-09-6	oleylpalmitamide	OECD Guideline 408
25322-68-3	polyethyleneglycol	Similar to OECD Guideline 408
26896-48-0	tricyclodecanedimethanol	OECD Guideline 422
26896-48-0	tricyclodecanedimethanol	OECD Guideline 408
27955-94-8	1,1,1-tris(4-hydroxyphenol) ethane	OECD Guideline 407
67845-93-6	3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acid, hexadecyl ester	91-Day Feeding Study in The Rat Protocol 406
68610-51-5	p-cresol-dicyclopentadiene-isobutylene, copolymer	Similar to OECD Guideline 408
80693-00-1	bis(2,6-di-tert-butyl-4-methylphenyl)pentaerythritol diphosphite	OECD Guideline 408
147315-50-2	2-(4,6-diphenyl-1,3,5-triazin-2-yl)-5-(hexyloxy)phenol	OECD Guideline 407
117-21-5	3-chlorophthalic anhydride	OECD Guideline 407
118-45-6	4-chlorophthalic anhydride	OECD Guideline 407
867-13-0	triethyl phosphonoacetate	OECD Guideline 407
1076-97-7	1,4-cyclohexanedicarboxylic acid	OECD Guideline 407
1076-97-7	1,4-cyclohexanedicarboxylic acid	OECD Guideline 408
3010-96-6	2,2,4,4-tetramethylcyclobutane-1,3-diol	OECD Guideline 408
3010-96-6	2,2,4,4-tetramethylcyclobutane-1,3-diol	OECD Guideline 407
91-76-9	2,4-diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine	OECD Guideline 408
105-08-8	1,4-bis(hydroxymethyl) cyclohexane	OECD Guideline 408
110-63-4	1,4-butanediol	Similar to OECD Guideline 407
111-14-8	heptanoic acid	OECD Guideline 408
111-14-8	heptanoic acid	Similar to OECD Guideline 407
111-40-0	diethylenetriamine	Similar to OECD Guideline 408
111-46-6	diethyleneglycol	OECD Guideline 407
112-27-6	triethyleneglycol	OECD Guideline 408
112-60-7	tetraethyleneglycol	33-day Oral repeated-dose (subacute) toxicity study
115-11-7	isobutene	Similar to OECD Guideline 407
115-27-5	hexachloroendomethylenetetrahydrophthalic anhydride	Similar to OECD Guideline 408
119-47-1	2,2'-methylene bis(4-methyl-6-tert-butylphenol)	similar to OECD Guideline 408
126-30-7	2,2-dimethyl-1,3-propanediol	OECD Guideline 408
141-78-6	acetic acid, ethyl ester	Similar to EPA OTS 795.2600
461-58-5	dicyanodiamide	OECD Guideline 422
461-58-5	dicyanodiamide	Similar to OECD Guideline 408
599-64-4	4-cumylphenol	OECD Guideline 422
629-11-8	1,6-hexanediol	OECD Guideline 407
629-11-8	1,6-hexanediol	OECD Guideline 408
693-23-2	n-dodecanedioic acid	OECD Guideline 408
693-23-2	n-dodecanedioic acid	similar to OECD Guideline 422
840-65-3	2,6-naphthalenedicarboxylic acid, dimethyl ester	OECD Guideline 408
840-65-3	2,6-naphthalenedicarboxylic acid, dimethyl ester	OECD Guideline 422
919-30-2	3-aminopropyltriethoxysilane	OECD Guideline 408
947-04-6	lauro lactam	OECD Guideline 408
1241-94-7	phosphoric acid, diphenyl 2-ethylhexyl ester	OECD Guideline 408
1241-94-7	phosphoric acid, diphenyl 2-ethylhexyl ester	OECD Guideline 408
2855-13-2	1-amino-3-aminomethyl-3,5,5-trimethylcyclohexane	OECD Guideline 408
6846-50-0	2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	USFDA Toxicological Principles for the Safety of Food Ingredients, Redbook 2000, updated to April, 2004; IV.C.4.a, Subchronic Toxicity Studies with Rodents
6864-37-5	3,3'-dimethyl-4,4'-diaminodicyclohexylmethane	OECD Guideline 408
15571-58-1	di-n-octyltin bis(2-ethylhexyl mercaptoacetate)	OECD Guideline 408
27176-87-0	dodecylbenzenesulphonic acid	OECD Guideline 422
27676-62-6	1,3,5-tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione	OECD Guideline 408
36653-82-4	1-hexadecanol	OECD Guideline 407
6422-86-2	terephthalic acid, bis(2-ethylhexyl)ester	Similar to the one described in the U.S. EPA guideline, 799.9310 TSCA "90-Day Oral Toxicity Study in Rodents"
2416-94-6	2,3,6-trimethylphenol	OECD Guideline 407
95-48-7	o-cresol	90-day Repeated dose toxicity study
95-48-7	o-cresol	Similar to OECD Guideline 408
106-44-5	p-cresol	OECD Guideline 407

CAS No.	Chemical Name	Test Protocol
106-44-5	<i>p</i> -cresol	OECD Guideline 408
107-21-1	ethyleneglycol	112-day Oral (feed) repeated-dose toxicity study- Wistar rat-
107-21-1	ethyleneglycol	112-day Oral (feed) repeated-dose toxicity study- F344 rat-
107-21-1	ethyleneglycol	90-day Oral (feed) repeated-dose toxicity study
107-21-1	ethyleneglycol	90-day Oral (drinking water) repeated-dose toxicity study
108-39-4	<i>m</i> -cresol	90-day Repeated dose toxicity study
109-99-9	tetrahydrofuran	generally equivalent to that of OECD Guideline 407
122-52-1	phosphorous acid, triethyl ester	OECD Guideline 407
872-50-4	N-methylpyrrolidone	OECD Guideline 407
872-50-4	N-methylpyrrolidone	OECD Guideline 408
79-14-1	glycolic acid	OECD Guideline 408

OECD Guideline 407; Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity in Rodents), OECD Guideline 408; Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity in Rodents, OECD Guideline 422; Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction / Developmental Toxicity Screening Test

2) 個別課題名：検証用データへの *in silico* 変異原性評価手法の適用の検討（研究担当者：本間 正充、杉山 圭一（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所））

1. 目的

食品の容器・包装材料からの溶出する化学物質は食品を通じ、非意図的に消費者が摂取してしまう可能性がある。これら化学物質に関しては、十分な毒性試験情報が得られていないか、あるいは微量のための試験実施の困難性から、評価が難しいものが多い。そのような物質の評価法として、医薬品中の存在する変異原性不純物との評価と管理に係わるガイドライン（ICH M7）では、すでにその不純物の変異原性の評価に *in silico* 手法が利用されている。そこで、本研究では、非意図的に食品に微量に含まれる化学物質の変異原性の評価に、医薬品不純物と同様に *in silico* 手法が適用可能か否かの検証を行うことを目的とする。*In silico* 手法の適切な利用法が明確化できれば、食品安全委員会でのリスク評価に極めて有益と考えられる。

2. 方法

評価対象物質について、名称、CAS 番号、化学構造、ならびに入手可能な既存遺伝毒性試験データ（必要に応じ類似物質を含む結果および当該資料）を収集し、遺伝毒性を評価した。これら化学物質に対し、Ames 変異原性に関する 2 種の *in silico*（QSAR モデル）を用いて Ames 変異原性を予測計算し、その予測性を評価した。実際の評価結果と、計算結果に矛盾がある物質に関しては、Ames 試験を実施し、その結果を検証した。

2.1. 対象物質

食品用器具容器包装関連物質のポジティブリスト化のためリスク評価が必要となる評価対象化学物質のうち、令和元年度まで 812 物質について遺伝毒性データを収集し、複数の専門家によりそれら物質の遺伝毒性の有無（陽性、陰性）を判定した。これらを *in silico* 評価の対象物質とした。

2.2. 使用 QSAR モデル

Ames 変異原性予測の *in silico* 手法としては、ICH M7 では、知識（ルール）ベースおよ

び統計ベースの 2 つの QSAR を相補的に利用することが推奨されていることに基づき、以下の 2 種類の QSAR モデルを用いた。1 つは知識ベースとして英国 Lhasa 社の Derek Nexus ver. 6.0.1 (DEREK)、もう 1 つは統計ベースとして米国 MultiCASE 社の CASE Ultra ver. 1.6.2.2 (CASE Ultra) である。DEREK は毒性作用に関与すると想定される構造パターンをアラート (警告構造) と定義し、毒性作用を予測したい化合物の構造特性と比較することにより毒性予測を導き出すものである。構造パターンは既知の化合物のデータを用いている。CASE Ultra は毒性作用に関与すると想定される構造パターンをトレーニングデータとしている。アラートとなる構造パターンは知識ベースと同様に既知のデータに由来するが、化合物のデータは物理および化学的パラメータやその記述子を用いた計算、および統計的なマシンラーニングに最適化された「モジュール」と呼ばれる形になっている。これにより、化合物が既知の構造パターンである場合はその組み合わせから計算で毒性を予測し、既知の構造パターンが無い場合でも、マシンラーニングによる学習効果から構造特性を計算によって導き出して毒性作用を予測できるとされる。モジュールには以下の 5 つを用いた: 1) GT1_A7B, 2) GT1_AT_ECOLI, 3) PHARM_ECOLI, 4) PHARM_SALM および、5) GT1_BMUT。5) は 1) - 4) の統合型モジュールであり、本プロジェクトの後半ではこちらのみを使用した。少なくとも 1 つのモジュールにおいて陽性を示した場合を陽性と判定しているため、使用したモジュールの変更に伴い解析結果が異なることはない。

本 QSAR 解析においては、金属元素、ポリマー、構成成分の構造式を特定できなかった混合物、反応物 (不純物等)、天然物 (松やに等)、生体成分 (タンパク質、アミノ酸等)、一部の油脂、構造情報が得られない物質については、解析対象外とした。また、必要に応じ QSAR 解析の最適化 (統計ベース QSAR はイオン化合物を解析できないため中性化するなど) を行った。各 QSAR モデルの予測結果表示と定義を表 1 に示す。

表 1 各 QSAR モデルの予測結果表示と定義ならびに評価結果

QSAR モデル	予測結果	定義	評価結果
Derek Nexus	Inactive	明確に警告構造無し	陰性
	Probable	少なくとも 1 つの警告構造の強い証拠有り	陽性
	Plausible	証拠の重みにより警告構造が支持される	陽性
	Equivocal	警告構造の支持/不支持の証拠の重みが同等	陽性
	Inapplicable	適用できない	適用外
CASE Ultra	Known negative	既知の陰性知見有り	陰性
	Negative	計算による陽性確率が 40%未満	陰性
	Known positive	既知の陽性知見有り	陽性
	Positive	計算による陽性確率が 60%以上	陽性

	Known marginal	既知の相反結果有り	陽性
	Inconclusive	計算による陽性の確率が 40%以上 60%未満	陽性
	Out of Domain	モデルでカバーされていない構造がある	適用外
	Inapplicable	適用できない	適用外

また Derek Nexus と CASE Ultra の 2 つのモデルを組み合わせた最終予測結果を表 2 に定義する。

表 2 Derek と CASE Ultra の 2 つのモデルを組み合わせ最終判定

Derek Nexus	CASE Ultra	判定
陽性	陽性	陽性
陽性	陰性	陽性
陽性	適用外	陽性
陰性	陽性	陽性
陰性	陰性	陰性
陰性	適用外	陰性
適用外	陽性	陽性
適用外	陰性	陰性
適用外	適用外	判定不能

基本的には 2 つのモデルの内 1 つでも陽性であれば陽性とし、2 つとも陰性であれば陰性とした。それ以外のケースに関しては、陰性結果の確からしさ等を考慮し、ケースバイケースで最終判定を行った。

QSAR の予測能力は表 3 に示すように実際の評価結果と、予測結果のマトリックスから計算した。

表 3 QSAR 予測結果マトリックス

		QSAR 予測結果		
		陽性	陰性	予測不能
実際の評価結果	陽性	真の陽性 (TP)	偽陰性 (FN)	—
	陰性	偽陽性 (FP)	真の陰性 (TN)	—
総数	Total			

このマトリックスから感度、特異度、精度、陽性予測率、陰性予測率、適用率を計算し、QSAR の予測性を評価した (表 4)。なお、後述するが実際の評価結果が判定不能の物質は QSAR 評価から外した。

表 4 QSAR モデルの予測性評価指標

評価指標	計算方法と説明
感度 (Sensitivity)	$TP/(TP + FN)$ 陽性物質を陽性と判定できる能力
特異度 (Specificity)	$TN/(TN + FP)$ 陰性物質を陰性と判定できる能力
精度 (Accuracy)	$(TP + TN)/(TP + TN + FP + FN)$ 総合判定能力
陽性予測率 (Positive Prediction Value)	$(TP)/(TP + FP)$ 陽性予測結果の正解率
陰性予測率 (Negative Prediction Value)	$TN/(TN + FN)$ 陰性予測結果の正解率
適用率 (Coverage)	$(TP + TN + FP + FN)/Total$ 予測できた化合物の割合

2.3. Ames 試験の実施による判定の検証

専門家判断で「判定不能」と判断された物質や、専門家判断と QSAR の予測結果に乖離がある物質で、入手可能なものについては、実際に Ames 試験を実施した。試験は、外部の試験受託機関に委託し、OECD TG471 (細菌復帰突然変異試験) に従い、準 GLP にて実施した。

3. 結果

3.1. 対象物質の最終変異原性評価結果

収集した 812 物質の遺伝毒性試験データの信頼性 (GLP やガイドラインの適用性)、類似物質の遺伝毒性試験結果により対象物質の変異原性を評価した。必要に応じ、更なる情報収集を行った。本評価は、変異原性試験である「微生物を用いた復帰突然変異試験 (Ames 試験)」の結果に最重点を置き、次いで *in vivo* 遺伝毒性試験結果も考慮した。他の各種遺伝毒性試験結果については、最終判定の際に参考結果として使用した。したがって、変異原性評価の最終判定については、これら遺伝毒性結果も踏まえての総合判断となる。評価結果を総括した結果を表 5 に示す。本研究で対象とした食品用器具容器包装関連物質のポジティ

ブリスト化によりリスク評価が必要となる物質の約 9 割は、陰性と専門家により判定される結果となった。

表 5 専門家による器具容器関連物質の遺伝毒性評価のまとめ（計 812 物質）

物質数	陰性	陽性	判定不能
812	727	48	37
100	89.5	5.9	4.6

3.2. QSAR による変異原性予測結果

本研究において対象とした全 812 物質の変異原性 QSAR 予測結果を表 6 に示す。また、今回の QSAR の予測能力の評価を表 7 に示す。

表 6 専門家判断と QSAR 予測の評価結果マトリックス

		QSAR による予測結果								
		Derek Nexus			CASE Ultra			組合せ		
		陽性	陰性	適用外*	陽性	陰性	適用外*	陽性	陰性	判定不能*
専門家変異原性評価結果	陽性	35	10	3	41	3	4	43	2	3
	陰性	23	557	147	81	492	154	97	483	147
	判定不能	5	26	6	13	14	10	14	17	6
計		63	593	156	135	509	168	154	502	156

表 7 QSAR による予測結果のまとめ

	Derek Nexus	CASE Ultra	組合せ
感度 (%)	77.8	93.2	95.6
特異度 (%)	96.0	85.9	83.3
精度 (%)	94.7	86.4	84.2
陽性予測率 (%)	60.3	33.6	30.7
陰性予測率 (%)	98.2	99.4	99.6
適用率 (%)	80.8	79.3	80.8

当該 812 物質の Derek による QSAR 予測結果は、陰性が 593 物質（73.0%）、陽性が 63 物質（7.8%）、解析対象外となる適用外が 156 物質（19.2%）であった。専門家によって陽性と判断された 48 物質の内、Derek は 35 物質を陽性と予測したが、10 物質は陰性と予測した（偽陰性）。また 3 物質は適用外となり、感度は 77.8%（35/45）であった。適用外となる

陽性 3 物質はそれぞれ、soybean oil (大豆油 (加熱油、油煙) : CAS No. 8001227)、diaryl-p-phenylenediamine, where the aryl group may be phenyl, tolyl, or xylyl (混合物 : CAS No. 68953844)、および cobalt tallate (金属 : CAS No. 61789524) となる。専門家によって陰性と判断された 727 物質については、Derek は 557 物質を陰性と予測したが、23 物質は陽性と予測した (偽陽性)。残りの 147 物質は適用外となり、適用外となる陰性物質には主に金属、ポリマーおよび構成成分を特定できない混合物が含まれ、特異度は 96.0% (557/580) であった。

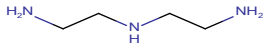
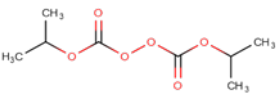
一方、CASE Ultra による 812 物質の QSAR 予測結果は、陰性が 509 物質 (62.3%)、陽性が 135 物質 (16.6%)、適用外 (out of domain あるいは inapplicable) が 168 物質 (20.7%) であった。専門家によって陽性と判断された 48 物質の内、CASE Ultra は 41 物質を陽性と予測したが、3 物質は陰性と予測した (偽陰性)。また 4 物質は適用外となり、感度は 93.2% (41/44) であった。適用外となる陽性 4 物質はそれぞれ soybean oil (大豆油 (加熱油、油煙) : CAS No. 8001227)、4,4'-oxybis(benzenesulphonyl azide) (混合物 : Cas No. 7456680)、diaryl-p-phenylenediamine, where the aryl group may be phenyl, tolyl, or xylyl (混合物 : CAS No. 68953844)、および cobalt tallate (金属 : CAS No. 61789524) となる。専門家によって陰性と判断された 727 物質については、CASE Ultra は 492 物質を陰性と予測したが、81 物質は陽性と予測した (偽陽性)。残りの 154 物質は適用外となり、適用外となる陰性物質には主に金属、生体構成成分もしくは構造式情報がないものが含まれ、特異度は 85.9% (492/573) であった。

さらに両モデル組合せによる予測結果についても評価した。この評価では陽性物質の検出を優先し、どちら一方のモデルが陽性と予測した場合、陽性とするようにした (表 2)。その結果、専門家によって陽性と判断された 48 物質の内、両モデルの組合せは 43 物質を陽性と予測したが、2 物質は陰性と予測した (偽陰性)。また 3 物質は適用不可となり、感度は 95.6% (43/45) であった。専門家によって陰性と判断された 727 物質については、両モデルの組合せは 483 物質を陰性と予測したが、97 物質は陽性と予測した (偽陽性)。残りの 147 物質は判定不能となり、特異度は 83.3% (483/580) であった。

陽性物質の内、両モデル組合せにおいても陰性と予測されたのは Diethylenetriamine と Isopropyl peroxydicarbonate の 2 物質であった (表 8)。これら物質は実際に Ames 試験を実施し、検証する必要があるが、今回は試験検体の入手ができなかったため、試験は実施していない。

表 8 両モデル組合せ予測による偽陰性物質

化学物質名	CAS No.	Structure	DEREK 予測	CASE Ultra 予測

Diethylenetriamine	111-40-0		INACTIVE	Known Negative
Isopropyl peroxydicarbonate	105-64-6		INACTIVE	Negative

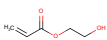
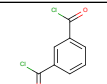
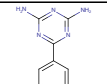
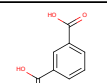
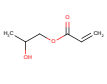
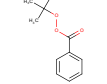
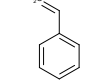
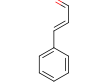
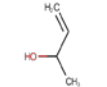
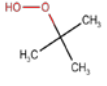
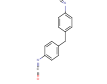
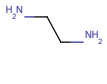
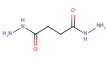
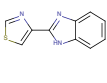
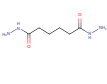
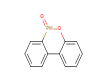
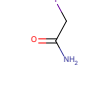
2つのQSARモデル（Derek および CASE Ultra）を組み合わせることで、専門家判断による陽性物質をほぼ9割検出することができた。構造を特定できないことから解析対象外となった3物質を除けば、その感度は95.6%（43/45）に上り、概ね陽性物質を検出可能と考えられた。一方、陰性予測の場合でもその陰性予測率（Negative Predictivity）は99.6%と、ほぼ100%に近い結果であった。また全812物質の内、QSARによる結果予測が可能であったのは656物質と、適用率は80.8%（656/812）である。適用できない物質の多くは、ポリマーや金属化合物で、構造式で表すことが困難であり、QSARでの計算ができないものである。これら化合物は元々変異原性を示さない物質であるため、この適用率の低さは問題にならないと考えられる。

3.3. 判定不能物質のAmes試験

これまでAmes試験結果を中心に変異原性を評価した物質の内、専門家による判断でも判定が困難である物質、陽性判定とされたがQSARからは陰性が指摘される物質、もしくは陰性判定とされたが、QSARからは陰性が指摘される物質については、実際にAmes試験を実施し、判定結果の検証を行った。尚、物質の入手可能性も考慮されるため、該当する全ての物質が試験された訳ではない。

本研究班では平成31年度、令和元年度において表9に示す17物質について試験を行った。17物質中15物質は今回評価した812物質に含まれる。これら物質の出所は表1に括弧書きで記載した。また、器具容器からの溶出物として特に安全性に懸念があり、Ames試験結果の確認を必要とする2物質（Styrene、cinnamaldehyde）を試験した。結果は17物質中9物質が陽性、特に4物質（isophthalic acid dichloride、tert-butyl peroxybenzoate、tert-butyl hydroperoxide、diphenylmethane-4,4'-diisocyanate）が強い陽性と判定された。これら試験結果は概ね、当初の専門家判断と一致したが、いくつかは判定が覆ったか、判定が確定した。

表9 Ames試験結果

No.	品名	通し 番号	CAS#	物質名	構造	既存の変異原性情報		QSAR予測			新規Ames試験結果	
						Ames試験評価	Ames試験評価コメント	DEREK Nexus	CASE Ultra	CASE Ultra Probability (%)	Ames試験結果	Ames試験結果コメント
1	H29欧州第一号	187	818611	2-hydroxyethyl acrylate		陽性	Ames 3試験中2試験は陽性を示す。なお、本剤の遺伝毒性には分子内に存在するカルボニル基の関与が疑われる。陽性判定	INACTIVE	Known Positive	22.9	陽性	WP2uvr2でS9の有無に関係なく陽性 最大比活性値: 22 (WP2uvr-, S9) 代謝活性化を必要としない陽性
2	H29欧州第一号	21	99638	isophthalic acid dichloride		判定不能	Amesは2試験で陰性。他は陽性、陰性が混在。判定不能	EQUIVOCAL	Inconclusive	46.9	強い陽性	TA1537を除く全ての菌株で9の有無に関係なく陽性 最大比活性値: 9272 (TA100, +S9) 代謝活性化を必要としない強い陽性
3	H29欧州第一号	153	91769	2,4-diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine		判定不能	Ames陽性だが、遺伝子突然変異試験であるMLA2試験では陰性。判定不能	INACTIVE	Known Negative	20.2	陰性	
4	H29欧州第一号	176	121915	isophthalic acid		判定不能	Ames陽性陽性混在。陰性データの1つは安衛法由来。判定不能	INACTIVE	Known Negative	14.2	陰性	
5	H30欧州第2号 (I)	34	25584-83-2	acrylic acid, 2-hydroxypropyl ester		判定不能	判定根拠として利用可能なAmes試験結果の欠如。(異性体混合物としての知見のみで、かつ合理的な説明も明確な試験結果が得られない。)	INACTIVE	Known Positive	22.9	陽性	WP2uvr2でS9の有無に関係なく陽性 最大比活性値: 12 (WP2uvr-, +S9) 代謝活性化を必要としない陽性
6	H30第3号 (H)		614459	tert-butyl peroxybenzoate		陽性	陽性結果も存在するもののAmes2試験の陽性結果がある。7試験は3試験あり全て陽性となり、総合判定として陽性の可能性を棄却できない。陽性判定	INACTIVE	Known Positive	54.0	強い陽性	全ての菌株で9の有無に関係なく陽性 最大比活性値: 8800 (TA100, +S9) 代謝活性化を必要としない強い陽性
7	H29北米 QSAR797	100-42-5		Styrene		陽性	Ames陽性陽性混在 陽性判定	EQUIVOCAL	Known Positive	22.9	陰性	既存の評価書等ではAmes試験陽性物質と評価されているが、全菌株傾向は見られなかった。構造がin vivoではPhenol類似により代謝活性化を受け変異原性を示す可能性はある。in vivo TGR試験の実施が望まれる。
8	H30北米 QSAR797 (R1第14号 (V))	104552		cinnamaldehyde (ベンゼンプロパルアル、シナミルアルデヒド)		陽性	Ames試験は陽性と陰性の結果が混在するが、H30の突発変異実施試験にてS9前報に依らずTA100で陽性結果。陽性判定	PLAUSIBLE	Known Positive	72.7	陽性	TA100でS9の有無に関係なく陽性。 最大比活性値: 498 (TA100, -S9)、代謝活性化を必要としない陽性 構造がin vivoで変異原性が疑われるためin vivo TGR試験を実施 (H12食後費) したが結果は陰性
9	H30欧州第2号 (I)	31	598323	3-buten-2-ol (1ブテン-3-オール)		陽性	Ames短見はTA100のみで、+/-S9とも3前報の増加しかみながら、本物質の純度は99.9%と高いものの、0.4%の不純物は2-methylvinyl ketoneで、これは強い変異原性をもつ。不純物を要検討。陽性判定	PLAUSIBLE	Known Positive	35.2	陽性	TA100, TA980、S9で陽性 最大比活性値: 25 (TA100, -S9) 代謝活性化を必要としない陽性 純度は97%
10	H30第4号 (H)	40	75912	tert-butyl hydroperoxide		陽性	詳細は不明であるもののAmes1試験が陽性となる。QSAR結果も陽性を支持している。ただし、遺伝毒性のメカニズムとして、ラジカル反応の発生が推察されることから陽性が設定できる可能性を残す前でもあり。陽性判定	PLAUSIBLE	Known Positive	81.2	強い陽性	TA1535を除く全ての菌株で9の有無に関係なく陽性 最大比活性値: 7740 (TA100, +S9) 代謝活性化を必要としない強い陽性
11	H30欧州第6号 (V)	18	101688	diphenylmethane-4,4'-diisocyanate		特筆すべき陰性物質	Ames4試験中2試験の陽性結果は溶媒としてDMSOを使用。当該物質はDMSO中でdimazodiphenylmethane (MDA)を生成しMDAがAmes陽性(遺伝毒性を示す (Mutat. Res. 412, 167-175, 1998)。陽性反応が溶媒に依存する場合は不明。	PLAUSIBLE	Known Positive	56.1	強い陽性	代謝活性化のTA100において、用量依存性増加が認められ、再現性が得られた。最大比活性値は、陽性試験の代謝活性化したTA100の38.1 μg plate1における3.25 × 103 (Rev./mg) 溶媒はDMSOを使用。代謝活性化を要すること、変異原性が強いことから溶媒の影響は考えにくい
12	H30欧州第6号 (V)	25	107153	ethylenediamine		判定不能	Ames試験は相反する報告がある。GLP試験(1987)での強い陽性がある一方、適切に実施された最近の知見(1994)では陰性である。	INACTIVE	Known Positive	22.9	陰性	用量設定試験及び本試験共に代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても高濃度範囲の25以上となる倍量変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。
13	R1アクトサイダー第11号 (H)	4	4146434	Succinohydrazide		陽性	詳細不明であるもののAmes試験1試験が陽性である。他のAmes試験を含めRAで陰性試験結果が存在する。	PLAUSIBLE	Positive	69.1	陽性	代謝活性化の有無にかかわらずTA1535及びWP2 uvaCにおいて、用量依存性増加を示し、再現性も認められた。また、TA100においても代謝活性化の有無にかかわらず最大で約1.7倍の増加。最大比活性値は、WP2 uvaCの1.550 μg/plate1における2.19 × 107 (Rev/mg)であった。
14	R1第アクトサイダー第11号 (H)	11	148798	Thiabenzazole		特筆すべき陰性物質	QSARは陽性判定となるが、Ames試験4試験は陰性。	EQUIVOCAL	Known Positive	93.3	陰性	いずれの菌株に対しても量反発的に増加せず、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。
15	R1第アクトサイダー第11号 (H)	17	1071938	Adipic dihydrazide		特筆すべき陰性物質	QSAR陽性との判定であるが、Ames試験1で低濃度最高用量500μg/plate試験は陰性である。	PLAUSIBLE	Positive	69.1	陰性	本試験物質は、代謝活性化の有無にかかわらずいずれの菌株に対しても用量反発的に増加しなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果に再現性も得られた。
16	R1三楽第10号 (I)	10	35948255	9,10-Dihydro-9-oxa-10-phosphaphenanthrene 10-oxide		陰性	利用可能な遺伝毒性データは、Ames試験にのみ、特に遺伝毒性の懸念は認められない。	INACTIVE	Out of Domain	36.1	陰性	本試験物質は、代謝活性化の有無にかかわらず用量反発的に増加せず、試験結果に再現性も得られた。
17	R1アクトサイダー第13号 (V)	15	144489	Acetamide, 2-iodo-		特筆すべき陰性物質	陰性1試験はTA1538であるが代謝活性化条件下において、2倍未満の倍増コロニー数の上昇を認める。また、QSARは陽性。	PLAUSIBLE	Positive	74.5	陰性	用量設定試験及び本試験共に代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても倍量変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。

3.4. 考察

本研究においては、器具容器包装関連物質を対象とし、その変異原性評価に *in silico* 手法が適用可能か否かの検証を行うことを目的としている。化学構造が明らかな対象物質については、Ames 変異原性に関する 2 種の *in silico* (QSAR モデル) 予測評価を実施し、これらの情報ならびに証拠の重み付けによる専門家判断により変異原性を判定した。その結果、両 QSAR を併用することにより、専門家判断として陽性物質と判定された物質の約 8 割をカバーし、感度 95.6%、陰性予測率 96.2%を示した。このことは変異原性物質を確実に予測し（高感度）、陰性予測された物質は実際には陰性である（高陰性予測率）ことを意味する。また、カバーできない物質の多くはポリマーや金属化合物がほとんどで、3 化合物を除き元々変異原性は陰性であることから、適用率 80.8%は全く問題にならない。以上のことから QSAR 手法は器具容器包装関連物質の変異原性予測に十分に活用できると考える。このことは、ICH M7 ではすでに社会実装されている同不純物の変異原性評価に *in silico* 手法が利用されていることと矛盾するものではない。

専門家判断、および QSAR の併用によっても判定が困難である場合は、実際に Ames 試験を実施し、検証を行った。平成 30 年度、令和元年度で Ames 試験を行った 17 物質の内、5 物質は判定不能であったが、これらの 2 物質は陽性、3 物質は陰性と判定された。残り 12 物質の判定結果は概ね当初の判定結果と一致した。以下に最終判定に影響を与えたものについて考察する。

- 1) 陽性物質であったのに陰性の判定に覆ったもの：Styrene
- 2) 陰性物質であったのに陽性に判定が覆ったもの：diphenylmethane-4,4'-diisocyanate
- 3) 判定不能であったが、陽性とされたもの：isophthalic acid dichloride、acrylic acid, 2-hydroxypropyl ester
- 4) 判定不能であったが、陰性とされたもの：isophthalic acid、2,4-diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine、ethylenediamine

1) の styrene はこれまで Ames 試験に関しては陰性、陽性の報告が混在したが、今回の試験結果では全く陽性傾向が認められず陰性が確定した。ただし、本物質は *in vivo* において Phase II 酵素により代謝活性化を受け、変異原性を示す可能性がある。本物質は重要な器具容器関連化学物質のひとつであり、*in vivo* での変異原性の検証が望まれる。同様の変異原性メカニズムを有するものとして cinnamaldehyde が挙げられる。

2) の diphenylmethane-4,4'-diisocyanate は「特筆すべき陰性物質」のひとつである。「特筆すべき陰性物質」とは試験結果が明らかに陰性であるにもかかわらず、2 つの QSAR で強く陽性が示唆された物質である。このことから、diphenylmethane-4,4'-diisocyanate は信頼性の低い遺伝毒性結果により、間違って陰性と判定されたものと考えられる。「特筆すべき陰性物質」は他に 3 物質あるが、これらの Ames 試験結果は陰性であった。これらに関しては QSAR 予測モデルがこれら化学物質を十分にカバーできていないことを示すものである。今後 QSAR モデルの改良が望まれる。

3) の isophthalic acid dichloride は Derek で equivocal、CASE Ultra では陽性確率 46.9% で inconclusive であり、本来の QSAR 予測は陽性である。acrylic acid, 2-hydroxypropyl ester は Derek で inactive、CASE Ultra は Known positive であるが、陽性確率は 22.9% と低かった。今回の結果は、新たなアラートの開発に繋がるものと考えられる。

4) の isophthalic acid, 2,4-diamino-6-phenyl-1,3,5-triazine は QSAR 予測では陰性であり、QSAR の予測能力が証明された。Ethylenediamine は Derek で inactive、CASE Ultra では Known positive であるが陽性確率 22.9% と低かった。CASE Ultra のデータベースには信頼性の低いデータが含まれている可能性がある。

4. まとめ

Ames 試験結果と知識ベースおよび統計ベースの 2 種類の QSAR 結果を統合した評価スキームは、専門家判断として陽性物質と判定された物質の 95% 以上を捕捉し、陰性と予測された物質の 96% 以上が実際に陰性であると検証されたことから、QSAR 解析可能な器具容器包装関連物質の変異原性予測に両モデルの併用は有効と考えられる。

既存の Ames 試験結果と QSAR 予測からでは判定が困難な物質に対しては実際に Ames 試験を実施し、判定、もしくは予測結果を検証した。これら作業は、これまでのデータベースを修正し、信頼性の高いデータベースの構築に重要である。また、このデータベースは QSAR 予測モデルの予測性の向上にも繋がる。

3) 個別課題名：検証用データへの反復投与毒性の *in silico* 評価アプローチ適用性の検討
(研究担当者：小野 敦（所属機関名：岡山大学）、山田 隆志（所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）)

本課題では、反復投与毒性の *in silico* 評価に関して、カテゴリーアプローチ、構造活性相関モデル、毒性学的懸念の閾値 (TTC) のそれぞれについて、器具容器包装関連物質のリスク評価への適用性について検討を進めた。

3. 1 カテゴリーアプローチの適用に関する検討

器具容器包装関連物質に対して、カテゴリーアプローチによるリードアクロスの適用に関する検討を行うに当たって、リードアクロスの開発や行政的な利用に関する国際的な動向を整理した。

2017 年の第 56 回北米毒性学会の年会で、“Regulatory Acceptance of Read-Across”に関するサテライト会議が開催された。この会議では、複数の機関から招待された講演者により、Regulatory toxicology の意思決定におけるリードアクロスの適用に関する実証的な視点が紹介された (Chesnut et al., 2018)。

欧州化学品規制 REACH において、リードアクロスは化学物質の登録に必要なデータの作

成のために利用が検討される重要なデータギャップ補完法である。類似の化学構造がリードアクロスの基礎であるので、化学構造のわずかな違いは生物学的影響の違いに対しても小さい理由を説明するには、エビデンスと試験データを裏付ける科学的正当化 (Scientific justification) が必要であることが強調された。欧州化学品庁 (ECHA) は、登録者が行うリードアクロスの正当性を評価するためのツールとして、リードアクロス評価フレームワーク (RAAF) を導入している。ECHA の決定におけるリードアクロスの拒否の事例は多い。その理由として、物質の同一性の説明の欠落 (ターゲット物質およびソースアナログ (試験データがある類似物質) の構造的類似性が確認できない。特に UVCB など)、リードアクロスの正当性の範囲内で立てた仮説を実証するための十分なエビデンスの不足 (登録書類に記載されているソースアナログに関するデータ不足など)、不適切なデータの読み取り (より高次の生殖発達試験の要件に対応するために生殖スクリーニング試験を読み取るなど)、科学的蓋然性の欠如 (仮説と矛盾するデータ、主張された類似性と矛盾する毒性プロファイル、外挿による不確実性など) が挙げられる。(Ball et al., 2016)。

欧州食品安全機関 (EFSA) において、リードアクロスは農薬、化学汚染物質、食品添加物および包装の分野で利用拡大が検討されている。リードアクロスが最も広く使用されているのは香料であり、構造の類似性と一般的な代謝および生物学的挙動に基づいて遺伝毒性が評価されている。それ以外では適用事例は少ない。例外的な事例として、L-アスコルビン酸カルシウムの生産工程の改善により生じた新しい副産物である 4-ヒドロキシ-5-メチル-3 (2H) -フラノン (4-HMF) への適用がある。4-HMF を評価するのに十分なデータがなかったため、EFSA はリードアクロスを実施した。2004 年に JECFA によって 2 年間の発がん性試験で評価された関連化合物 4-ヒドロキシ-2,5-ジメチルフラン-3 (2H) -オン (HDMF) をこのグループの代表的な化合物と見なし、HDMF に対して実施された *in vitro* および *in vivo* 試験の結果より、4-HMF に対する遺伝毒性の懸念を排除するのに十分な情報が提供された。食品接触材料の評価におけるリードアクロスの使用に関して二つの事例がある。1 つは 2-hydroxypropyl methacrylate oligomers を対象として遺伝毒性と *in vivo* 毒性を評価するために使用され、もう一つは ethylene glycol dipalmitate を対象として遺伝毒性および *in vivo* の発達毒性を評価するために使用された。また、農薬の分解物・代謝物の遺伝毒性の評価のために、リードアクロスと QSAR が利用されることになっている。EFSA のリードアクロスの使用は特定のセクターに限定されており、また *in vivo* 毒性への利用実績は少ない。ただし、EFSA はリードアクロスの適用範囲を拡大させるためのプロジェクトを進行させている。そのひとつとしてリードアクロスの手法や活用における留意点をガイダンスとして、この先 2-3 年かけてまとめていく予定である (Kass, 私信)。

米国の動物実験代替法に関する多省庁の共同検討組織 ICCVAM は、化学物質と医薬品の安全性評価に対する新しいアプローチを確立するための米国の戦略的ロードマップを作成し、これに基づき現在 8 つのワークグループを活動させている。このうち、Read-Across Workgroup は、活動の第一段階として連邦機関におけるリードアクロスのニーズや活用状況のカタログ化とワークフローの標準化を検討している。カテゴリーアプローチによるリー

ドアクロスの実施には、いくつかのステップがある。これらの手順は、参照されている技術ガイダンスと出版物によってステップの数や呼び方が異なる場合がある（ECHA, 2008、ECETOC, 2012、OECD, 2014）。Read-Across Workgroup で提案されたワークフローは次のとおりである。ただ対象物質が個別の有機化学物質である場合にのみ適用される（Patlewicz et al., 2019）。

1. **意思決定の流れ：**プロセスの最初のステップは、検討する問題の範囲と目的を明確にし、目的に適したリードアクロスの適用を確実にを行うための意思決定の流れを定義することである。意思決定の流れは、ハザードレベルスクリーニング評価、リスク評価、または優先順位付けスキームに関連する場合がある。これらのそれぞれの意思決定の流れにより、最終的なリードアクロスによる予測において許容できる不確実性の範囲と、どの程度のリソース（データ、労力の程度）をかける必要があるかを決定する。
2. **データギャップ分析：**データギャップ分析は、ターゲット物質（評価対象物質）にどのようなデータギャップが存在し、どのエンドポイントに関連するかを評価することを指す。データギャップを特定することで、使用に適した他のデータギャップ補完技術があるかどうかを判断することが出来る。魚類急性毒性、皮膚感作性、出生前発達毒性のデータギャップがある場合、魚類急性毒性には、QSAR アプローチが最も実用的な解決手法になり、皮膚感作性には *in chemico* と *in vitro* アッセイを組み合わせる使用する場合、Defined Approach が適しており、出生前発達毒性にはリードアクロスがエンドポイントの情報の要件を満たす優れたアプローチになる可能性がある。
3. **包括的な類似性の根拠：**包括的な類似性の理論的根拠は、ターゲット物質について知られている情報に基づいて、どのようにソースアナログ（試験済みの類似物質）を特定するかを明記するときに必要である。ソースアナログの検索をカスタマイズするのに最も合理的である理論的根拠を示す。ターゲット物質の可能性の高い作用メカニズムに関する情報は有用である。そのほか、官能基の反応性、代謝の類似性など、他の類似性の根拠も重要な役割を果たす。
4. **アナログの特定：**アナログの特定とは、ソースアナログの候補を検索することであり、検索は調査中のエンドポイントに関連する特定の側面を考慮して構築した検索、構造の類似性に基づく教師なし検索である場合がある。
5. **アナログの評価：**このステップでは、特定されたソースアナログの候補の毒性情報の関連性と利用可能性を一般的小およびエンドポイント固有の考慮事項に基づいて評価する。
6. **データギャップ補完：**データギャップの補完は、リードアクロス予測を行うプロセスであり、専門家による推測、またはアルゴリズムによって導き出される。反復投与毒性の場合は、安全サイドに立ってワーストケースアナログ（標的エンドポイントの NOAEL 値が最も低い物質）の試験データを読み取る場合が多い。
7. **不確実性評価：**最後に、パフォーマンスを評価し、その予測に関連する信頼性を特徴付けることが不確実性評価ステップの基礎となる。このステップでは、不確実性のレベルが意思決定の流れに受け入れられるかどうか、または受け入れられない場合はどのよう

な情報が必要かを検討する。

Read-Across Workgroup では、提案されたワークフローが機能するかを、ケーススタディを通して確認し、さらに改善させていくことが計画されている。

経済協力開発機構（OECD）では、複雑な毒性エンドポイントについて、Adverse Outcome Pathway（AOP）に基づいて *in silico*、*in vitro*、*in vivo* の情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する“試験と評価のための統合的アプローチ” Integrated Approaches to Testing and Assessment（IATA）のコンセプトが整理されつつある。リードアクロスは IATA の一部とされている。

OECD の IATA Case Studies Project は、行政的な化学物質安全性評価に適した予測手法のケーススタディを開発し、IATA の利用経験をメンバー国で共有することを目指している。加盟国およびその他の組織から提出された個別のケーススタディをレビューし、そのプロセスでは、1) ケーススタディの有力な側面、2) ケーススタディにおける不確実性の領域、3) ガイダンスを作成する領域の特定、および様々な規制関連状況でケーススタディを使用する可能性に焦点を置いている。2015 年から 2018 年の間に検討された 15 件のケーススタディのうち、10 件がリードアクロスを使った事例であり、反復投与毒性をエンドポイントとしたのは 7 件であった。専門家レビューの後に承認された各ケーススタディは、OECD のホームページより参照することができる (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/iata-integrated-approaches-to-testing-and-assessment.htm>)。

同プロジェクトにおける議論では、リードアクロスの結果は、以下の項目についてより深く検討することにより、行政的受け入れ性が促進され则认为られている。

- 透明性と再現性
- 類似性の仮説に関連する信頼性や機序的な蓋然性
- リードアクロスに用いる試験データの質
- *In vitro* および代替アプローチ等のサポートデータの充実や、一つのソースアナログでなくできるだけ多くのソースアナログからターゲット物質の毒性を予測することによるエビデンスの重み付け

鍵となるアナログ、カテゴリーの領域の定義について、どのケーススタディにおいても構造の類似性についてはよく記述されているが、構造の違いに関する議論が不足しており、著者・レビューアーによってとらえ方が異なることも多いことが指摘されている。さらに、不確実性の分析とレポーティングについても議論があり、各ケーススタディには、データやリソースが限られているために異なる不確実性が含まれていること、不確実性の分析は、査読者が特定の目的に対する不確実性の許容度を考慮するのに役立つことが強調されている ([http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mo-no\(2016\)48&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mo-no(2016)48&doclanguage=en))。

さらに、反復投与毒性を予測する OECD での 6 件のケーススタディの解析から、リードアクロスの予測の受入に影響を及ぼす可能性がある様々な不確実性が特定され、体系的に要約されている(表 1) (Schultz et al., 2019)。

表1 リードアクロスの事例研究で特定された不確実性の要約

番号	リードアクロスにおける不確実性
1	適切な問題の明確化によって定義される read-across による予測の規制関連での使用の状況及び関連性
2	適用範囲の定義を含むカテゴリー／グループの種類
3	Read-across の前提又は仮説
4	作用機序又は AOP の完全な解明を含む機序的妥当性
5	化学的な類似性
6	トキシコダイナミクスの類似性
7	トキシコキネティクスの類似性
8	データギャップを補完するために用いられる最終的な評価項目のデータ品質
9	最終的な <i>in vivo</i> ハザードの作用及び重大性の一貫性、並びに中間及び最終的な作用及び強度データに関する一致
10	裏付けとなるデータセットの強度又は頑健性
11	予測を裏付けるエビデンスの重み付け (WoE)
12	提供された文書記録及びエビデンス

全体的に、本研究の基礎となった 6 件のケーススタディの検討では、機序が明確に示され、構造類似物質の適切な実験データを使用することにより、リードアクロスによる予測の信頼性が上昇することが示された。また、特に化学的及び生物学的類似性、並びに予測を裏付けするエビデンスの重み付け (WoE) の増強を実証する手段として、トキシコキネティクスの情報を使用し、さらに関連する *in vitro*、*in chemico* データ、構造活性相関 (SAR) 及びハイスループットスクリーニング (HTS) の情報を使用することにより、信頼性が向上したと結論づけている。また本論文では、表 1 に記載した 12 個の不確実性に取り組むために 30 個の一連の質問が提案されている。

次に、上記の国際的な動向や議論・提案されている実施手順などを考慮して、EU 物質から一部の物質を取り上げてカテゴリーアプローチによるリードアクロス予測の事例研究を実施した。情報収集にかかる時間と労力を低減させるために、無償で利用可能な反復投与毒性評価支援ツールである Hazard Evaluation Support System Integrated Platform (HESS)、知識ベースの市販の構造活性相関ツールである DEREK Nexus (ver. 2.2.1) を用いて、研究項目 (1) で収集した器具容器包装関連物質を評価対象として出力情報を整理し、リードアクロスの予測結果を実測試験結果と比較して検証した。利用できるデータが限られることなどに起因する不確実性を明確化して、可能な場合には不確実性を減少させる関連情報を追加で収集した。

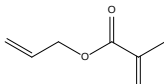
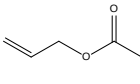
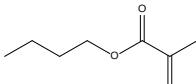
<事例研究 1 : allyl methacrylate>

スクリーニングレベルでのハザード評価を目的に、allyl methacrylate の反復投与毒性エンドポイント（主要な毒性影響と NOAEL）のデータギャップを補完するリードアクロスを試行した。対象物質の allyl methacrylate の CAS No. を HESS に入力し、ワークフローにしたがって“Profiling”を行ったところ、HESS 代謝データベース（化学物質の約 1000 の代謝マップを格納）中に、*in vitro*においてアリルアルコールとメタクリル酸に加水分解されるデータが表示された。*In vivo*の実測代謝データは見つからなかったものの、Rat *in vivo*代謝シミュレータにより、アリルアルコールとメタクリル酸を生じることが示された。また、アリルアルコールとメタクリル酸はそれぞれ SN2 及びマイケル付加によりタンパク結合性を有する可能性があることが示された。DEREK Nexus では、アリルアルコールが肝臓で酸化的に代謝されて生成するアクロレインが生体高分子と強い反応性をもつ機序に基づいた肝毒性アラートが示された。さらに、メタクリル酸部分の alpha, beta-不飽和エステルによる刺激性アラートが示された。親物質並びに代謝物の構造類似性、官能基、化学反応性を考慮して HESS を用いて試験済みの類似物質の抽出を試みたところ、類似性が高い物質として、allyl acetate と butyl methacrylate が得られた。

Allyl acetate は、生体において速やかに加水分解されてアリルアルコールが生成することが示されている（Auerbach et al., 2008）。NTP の 90 日間強制経口投与試験により、12 mg/kg bw/day から用量依存的に肝臓への毒性影響が認められた。肝毒性が出現したのと同じ用量で前胃の上皮過形成が認められた（NTP, 2006）。ただし、前胃における影響は強制経口投与試験でのみ見られると予想される局所的な接触による刺激影響であるため、潜在的な全身毒性を評価するこの事例研究の範囲外とした。Butyl methacrylate は *in vivo*の代謝データは見つからなかったが、6 週間強制経口投与試験により、100 mg/kg bw/day から用量依存的に脾臓への毒性影響が認められた。

二つの類似物質の代謝や分子プロファイル、毒性影響とそのレベルの比較解析により、対象物質の allyl methacrylate の毒性影響は、代謝物のアリルアルコールの肝毒性影響が最もクリティカルである可能性が考えられた。したがってこのケースでは、“加水分解によりアリルアルコールを生成する脂肪族アリルエステルカテゴリー”に属する物質が類似物質として適当であると考えられる。Allyl acetate からのリードアクロスにより、90 日間反復投与毒性試験における NOAEL は約 8 mg/kg bw/day (0.06 mmol/kg bw/day) と推定された（表 2）。

表 2. Allyl methacrylate とその類似物質のデータマトリックス

Target/Source	Target	Source 1	Source 2
Structure			
Chemical name	Allyl methacrylate	Allyl acetate	Butyl methacrylate
CAS No.	96-05-9	591-87-7	97-88-1
Study information Protocol		Rat (F344/N) 6, 12, 25, 50, 100 mg/kg bw/day, 13 weeks Gavage NTP protocol similar to	Rat (SD) 30, 100, 300, 1000 mg/kg bw/day, 6 weeks Gavage OECD TG422

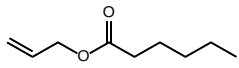
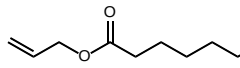
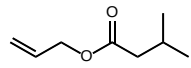
		OECD TG408	
Data source		NTP, 2006	MHLW, 1998
Major observed findings		TP ↓ : ≥12 ♀ Alb ↓ : ≥12 ♀ ALT ↑ : ≥50 ♂ ♀ Absolute Liver weight ↑ : 50 ♀ Relative Liver weight ↑ : 50 ♀ Liver-Hepatocyte, hypertrophy: ≥25 ♂ ♀ Liver-Hepatocyte, necrosis: ≥50 ♂ ♀ Liver-Bile duct, hyperplasia: ≥50 ♂ ♀ Liver-Portal, fibrosis: ≥50 ♂ ♀	Body weight ↓ : 1000 ♂ Food consumption ↓ : 1000 ♂ urine occult blood: 1000 ♂ BUN ↑ : 1000 ♂ Absolute spleen weight ↓ : ≥100 ♂ Relative spleen weight ↓ : ≥100 ♂ spleen/red pulp-atrophy: ≥100 ♂
POD		NOAEL: 6 mg/kg bw/day (0.06 mmol/kg bw/day)	NOAEL: 30 mg/kg bw/day (0.21 mmol/kg/day)
Critical toxicity and estimated POD	Hepatotoxicity NOAEL: 7.6 mg/kg bw/day (0.06 mmol/kg bw/day)		
Observed metabolites	Allyl alcohol Methacrylic acid (<i>in vitro</i>) Freidig et al., 2001	Allyl alcohol Acetic acid (<i>in vivo</i>) Auerbach et al., 2008	Not available
HESS <i>in vivo</i> rat metabolism simulator	Allyl alcohol Methacrylic acid	Allyl alcohol Acetic acid	Butanol Methacrylic acid
HESS profiling (Protein binding)	SN2 reaction Michael addition	SN2 reaction	Michael addition
DEREK alert	O-Allyl compound or acrolein (hepatotoxicity) Alpha, beta-unsaturated ester (irritant)	O-Allyl compound or acrolein (hepatotoxicity)	Alpha, beta-unsaturated ester (irritant)

続いてリードアクロスの不確実性の解析を行った。Allyl acetate の反復投与毒性試験は米国 NTP プロトコルに従って実施された。観察された肝毒性影響は用量依存的であり、リードアクロスに用いる類似物質の試験データとして信頼性は高い。しかし、ターゲット物質の allyl methacrylate は、ソースアナログとした allyl acetate よりやや疎水性が高いため bioavailability が向上し、毒性を過小に予測評価する懸念がある。また、1 個のソース物質からの類推 (one-to-one prediction) より数個のソース物質からの類推 (many-to-one prediction) の方が不確実性は小さい。そこで、“加水分解によりアリルアルコールを生成する脂肪族アリルエステルカテゴリー”について、PubMed、Hazardous Substances Data Bank (HSDB)、Google を用いて毒性データをさらに検索したところ、allyl hexanoate、allyl heptanoate、allyl isovalerate について 13-17 週間試験のデータが得られた (表 3)。実施時期がやや古くテストガイドライン試験に準拠していない試験が含まれるものの、肝臓への影響としていずれも肝細胞肥大、肝細胞変性・壊死、繊維化、胆管増生などの病理所見が観察され、NOAEL 値は 0.1-0.4 mmol/kg bw/day であった。カテゴリー物質は、カルボン酸部分の構造の違いがあっても主要な毒性とそのレベルには類似性があることが確認された。一方、allyl methacrylate のもう一方の代謝物である methacrylate は、吸入毒性試験のデータのみ利用でき、鼻腔粘膜など接触部位での刺激影響が認められた (OECD, 2002a)。

最もシンプルなメタクリル酸エステルである methyl methacrylate は、OECD SIDS Initial Assessment Profile において、詳細なデータは公開されていないものの、ラットの反復経口投与毒性試験において NOAEL が 200 mg/kg bw/day と報告されている (OECD, 2002b)。Methacrylate の肝毒性影響の可能性を排除することはできないが、allyl alcohol のそれよりは小さいと考えられる。

対象物質は 6 週間の強制経口投与の試験結果、60 mg/kg bw/d で肝細胞の変性壊死、肝線維化等の肝毒性所見が認められており、NOAEL 値は 15 mg/kg bw/d (0.11 mmol/kg bw/day) であった (ECHA, 2007)。予測結果と実測結果の間に大きな違いはなく、リードアクロスによる主要な毒性影響と NOAEL 値の類推の妥当性が確認された。

表 3. 追加収集した Allyl methacrylate の類似物質のデータマトリックス

Target/Source	Source 3	Source 4	Source 5
Structure			
Chemical name	Allyl hexanoate	Allyl heptanoate	Allyl isovalerate
CAS No.	123-68-2	142-19-8	2835-39-4
Study information	Rat (Osborne-Mendel) 15, 65, 100 mg/kg bw/day, 17 weeks Gavage	Rat (Osborne-Mendel) 1000, 2500, 10000 ppm, 17 weeks, Feeding	Rat (F344/N) 15, 31, 62, 125, 250 mg/kg bw/day, 13 weeks Gavage
Data source	JECFA (1991)	JECFA (1991)	NTP (1983)
Major observed findings	Liver-Bile duct proliferation: ≥ 65 ♂ ♀ Liver-Fibrosis: 100 ♂ ♀ Liver-Necrotic foci: 100 ♂ ♀	Liver-Hydropic degeneration, hepatocyte, periportal: ≥ 1000 ♂ ♀ Liver-New bile duct formation: ≥ 1000 ♂ ♀ Liver-Hepatic cell enlargement: ≥ 1000 ♂ ♀	Liver-Basophilic cytoplasmic change: ≥ 62 ♂, ≥ 125 ♀ Liver-Multifocal coagulative necrosis: 250 ♂ ♀ Liver-Cholangiofibrosis: 250 ♂ ♀ Liver/bile duct-Hyperplasia: ≥ 125 ♂ ♀
POD	NOAEL: 15 mg/kg bw/day (0.096 mmol/kg bw/day)	NOAEL: 1000 ppm (0.4 mmol/kg bw/day)	NOAEL: 31 mg/kg/d (0.22 mmol/kg bw/day)
POD (predicted) Critical toxicity			
Observed metabolites	Allyl alcohol Hexanoic acid (<i>in vitro</i>) Longland et al., 1977	Not available	Allyl alcohol Isovaleric acid (<i>in vitro</i>) Butterworth et al., 1975
HESS <i>in vivo</i> rat metabolism simulator	Allyl alcohol Hexanoic acid	Allyl alcohol Heptanoic acid	Allyl alcohol Isovaleric acid
HESS profiling (Protein binding)	SN2 reaction	SN2 reaction	SN2 reaction
DEREK alert	O-Allyl compound or acrolein (hepatotoxicity)	O-Allyl compound or acrolein (hepatotoxicity)	O-Allyl compound or acrolein (hepatotoxicity)

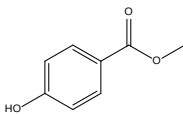
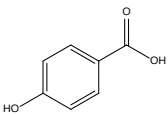
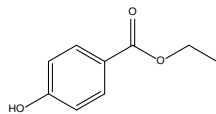
<事例研究 2 : 4-hydroxybenzoic acid, methyl ester>

スクリーニングレベルでのハザード評価を目的に、4-hydroxybenzoic acid, methyl ester の反復投与毒性エンドポイント（主要な毒性影響と NOAEL）のデータギャップを補完するリードアクロスを行った。対象物質の CAS No. を HESS に入力し、“Profiling”を行うと

生体高分子との反応性のアラートは認められなかった。代謝シミュレーションを行うと 4-hydroxybenzoic acid と methanol が得られた。さらに、DEREK でも毒性アラートは認められなかった。分子全体の類似性、官能基、代謝を考慮して試験済みの類似物質の抽出を試みたところ、4-hydroxybenzoic acid が得られた (MHLW, 1997)。さらに、研究項目 (1) で構築したデータベースから同様に類似物質を検索したところ、4-hydroxybenzoic acid, propyl ester が得られた (ECHA, 2012)。両物質の試験は、いずれも OECD テストガイドライン試験 (TG422) であり、前者は強制経口投与により一般状態と血液生化学パラメータのわずかな変動が認められ、NOEL 値は 50 mg/kg bw/day であった。後者は混餌投与により最高用量で体重増加抑制と血液生化学パラメータのわずかな変動はあるが有意な変動が見られ、NOEL は 305 mg/kg bw/day であった。これらのソースアナログもタンパク質等生体高分子との反応性を示唆する構造アラートも認められず、また対象物質は類似物質との構造の違いにより強い毒性を引き起こすことはないと考えられることから、対象物質の NOEL 値は、物性がより類似する 4-hydroxybenzoic acid, propyl ester の NOEL 値に基づき、6 週間混餌投与試験で約 300 mg/kg bw/day と推定された (表 4)。対象物質の 6 週間混餌投与試験はなく、28 日間強制経口投与試験 (50, 250, 1000 mg/kg bw/day) で 1000 mg/kg bw/day で立毛、円背位、250 mg/kg bw/投与からラッセル音、あえぎ呼吸が認められており、NOEL 値は 50 mg/kg bw/day であった (ECHA, 2009)。

本事例のように利用できるソースアナログの数や、投与期間と経路が揃った試験数が少ないケースは多いと予想される。このような場合には、カテゴリー物質の毒性影響の類似性、すなわち構造の違いにかかわらず毒性が類似するとする正当化が制約される。したがってリードアクロスの信頼性は低くなる。不確実性として、類似物質が少ないことを明記するとともに、毒性レベルの推計は「高」「中」「低」のようにクラス分けすることにとどめるなど検討する必要があると考えられる。

表 4. 4-Hydroxybenzoic acid, methyl ester とその類似物質のデータマトリックス

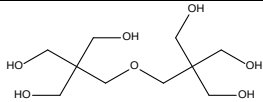
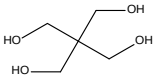
Target/Source	Target	Source 1	Source 2
Structure			
Chemical name	4-Hydroxybenzoic acid, methyl ester	4-Hydroxybenzoic acid	4-Hydroxybenzoic acid, propyl ester
CAS No.	99-76-3	99-96-7	94-13-3
Study information Protocol		Rat (SD) 0, 40, 200, 1000 mg/kg bw/day Gavage OECD TG422	Rat (RccHan TM :WIST) 0, 98, 305, 981 mg/kg bw/day Feeding OECD TG422
Data source		MHLW, 1997	ECHA, 2012
Observed findings		Rale: ≥200♂ salivation: 1000♂ rhinorrhoea: 1000♂ Weight gain ↓: 1000♂ Plt ↓: ≥200♂ TP ↓: 1000♂	Weight gain ↓: 981♂ TG ↑: 981♂

		A/G↑: 1000♂ GPT↑: 1000♂ GOT↑: 1000♂	
POD		NOEL: 40 mg/kg bw/day	NOAEL: 305 mg/kg bw/day
POD (predicted)	NOEL: c.a.300 mg/kg bw/day		
HESS <i>in vivo</i> rat metabolism simulator	4-Hydroxybenzoic acid, Methanol		4-Hydroxybenzoic acid, Propanol
HESS profiler (DNA binding) (Protein binding)	No alert found	No alert found	No alert found
DEREK alert	No alert found	No alert found	No alert found

<事例研究 3 : dipentaerythritol>

対象物質の CAS No. を HESS に入力し、官能基、化学反応性、構造類似性等を考慮して類似物質の抽出を試みたところ、pentaerythritol (115-77-5) が得られた。両物質は部分的に共通構造を有しているが、分子全体の形状やサイズにおいて類似度は高くなく、代謝に関しても実測のデータはない。“Profiling”によって両物質ともタンパク質等生体高分子との反応性を示唆する構造アラートは認められず、DEREK Nexus でも、既知の構造アラートは認められなかった。化学反応性は低く、毒性は強くないと推定された (表 5)。対象物質は 6 週間の強制経口投与試験の結果、1000 mg/kg bw/day で体重の減少が認められており、NOEL 値は 500 mg/kg bw/day であった (ECHA, 1992)。しかし、類似物質の数が限定されており、ADME に関する情報も利用できないことから、類似性を正当化する情報が不足していると考えられる。収集したデータは優先順位付けの情報としては利用可能であるが、ハザード評価のためには類似物質を別途広範囲で検索する、キネティクス of データを取得するなど、追加の情報が必要であると考えられた。

表 5. Dipentaerythritol とその類似物質のデータマトリックス

Target/Source	Target	Source
Structure		
Chemical name	Dipentaerythritol	Pentaerythritol
CAS No.	126-58-9	115-77-5
Study information Protocol		Rat (SD) 100, 300, 1000 mg/kg bw/day Gavage OECD TG422
Data source		MHLW, 1996
Observed findings		Loose stool: >300♂ Diarrhea: >300♂
POD		NO(A)EL: 100 mg/kg bw/day
POD (predicted)	NO(A)EL not estimated, but likely low toxicity	
HESS profiler (DNA binding) (Protein binding)	No alert found	No alert found
DEREK alert	No alert found	No alert found

<事例研究 4 : セルロース誘導体>

リードアクロスは構造活性相関 SAR と同様、陽性予測と比べて陰性予測は難しいとされる。未だ同定されていない毒性アラート構造が存在する可能性がある以上、毒性アラート構造が見つからないということは陰性予測の根拠として不十分であるためである。陰性予測には、生体に吸収されない、あるいは生体内で完全に無毒性の物質に代謝分解されるなどのように、毒性を発現しないメカニズムを根拠として示す必要がある。評価対象物質は、類似の無毒性物質と構造の違いがあっても実質的に同等の理由で毒性が懸念されないことを示す必要がある。

セルロースは、多くの食品に含まれる植物起源の成分である。FDA では GRAS (Generally Recognized As Safe) のリストに収載されている。すなわち、毒性データの有無に関わらず、長年の食経験や科学的な知見などを総合して評価した場合に、食品添加物としての使用に際立ったリスクがない、とみなされた物質として扱われている。セルロースはヒトの消化管で事実上吸収されず、吸収性の分解物はほとんどまたはまったく産生しないためと考えられる。EU 物質の毒性情報の精査において、他のセルロース誘導体も毒性影響は認められていない試験データがあることから、毒性試験データがないセルロース誘導体について、消化管からの吸収性がなく吸収性の分解物の産生がほとんどないと考えられる場合には、セルロースと同レベルあるいはそれ以下で使用される限り、毒性の懸念は無視できると考えられる。ただし、特定のデータが存在し、セルロースと GRAS リストに含まれるいくつかのセルロース誘導体と分類が異なる可能性がある場合には、各物質について毒性を個別の検討する必要がある。

表 6 には、EU 物質のうち、FDA の GRAS としてリスト化されている物質のリストを示す。ターゲット物質は、類似の GRAS 物質と構造の小さな違いがあっても実質的に同等の理由で毒性が懸念されないことが示されれば、低毒性であると推測される。長鎖脂肪酸、有機酸、糖アルコール、天然多糖類やワックスなどはカテゴリーとしてグループ化できる可能性がある。

表 6. EU 物質のうち FDA の GRAS リストに掲載されている物質

CAS No.	Chemical Name	GRAS
50-70-4	sorbitol	○
50-81-7	ascorbic acid	○
50-99-7	glucose	○
56-81-5	glycerol	○
57-11-4	stearic acid	○
57-13-6	urea	○
57-50-1	sucrose	○
57-55-6	1,2-propanediol	○
60-33-3	linoleic acid	○
64-18-6	formic acid	○
64-19-7	acetic acid	○
65-85-0	benzoic acid	○
77-92-9	citric acid	○
79-09-4	propionic acid	○
87-69-4	tartaric acid	○
94-13-3	4-hydroxybenzoic acid, propyl ester	○
96-33-3	acrylic acid, methyl ester	○
99-76-3	4-hydroxybenzoic acid, methyl ester	○
110-15-6	succinic acid	○
110-44-1	sorbic acid	○
112-80-1	oleic acid	○
121-79-9	gallic acid, propyl ester	○
123-28-4	thiodipropionic acid, didodecyl ester	○
124-04-9	adipic acid	○
124-07-2	caprylic acid	○
124-38-9	carbon dioxide	○

CAS No.	Chemical Name	GRAS
128-37-0	2,6-di-tert-butyl-p-cresol	○
137-66-6	ascorbyl palmitate	○
140-88-5	acrylic acid, ethyl ester	○
1302-78-9	bentonite	○
1305-62-0	calcium hydroxide	○
1309-48-4	magnesium oxide	○
1310-58-3	potassium hydroxide	○
1310-73-2	sodium hydroxide	○
1314-13-2	zinc oxide	○
1323-39-3	1,2-propyleneglycol monostearate	○
1332-37-2	iron oxide	○
1332-58-7	kaolin	○
1336-21-6	ammonium hydroxide	○
1401-55-4	tannic acids	○
6915-15-7	malic acid	○
7631-90-5	sodium bisulphite	○
7647-01-0	hydrochloric acid	○
7664-38-2	phosphoric acid	○
7664-93-9	sulphuric acid	○
7681-11-0	potassium iodide	○
7757-83-7	sodium sulphite	○
7773-01-5	manganese chloride	○
8001-39-6	japan wax	○
8015-86-9	carnauba wax	○
9000-01-5	gum arabic	○
9000-11-7	carboxymethylcellulose	○
9000-30-0	guar gum	○
9000-65-1	tragacanth gum	○
9000-69-5	pectin	○
9000-70-8	gelatin	○
9000-71-9	casein	○
9004-34-6	cellulose	○
9004-57-3	ethylcellulose	○
9004-67-5	methylcellulose	○
9005-37-2	1,2-propyleneglycol alginate	○
9049-76-7	hydroxypropyl starch	○
10043-84-2	manganese hypophosphite	○
14807-96-6	talc	○
14808-60-7	quartz	○
21645-51-2	aluminium hydroxide	○
25013-16-5	tert-butyl-4-hydroxyanisole	○
61790-53-2	diatomaceous earth	○

<事例研究 5：メタクリル酸共重合体>

器具容器包装関連物質にはアクリル酸やメタクリル酸等のポリマーがリスト化されている。化学構造が特定できない物質に対して、基本的にリードアクロスの適用は不可である。ただし、以下のようなケースと類似する場合には、対象ポリマーの毒性試験データがなくとも、リードアクロスあるいは Weight of Evidence の考え方を適用してハザード評価を検討できる可能性がある。

アニオン性メタクリレート共重合体（AMC；CAS 26936-24-3）は、モノマーのメタクリル酸、メタクリル酸メチル、アクリル酸メチルからモル比 7：3：1 で製造された共重合体である。AMC は、欧州食品安全機関（EFSA）によって評価されており、欧州連合 EU での食品添加物としての使用が承認されている（WHO, 2019）。

Good Laboratory Practice (GLP) 準拠の研究では、AMC のラットの 26 週間経口投与試験、イヌの 4 週間経口試験においていずれも最高用量で毒性影響は認められなかった。AMC が最大 2% のオリゴマー画分を含み、すべての構成オリゴマーの分子量範囲の下限は 1000 Da を超え、オリゴマー画分の約 75% が 5000～10000 Da の分子量を持っているため、オリゴマーが消化管から吸収される可能性は低い。ラットに投与された放射性標識 AMC は糞便中に排泄され、平均回収率は 72 時間後の総投与量の 92.38%、投与後 10 日で総投与量の 94.07%（±3.42%）に達する。したがって、オリゴマーの毒性学的側面は考慮されなかった。他のアクリル酸やメタクリル酸ポリマーについても、構成オリゴマーの分子量範囲の下限が

1000 Da を超えると確認できる場合には、同等に毒性学的懸念はないと考えられる。

一方、AMC の評価においては、残留モノマーは低分子量であり、したがって胃腸管から吸収される可能性が高いため、AMC 自体のデータだけでなく、残留モノマー（アクリル酸メチル、メタクリル酸メチル、メタクリル酸）の暴露、ADME、長期毒性データが評価された。したがって他のポリマーについても、残留モノマーを同定し、同様の評価を行うことが必要になる。

3. 2 構造活性相関モデルの適用に関する検討

構造活性相関モデルの適用に関する検討では、研究項目（1）より反復毒性試験情報の得られた食品用器具包装に用いられる EU 物質（FCM データ）について、既存情報をもとにした化学構造の類似性に基づく毒性値（NO(A)EL 値）の類推評価について検討を行った。評価対象として欧州委員会規則 No. 10/2011 および米国連邦規則集 21CFR に収載されている器具容器包装関連物質のうち、新たに反復投与毒性試験に関する試験情報が入手できた 107 物質のうち、構造類似度や構造記述子の計算が可能であった 105 物質（以下、FCM）について、既存化学物質点検で反復投与試験が実施された 326 物質（以下、Kizon）と Munro らにより cramer rule の検証に用いられた 613 物質（以下、Munro）の 2 つのデータセットにおける構造類似物質を探索してそれぞれの NO(A)EL 値の比較を行った。

構造類似物質の探索に先立って、各データセットのケミカルスペースがどの程度一致しているかについて logP など化学構造から計算可能な 119 種の構造記述子を用いた主成分分析により評価を行った。図 1 に FCM と Kizon、FCM と Munro の各データセットの比較結果を示した。

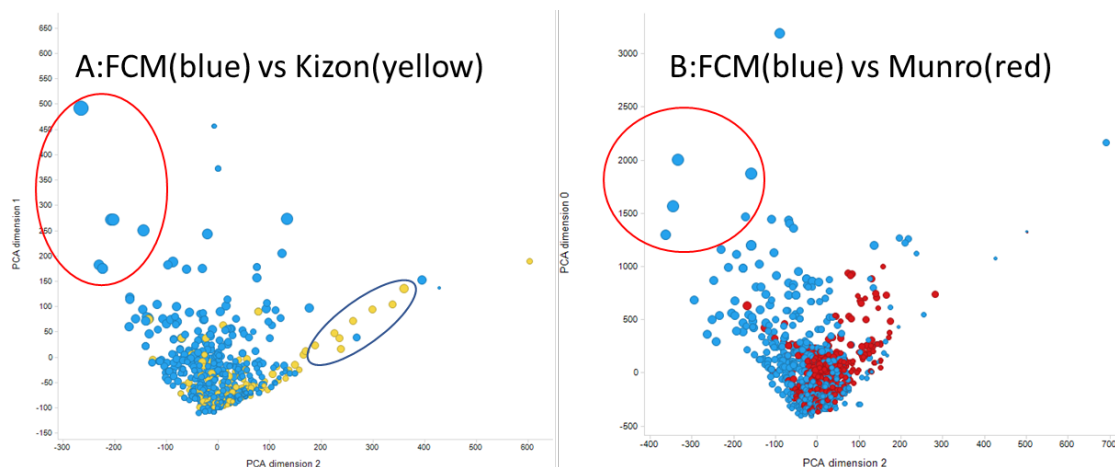


図 1 Kizon、Munro データセットと FCM データセットのケミカルスペースの比較

FCM データセットには、Kizon、Munro いずれのデータセットと比較してケミカルスペースの異なる物質群（図 1 の赤丸で示す部分）が含まれることが明らかであり、これらの物質は両データセットには構造類似物質が無い可能性が示唆された。図 1 の赤丸の領域には、図 2 で示すような比較的高分子の特徴的な構造の物質が含まれていたことから、FCM データセ

ット内では構造類似物質の探索が可能であると思われた。一方、Kizon データセットには、青丸で示す FCM データセットから明らかに外れる物質群が含まれており、これらの物質は、いずれも図 3 に示すような高フッ素化脂肪酸（PF0A）であった。

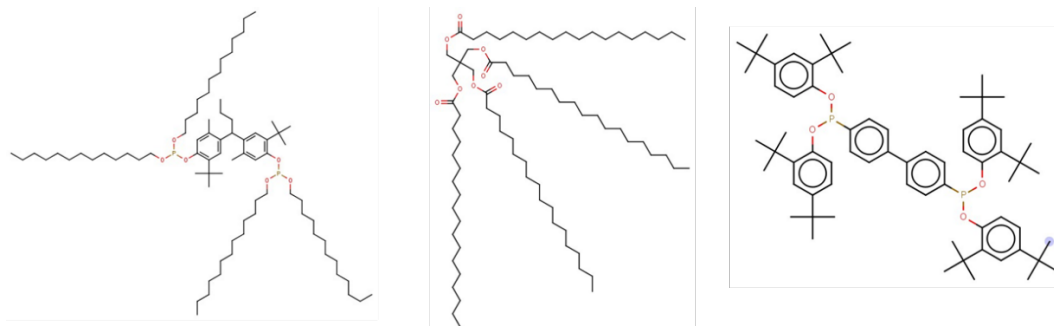


図 2 Kizon、Munro データセットのケミカルスペースから外れた FCM 物質の代表例



図 3 Kizon データセットに含まれる特徴的な化合物（PF0A）の代表例

毒性評価を行う際の化学物質の類似性指標としては、化学構造全体の類似性以外に logP などの物理化学的性質の類似性、生物学的反応性の類似性があげられる（図 4）。そのうち生物学的反応性の類似性については、近年ではハイスループット in vitro アッセイデータなどを用いるアプローチが報告されているが、従来は特定の生物反応性を有する置換基や部分構造（いわゆる毒性アラート）の有無は、この観点で用いられているといえる。

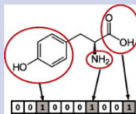
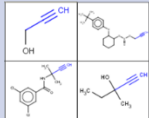
Structural Similarity 化学構造全体の類似性	Molecular Fingerprint 
Physicochemical Similarity 物理化学的性質の類似	Descriptor • Molecular Weghit • logP • TPSA ...etc
Biological Similarity 生物活性を有する部分構造の有無	毒性アラートの有無 

図 4 化学物質の毒性評価における類似性の指標

非発がん TTC の化学物質分類に用いられている cramer 分類は、化学構造に関する複数の質問の結果をもとに化学物質を毒性の強さの違う 3 クラスに分類を行う決定木であることから、生物学的反応性の類似性に関する指標として有用であると考え、まず初めに cramer 分類クラスと、化学物質の物性指標である logP と毒性試験における NOEL の関係について、FCM、Kizon、Munro のそれぞれのデータセットにおける比較を行った (図 5)。図 5 の上段から、FCM、Kizon、Munro データセットにおける無毒性量 (縦軸: Log (NOAEL)) の SlogP (横軸: 計算値) に対する分布を cramer クラス (左からクラス 3, 2, 1) ごとにプロットしたものである。いずれのデータセットでも毒性の強い化学物質群は cramer クラス 3 に含まれることから cramer 分類が有効に機能していると判断された。またクラス 3 物質の中でも、SlogP=2 前後の物質で NOEL が小さい傾向がいずれのデータセットでも共通に認められた。さらに、図 5 のプロットのドットサイズは、分子量を示しており、分子量の大きい物質では NOAEL が高くなる傾向があるものの、分子量が大きく SlogP も 10 以上であるにも関わらず NOAEL の小さい物質が既存化学物質および FCM データいずれでも認められた。そのような物質のうち、FCM データの枠①で囲った物質は、Sn 元素を有する樹脂原料 (図 6) であり、金属元素を有するため cramer rule の適用範囲外の物質であった。また、既存化学物質の枠②で囲った物質群は、図 3 に示す PFOA 類であり、生体蓄積性が高く、核内受容体を介した毒性が示唆されており、他の化学物質とは異なる特異的な毒性影響を示したものと想定される。

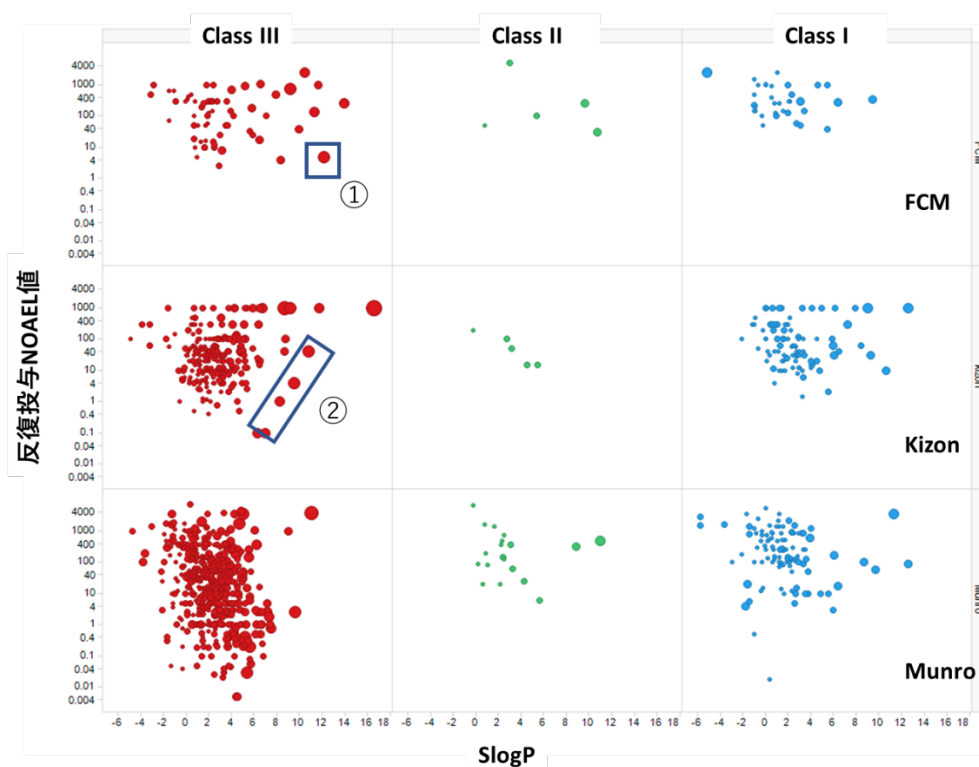


図 5 cramer 毒性分類クラスごとの化学物質の logP と NOEL の関係

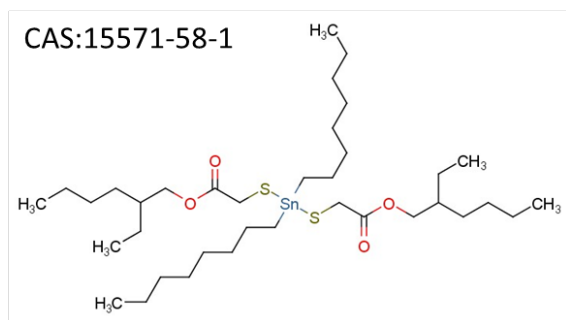


図6 Sn 元素を有する樹脂原料

次に FCM105 物質について、Kizon および Munro データセットにおける構造類似物質の検索を行い、構造類似性と NOEL の近似について評価を行った。構造類似度の計算に用いる fingerprint および構造類似度の指標には幾つかの手法が用いられているが、今回の解析では予備解析の結果から比較的幅広く類似物質の検索が可能であった組み合わせ (extended fingerprint, 距離関数=dice) により、類似度計算を行った (図7)。類似度 0.7 以上の構造類似物質が 3 つ以上探索された FCM の割合は、Kizon、Munro いずれのデータセットにおいても 6 割に満たなかったものの、両データセットをあわせることで約 75% (78/105 物質) の物質で類似度 0.7 以上の構造類似物質が 3 物質以上探索された。一方、図8に示す 13 物質については、いずれのデータセットにも構造類似物質は認められなかった。これらの物質は、今回、評価に用いた 2 つのデータセットからの類推評価の適用範囲外物質である。

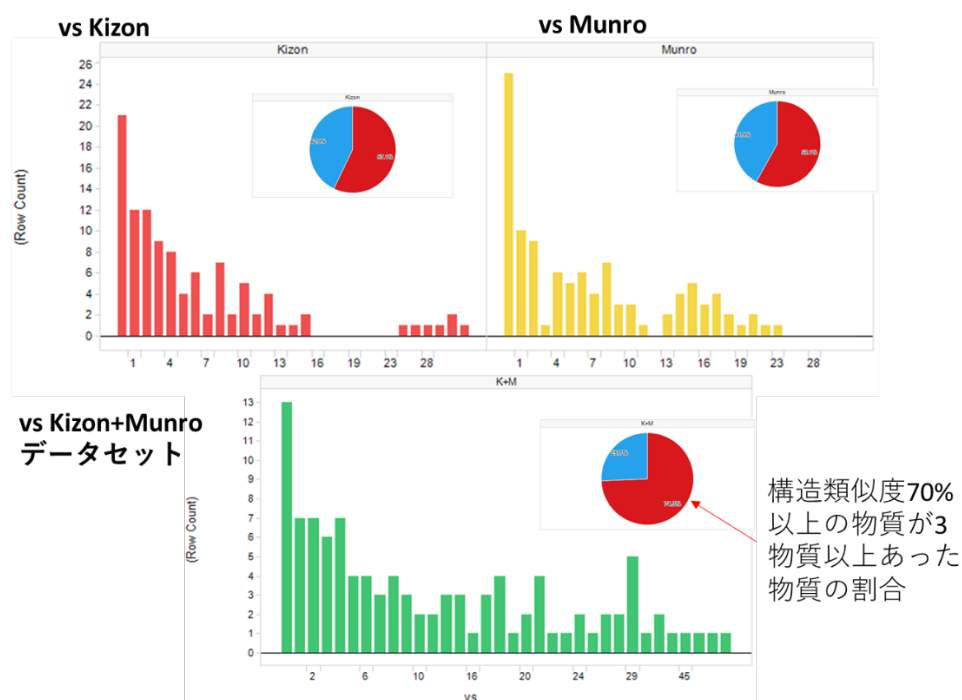


図7 FCM105 物質に対する Kizon、Munro データセット中の構造類似物質数 (類似度 0.7 以上)

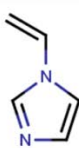
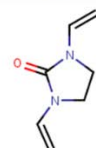
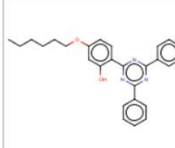
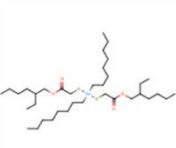
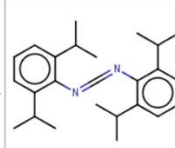
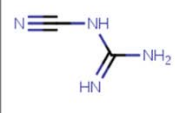
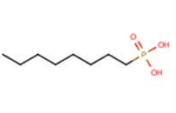
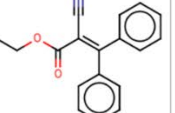
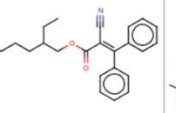
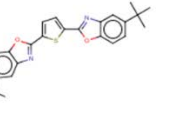
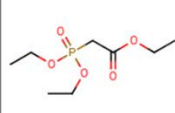
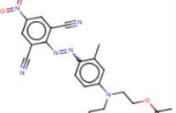
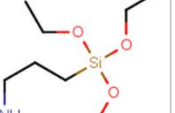
 CAS: 1072835 NOAEL: 5 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 13811502 NOAEL: 50 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 147315502 NOAEL: 1090 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 15571581 NOAEL: 5 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 2162745 NOAEL: 4 Cramer rules: High (Class III)
 CAS: 461585 NOAEL: 625 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 4724485 NOAEL: 12 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 5292995 NOAEL: 900 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 6197304 NOAEL: 175 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 7128645 NOAEL: 500 Cramer rules: High (Class III)
 CAS: 867130 NOAEL: 1000 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 9004573 NOAEL: 903 Cramer rules: High (Class III)	 CAS: 919302 NOAEL: 200 Cramer rules: High (Class III)		

図8 いずれのデータセットにも構造類似物質がなかった FCM13 物質

評価対象物質と構造類似物質の NOEL 値を比較した結果の一部を図9に示す。図9中の各パネルで右端の●が評価対象の FCM、■が FCM、◆が Kizon、▲が Munro それぞれのデータセットにおける類似物質である。また、プロットの色は cramer 分類クラス (赤: クラス 3、緑: クラス 2、青: クラス 1) を示す。なお、NO(A)EL 値は、FCM の毒性情報は基本的に 90 日間試験であるのに対して、既存物質の毒性試験は、28 日間試験もしくは生殖発生併合試験であることから、UF=3 で補正した値である。また、一部の試験結果では、NOEL が得られておらず LOEL 値を採用した場合は、UF=10 で補正をしている。Munro データセットについては、Munro らにより計算された慢性曝露の NO(A)EL 値を示している。全体として類似度が高く cramer クラスが同一の物質で NO(A)EL 値が近い値を示す傾向が示された。

次に毒性情報が得られた FCM のうち比較的毒性が強い (NO(A)EL 値が 10mg/kg/day 以下と報告されている) 物質 (図10) について構造類似物質からの反復投与毒性評価の可能性について検討を行った。図10中赤枠で示した2物質には Kizon データセットに、青枠の3物質については Munro データセットに構造類似物質が認められたが、これら3物質はそれぞれ構造類似物質であり、NO(A)EL 値も近い値であった。残りの3物質は図8に含まれる適用範囲外物質であった。これらのうち、CAS:15571-58-1 は、Sn を含む特徴的な物質であり NOEL=5mg/kg/day と毒性が比較的強く、EU の FCM リスト中には、同様に Sn を含む類似物質が複数あることから、それらについても同程度の毒性が懸念される。

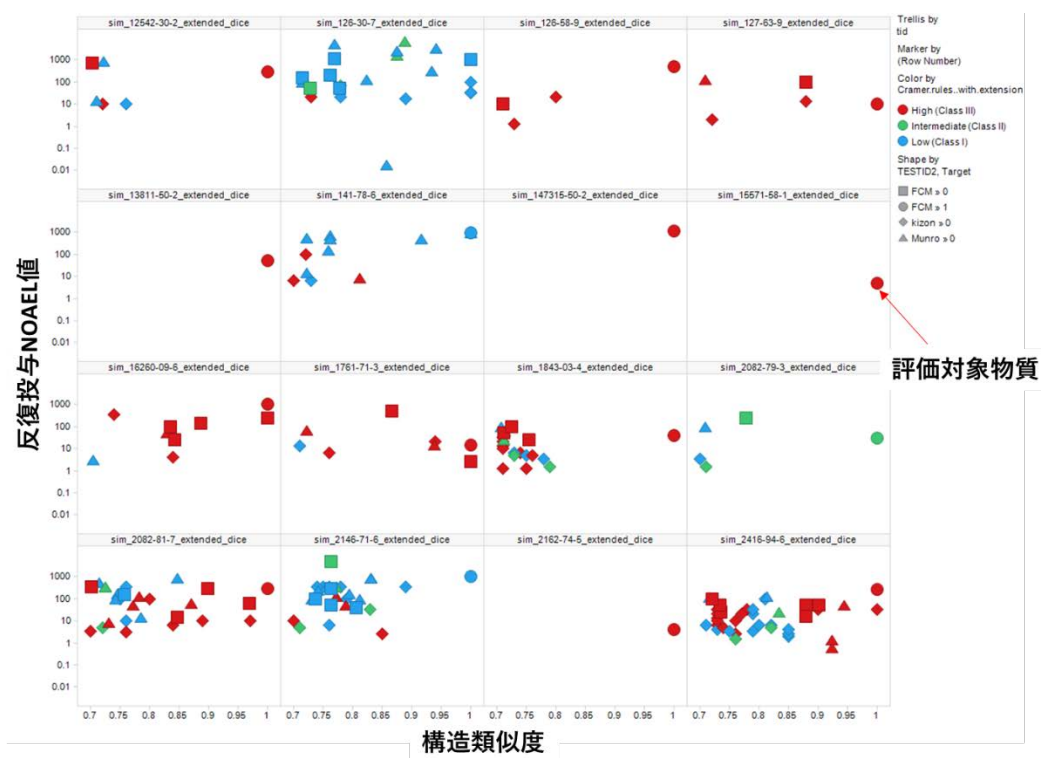
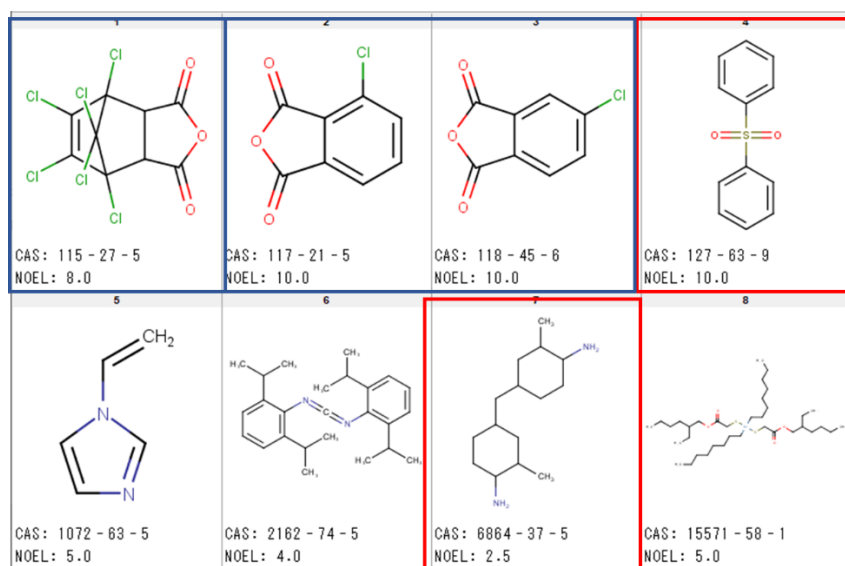


図9 評価対象物質（各パネルの●）と構造類似（類似度 0.7 以上）物質の構造類似度と NOEL の関係



青枠: Munro物質に構造類似物質があった化合物
 赤枠: 既存化学物質に構造類似物質があった化合物

図10 比較的毒性の強い (NO(A)EL=10mg/kg/day 以下) FCM

構造類似物質が探索された CAS:127-63-9 と CAS:6864-37-5 について、それぞれの毒性試験で認められた主な毒性所見を含む詳細な情報を解析した結果を図11、図12に示した。

表中の NOEL_補正值は、前述の毒性試験期間や NOEL が得られていない場合の補正を行った値である。図 1 1 に示す CAS:127-63-9 では、既存物質中 2 物質、FCM 中 1 物質が探索され、そのうち CAS:80-09-1 に関しては既存物質 k0192 と同一物質であり毒性試験情報は別の試験であった。FCM データについて得られた毒性試験では、NOEL 100 未満であった。類似物質 3 物質では、いずれの物質とも cramer クラス 3 に分類され、毒性所見として刺激性に起因すると思われる所見が認められており NOEL_補正值は、2~13.3mg/kg/day であった。一方、logP 値は、K316 では評価対象物質と乖離するため、評価用物質としては適切ではない可能性もある。結果として評価対象物質では毒性所見に若干の違いはあるものの NOEL 値は、これら類似物質の情報から類推可能であった。一方、CAS:6864-37-5 については、既存物質 2 物質、FCM2 物質が探索された。いずれの物質とも cramer クラス 3 に分類されるが、k0066 と CAS:124-09-4 は、評価対象物質と logP 値が大きく異なり、特に CAS:124-09-4 は、化学構造自体が大きく異なっていることから評価に不適であると判断された。その他の 2 物質の NOEL_補正值は、6.67, 15mg/kg/day であり、毒性所見としては同じく FCM の CAS:1761-71-3 で評価対象物質と類似の所見が認められていた。これらの物質から評価される NOEL_補正值は、評価対象物質の NOEL 2.5mg/kg/day より若干高い値となるものの類推結果は概ね受け入れ可能と判断される。

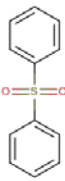
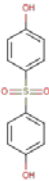
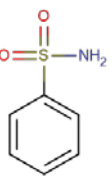
CAS	127639	80091	80091	98102
CID	127-63-9	80-09-1	k0192	k0316
SMILES				
TESTID	FCM	FCM	1	1
similarity	1	0.88	0.88	0.72
LogP	2.93	2.32	2.32	0.58
Mol Weight	218.27	250.27	250.27	157.19
Cramer class	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)
NOEL_報告	10	100	40	6
NOEL_補正值	10	10	13.33	2
phenoype	RBC ↓, HGB ↓, HCT ↓, 肝重量 ↑, 肝:肥大	(NOEL<100), 流涎, Cho ↓, 腎重量 ↑	腎重量 ↑, 尿pH ↓, 尿タンパク ↑, 尿中ウロビリノーゲン ↑ 盲腸:粘膜の過形成・びらん・粘膜上皮の単細胞壊死	流涎, 自発運動量 ↓, 膀胱:移行上皮の単純性過形成

図 1 1 CAS:127-63-9 と構造類似物質の毒性情報の比較

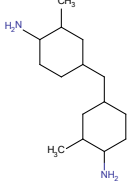
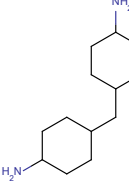
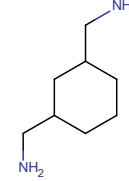
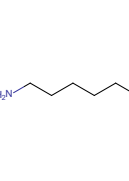
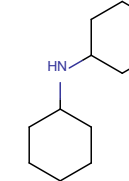
CAS	6864375	1761713	2579206	124094	101837
CID	6864-37-5	1761-71-3	k0066	124-09-4	k0173
SMILES					
TESTID	FCM	FCM	3	FCM	1
similarity	1	1	0.94	0.87	0.76
LogP	2.74	2.01	0.31	0.04	3.41
Mol Weight	238.42	210.37	142.25	116.21	181.32
Cramer class	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)
NOEL_報告	2.5	15	60	500	20
NOEL_補正值	2.5	15	20	500	6.67
phenoype	肝・腎重量↑, 心筋変性, 腎:尿細管空胞変性	腺胃:空胞化, 肝:空胞化, 骨格筋線維変性	流涎, 副腎重量(絶対)↑, ALP, ALT ↑ 精巣上体:管内精子消失, 精巣:精細管の萎縮, 前胃:限局性炎症性細胞浸潤	ND	流涎, 痙攣, 卵巣重量↓

図 1 2 CAS:6864-37-5 と構造類似物質の毒性情報の比較

Munro データセットに類似物質が認められた 3 物質については、詳しい毒性所見の情報が得られなかったため物性と毒性 (NO(A)EL) の比較を行った。CAS:115-27-5 (図 1 3) については、4 物質が構造類似物質として探索され、cramer クラスはいずれも評価対象物質と同じクラス 3 であった。そのうち、115-28-6 および 57-74-9 は、LogP もしくは LogD 値が評価対象物質と大きく異なり類推評価に不適と判断された。残り 2 物質の NO(A)EL 値は評価対象物質に比べ非常に小さい値であるが、これは Munro データセットにおける NO(A)EL 値が慢性曝露換算値であることも一因と考えられることから、結果は妥当であり受け入れ可能と考えられた。

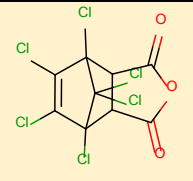
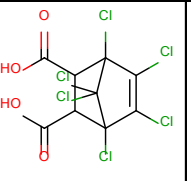
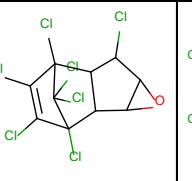
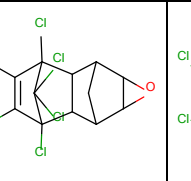
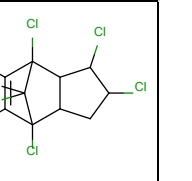
CAS	115275	115286	1024573	60571	57749
SMILES					
NOEL	8.000	70.000	0.250	0.005	0.055
similarity	1.000	0.891	0.856	0.825	0.709
Target	1	0	0	0	0
TESTID	FCM	Munro	Munro	Munro	Munro
Cramer class	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)
LogP	3.162	3.027	4.044	3.947	5.270
LogD	3.162	-3.177	4.044	3.947	5.270
Molecular weight	367.814	385.824	385.816	377.871	405.798

図 1 3 CAS:115-27-5 と構造類似物質の物性、NO(A)EL の比較

一方、図 1 4 に示す CAS:117-21-5, 118-45-6 では、5 物質が構造類似物質として探索されたが、そのうち 3 物質は cramer クラスが評価対象物質と異なり、また残りの 2 物質は LogP 値が評価対象物質とは、大きく異なることから類推評価に不適と判断され、結果として今回探索された構造類似物質からの反復投与毒性の類推は不可と判断された。評価対象の 2 物質は、ハロゲン (-Cl) を含む物質であるが、探索された構造類似物質のうち 4 物質はハロゲンを含んでおらず毒性に寄与する置換基を含む物質については、全体構造のみではなくその置換基の有無も含めた構造類似物質の探索が重要であることが示された。

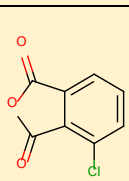
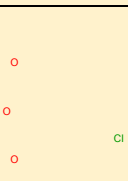
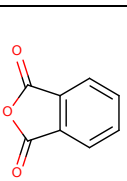
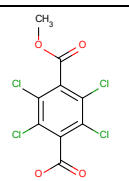
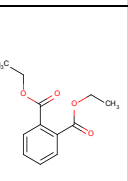
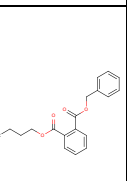
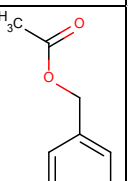
CAS	117215	118456	85449	1861321	84662	85687	140114
SMILES							
NOEL	10	10	592	50	2218	1228	510
similarity	1.000	0.938	0.850	0.817	0.750	0.724	0.713
Target	1	0	0	0	0	0	0
TESTID	FCM	FCM	Munro	Munro	Munro	Munro	Munro
Cramer class	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)	High (Class III)	Low (Class I)	Low (Class I)	Low (Class I)
LogP	2.027	2.027	1.423	4.396	2.694	5.029	1.647
LogD	2.027	2.027	1.423	4.396	2.694	5.029	1.647
Molecular weight	181.977	181.977	148.016	329.902	222.089	312.136	150.068

図 1 4 CAS:117-21-5, 118-45-6 と構造類似物質の物性、NO(A)EL の比較

以上の結果から、化学構造類似度を指標として全体構造の類似度から類似物質を探索して、cramer クラス分類による毒性類似性の評価、logP 値による物理化学的類似性評価を組み合わせることで、類推評価に適用可能な類似物質を簡易に探索可能であることを示している。CAS:117-21-5, 118-45-6 の例のように評価対象物質が毒性に寄与する置換基を含む場合には、類似物質探索においてその置換基の有無を加味することで評価に適した類似物質の絞り込みを行うことで、より正確な評価が可能になると考察された。最終的に類推評価を行うためには、探索された類似物質について、毒性試験で認められている毒性所見の検討や可能であれば毒性メカニズムの検討を行う、すなわちカテゴリーアプローチを行うことが必要であるが、本研究で示した戦略は、化学物質カテゴリーアプローチにおけるソース物質の探索において有用であると考えられる。

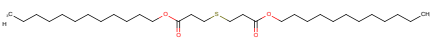
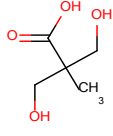
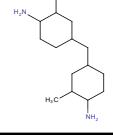
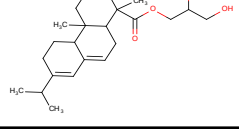
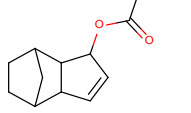
本研究では、FCM の反復投与毒性評価における構造類似物質検索対象として既存化学物質および Munro らによる Cramer 分類の検証物質データセットを用いたが、評価に適した構造類似物質の情報が得られない物質については類推評価は不可能であり、出来るだけ幅広いデータセットを対象として効率的に類似物質検索を行うことで類推評価可能な物質の増加と予測精度の向上が期待される。

CAS No.	Chemical Name	TDI ($\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$)	Data Source
51-52-5	6-N-Propyl-2-thiouracil	0.33	HESS
69806-40-2	Haloxypol methyl ester	3	Munro
60-57-1	Dieldrin	3	Munro
67-63-0	Isopropyl alcohol	3.6	Munro
14047-09-7	3,3',4,4'-Tetrachloroazobenzene	6.7	HESS
80657-17-6	17 α -hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one	8	Munro
2058-94-8	Perfluoroundecanoic acid	10	HESS
62-74-8	Sodium fluoroacetate	10	Munro
55331-29-8	Zeranol	12	Munro
298-00-0	Parathion-methyl	15	Munro
3846-71-7	2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole	17	HESS
36437-37-3	2-(2H -Benzotriazol-2-yl)-4-(tert -butyl)-6-(sec -butyl)phenol	17	HESS
65195-55-3	Avermectin b1a	18	Munro
13593-03-8	Quinalphos	18	Munro
150-50-5	Merphos	20	Munro
50892-23-4	WY-14,643	20	HESS
149-29-1	Patulin	24	Munro
88-85-7	2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenol	26	HESS
10161-34-9	Trenbolone acetate	26	Munro
57-30-7	Phenobarbital	27	HESS
298-04-4	Disulfoton	30	Munro
60-51-5	Dimethoate	30	Munro
57-74-9	Chlordane	33	Munro
583-39-1	2-Mercaptobenzimidazole	40	HESS
79-19-6	Thiosemicarbazide	40	HESS
108-98-5	Thiophenol	40	HESS
79-06-1	Acrylamide	40	Munro
118-74-1	Hexachlorobenzene	48	Munro
2104-64-5	Ethyl p-nitrophenyl phenylphosphorothioate	50	Munro
556-61-6	Methyl isothiocyanate	50	HESS
107-02-8	Acrolein	50	HESS
117-80-6	2,3-Dichloro-1,4-naphthoquinone	50	HESS
21542-96-1	N,N-Dimethyldocosan-1-ylamine	50	HESS
141-66-2	Diclotophos	60	Munro
22224-92-6	Fenamiphos	60	Munro
886-50-0	Terbutryn	60	Munro
116-06-3	Aldicarb	60	Munro
95-68-1	2,4-dimethylaniline	67	HESS
100-40-3	4-Vinylcyclohex-1-ene	67	HESS
95-94-3	1,2,4,5-Tetrachlorobenzene	68	Munro
142-19-8	Allyl heptanoate	75	COSMOS
99-65-0	meta-Dinitrobenzene	80	Munro
77182-82-2	Glufosinate-ammonium	80	Munro
536-90-3	3-Methoxybenzenamine	80	HESS

化学物質のCramer分類は、33項目（Munroらの拡張スキームでは、5項目の質問が追加されている）の質問に従ってエキスパートが実施することも可能であるが、OECD QSAR ToolboxもしくはToxtreeといったソフトウェアを用いることも可能である。Cramer分類の質問項目には、“天然に存在する”など化学構造のみでは判断が難しいものもあり、化学物質の構造によってはソフトウェアで異なる結果になる構造があることが指摘されている。表9には、本研究でNO(A)EL値が得られたEU物質についてToxtree 2.6とOECD QSAR Toolbox 3.4でCramer分類を実施した結果が異なった物質の例を示した。表9の5物質のうちNOEL値が最も低いCAS:6864-37-5のCramer分類の詳細を確認したところ、Q16のcommon terpeneであるかという質問についてToxtree 2.6はNo、Toolbox 3.4はYesの判定をしていた。cramerらの定義では、“an isoprenoid compound(carbon skelton made up of two or more 5-carbon isoprene units), reported in the literature as a more than trace constituent of two or more generally consumed foods, either raw or as ordinarily prepared for consumption, without added ingredient.”(Cramer, 1978)となっており、当該構造は、cramerらの定義によるcommon terpeneに該当しないと判断されることから、

Toxtree 2.6 の判定が妥当であると考察された。表 9 に示す以外の物質については、分類結果は一致していることから分類結果が異なるのは、ごく一部の構造であると判断されるが、cramer 分類を行う際には、両ソフトウェアを用いて評価を行い、結果が異なる場合には、判定が異なる質問についてエキスパートジャッジを行う必要があると結論された。

表 9. Toxtree 2.6 と OECD QSAR Toolbox 3.4 で Cramer 分類結果が異なる 5 物質

smiles	CAS	NOEL	Toxtree2.6	Toolbox3.4
	123-28-4	350	Low (Class I)	High (Class III)
	4767-03-7	200	Low (Class I)	High (Class III)
	6864-37-5	2.5	High (Class III)	Low (Class I)
	8050-31-5	714	High (Class III)	Low (Class I)
	12542-30-2	300	High (Class III)	Low (Class I)

引用文献

- Auerbach, S.S., Mahler, J., Travlos, G.S., Irwin, R.D. A comparative 90-day toxicity study of allyl acetate, allyl alcohol and acrolein, (2008) Toxicology 253 (1–3), 79–88.
- Ball N, Cronin MT, Shen J, Blackburn K, Booth ED, Bouhifd M, Donley E, Egnash L, Hastings C, Juberg DR, Kleensang A, Kleinstreuer N, Kroese ED, Lee AC, Luechtefeld T, Maertens A, Marty S, Naciff JM, Palmer J, Pamies D, Penman M, Richarz AN, Russo DP, Stuard SB, Patlewicz G, van Ravenzwaay B, Wu S, Zhu H, Hartung T. t4 report: Toward good read-across practice (GRAP) guidance, (2016) ALTEX, 33, 149-166.
- Chesnut M, Yamada T, Adams T, Knight D, Kleinstreuer N, Kass G, Luechtefeld T, Hartung T, Maertens A. Regulatory Acceptance of Read-Across: Report from an International Satellite Meeting at the 56th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2018) ALTEX, 35, 413-419.
- ECETOC. 2012, Technical Report 116 Category Approaches, Read-Across, (Q)SAR.

- <http://www.ecetoc.org/technical-reports>.
- ECHA. 1992, <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14461/7/6/2>
- ECHA. 2007, <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14401/7/6/2>
- ECHA. 2008, Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment. Chapter R.6: QSARs and grouping of chemicals. http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r6_en.pdf.
- ECHA. 2009, <https://echa.europa.eu/cs/registration-dossier/-/registered-dossier/14310>
- ECHA. 2012, <https://echa.europa.eu/cs/registration-dossier/-/registered-dossier/13890>
- ECHA. <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14401/7/1>
- Freidig A, Hofhuis M, Van Holstijn I, Hermens J. Glutathione depletion in rat hepatocytes: a mixture toxicity study with alpha, beta-unsaturated esters, (2001) *Xenobiotica*, 31, 295-307.
- JECFA. 1991, <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v28je09.htm>
- Kaye CM. Biosynthesis of mercapturic acids from allyl alcohol, allyl esters and acrolein, (1973) *Biochem J.*, 134, 1093-1101.
- MHLW. 1996, https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper115-77-5D.html
- MHLW. 1997, https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper99-96-7d.html
- MHLW. 1998, https://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/paper/paper97-88-1d.html
- Munro IC, Ford RA, Kennepohl E, Sprenger JG. Correlation of structural class with no-observed-effect levels: a proposal for establishing a threshold of concern, (1996) *Food Chem. Toxicol.*, 34, 829-867.
- National toxicology program (NTP), 1983. Carcinogenesis studies of allyl isovalerate (CAS No. 2835–39-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). National toxicology program, Technical Report Series 253. NIH Publication.
- National toxicology program (NTP), 2006. NTP technical report on the comparative toxicity studies of allyl acetate, allyl alcohol, and acrolein. Administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice. National toxicology program, toxicity report series number 48. NIH Publication.
- OECD. 2002a, OECD Screening Information Data Set, Methacrylic acid, <https://hpvchemicals.oecd.org/UI/handler.axd?id=1dc3142c-8eba-47de-a1ed-35de65e652f2>
- OECD. 2002b, OECD Screening Information Data Set, Methyl methacrylate, <https://hpvchemicals.oecd.org/UI/handler.axd?id=83353f64-e9f2-485d-81af-b75938af642b>
- OECD. 2014, Guidance on Grouping of Chemicals. OECD Series on Testing and Assessment No. 194. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

- Patlewicz G, Lizarraga LE, Rua D, Allen DG, Daniel AB, Fitzpatrick SC, Garcia-Reyero N, Gordon J, Hakkinen P, Howard AS, Karmaus A, Matheson J, Mumtaz M, Richarz AN, Ruiz P, Scarano L, Yamada T, Kleinstreuer N. Exploring current read-across applications and needs among selected U.S. Federal Agencies, (2019) Regul. Toxicol. Pharmacol., 106, 197-209.
- Schultz TW, Richarz, AN, Cronin M, Assessing uncertainty in read-across: Questions to evaluate toxicity predictions based on knowledge gained from case studies (2019), Computational Toxicology, 9, 1-11.
- WHO. 2019, WHO Technical Report Series 1014. Evaluation of certain food additives. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/279832>.
- Yang C, Barlow SM, Muldoon Jacobs KL, Vitcheva V, Boobis AR, Felter SP, Arvidson KB, Keller D, Cronin MTD, Enoch S, Worth A, Hollnagel HM. Thresholds of Toxicological Concern for cosmetics-related substances: New database, thresholds, and enrichment of chemical space, (2017) Food Chem Toxicol., 109, 170-193.

(2) 研究項目名：食品関連化学物質のリスク評価における *in silico* 評価手法の適用のあり方の提案 (研究担当者：小野 敦 (所属機関名：岡山大学)、山田 隆志、本間 正充、杉山 圭一 (所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所))

本研究における検討の結果、食品中に非意図的に含まれる可能性があるが毒性情報が限られている化学物質のハザード評価への *in silico* 評価手法の適用に関して、本研究で評価対象として取り上げた食品用器具容器包装に用いられる化学物質においては、遺伝毒性のうち Ames 試験で評価される変異原性については十分な評価が可能であり、一般毒性についても一定の条件を満たす範囲での適用が可能であるとの結論が得られた。

本課題では、本研究で得られた知見をもとに遺伝毒性および一般毒性それぞれに適用可能な *in silico* 手法と適用にあたって注意すべき事項について検討を行い、「食品関連化学物質の安全性評価における *in silico* 手法適用の考え方」(別添) としてまとめた。以下には、その概要について報告する。

まず始めに *in silico* 評価技術は、従来の毒性試験に完全に代わるものではなく、毒性試験情報が限られている、もしくは得られていない物質の WoE 評価の一部として用いられるべきである。特に、意図的に使用され食品に含まれる化学物質の評価には、補完的な情報として利用可能ではあるものの、あくまでも毒性試験によって行われるべきである。一方、食品に非意図的に含まれる可能性がある物質や意図的に使用されるものの食品に含まれる量が極微量で従来の毒性試験実施が困難な化学物質などの評価には、*in silico* 評価技術は有用と考えられる。*in silico* 評価技術の適用対象物質や評価結果の利用法の決定は、それらの点を考慮して慎重に判断するべきである。

in silico 手法のうち (Q) SAR モデルについては、信頼性・透明性が示されていること、

in silico 手法の構築に用いられた（もしくは参照する）データや手法が明らかであること、適用する *in silico* 手法の適用範囲が明確化されていることなどが挙げられ、それを確認するため「OECD principles for the validation, for regulatory purposes, of (quantitative) structure-activity relationship models」¹で示される5原則について情報が示されており科学的妥当性の確認が可能である必要がある。一方、評価結果の信頼性については評価対象物質が用いた (Q)SAR モデルの適用範囲に含まれていること条件として挙げられる。また、それぞれの (Q)SAR モデルの適用範囲は異なる可能性もあるため、本研究で実施したように評価対象の化学物質群に属する化学物質のうち毒性情報の得られている物質を用いた検証を行った上で評価に用いることが望ましい。

遺伝毒性評価は、定性的評価であり、背景データベースが比較的豊富であることから (Q)SAR 手法（統計的手法）やエキスパート手法（毒性アラートを用いた評価）など複数の手法について商用、無償を含む様々なソフトウェアが利用可能である。特に Ames 試験で検出される変異原性に関しては、いずれのソフトウェアとも十分に多様な化学物質の試験情報をもとにモデル構築されており、評価対象の化学物質群が異なってもほぼ同程度の精度での評価が可能であると考えられる。本研究の結果から、予測手法の異なる2つのモデル（知識ベースモデルと統計ベースモデル）の組合せにより十分な信頼性を担保出来ることが示された。本研究では、偽陰性を排除する目的から予測結果の信頼性の高低に関わらずいずれかのモデルで陽性判定された物質については陽性としたため偽陽性判定される物質が多い結果となったが、信頼性の低い予測結果についてエキスパートによる判断を組み合わせることでより正確な判定を行うことが可能であると考えられる。

一方、反復投与毒性に関しては、評価値算出のための定量的評価が必要であるが、現時点では、国際的に受け入れられている QSAR モデルは確立されていない。そのような状況下において、近年、欧州を始めとして食品関連化学物質の毒性評価に適用されつつある *in silico* 手法としては cramer 分類および cramer 分類に基づく TTC の適用が有用と考えられた。Cramer 分類については、公開されているソフトウェア（Toxtree もしくは OECD QSAR Toolbox）で分類可能であり、それに基づく TTC 値の有用性については多くの検証研究の結果により支持されている。ただし、評価対象の構造によっては、用いるソフトウェアで分類結果が異なることが指摘されており、ソフトウェアを用いた分類を行う際には、両ソフトウェアで分類を行い、結果が異なる場合には、エキスパートによる検証が必要である。TTC 評価は、個別の化学物質の毒性を評価するものでなく包括的なリスク評価手法であり、化学物質によっては実際の毒性に比べてコンサバティブな評価となる可能性はあるが、本研究の対象とする食品に非意図的に含まれる可能性のある化学物質では、そもそもその曝露は微量であると想定されることから TTC 評価の適用は妥当であると考えられる。ただし、TTC 評価適用のためには信頼出来る曝露に関する情報が要求されることから曝露評価の方法について十分な検討が必要である。

¹ OECD, Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-activity Relationships [(Q)SAR] Models, 2007.

また、TTC 値については非発がん一般毒性を対象とした cramer 分類に基づく TTC 値以外に変異原性物質や発がん性物質、神経毒性物質に関する TTC や生殖発生毒性に関する TTC など特定の毒性エンドポイントを対象とした TTC が構築されており、評価対象の化学物質や評価の目的に応じて適用可能である。さらに近年、データベースの充実により一般毒性に関しても、従来の cramer 分類以外の観点による分類による TTC の検討も進められているが、現時点ではあくまでも検討段階であり直ちに適用可能ではないが、それら新たな TTC 値を用いるほうがより信頼性の高い評価を行える可能性もあることから引き続き検討が必要である。

反復毒性に関して適用可能性がある他の *in silico* 手法としては、化学構造などの類似性に基づく構造類似物質の情報からの評価やさらに詳細なカテゴリーアプローチによるリードアクロスが挙げられる。構造類似物質からの毒性評価を行うためには、評価対象の化学物質（ターゲット物質）の評価に利用可能な構造類似物質が参照データベースに含まれている必要があるため適用範囲は限られるものの、構造類似物質について毒性情報が充実している化学物質については、ある程度、信頼性の高い評価が可能であることが本研究の検討でも示された。毒性評価のための化学構造の類似性評価における注意点としては、化学物質全体の構造類似性のみではなく logP などの物理化学的性質の類似性、生物学的反応性の類似性（毒性に寄与する置換基の有無など）についても評価を行うことが重要である。これらのうち生物学的反応性の類似性についての機械的な評価においては、前述の cramer rule も適用可能であることが本研究で示された。最終的な評価の適否については、生物学的反応性の類似性について選択された構造類似物質について得られている毒性情報について詳細な解析を行うことで判断すべきである。この段階における注意点は、後述するリードアクロスにおける注意点とほぼ同様である。毒性メカニズムが明確である場合など特定の条件下以外では単一の類似物質からの評価は信頼性に欠けるため採用すべきではなく、複数の類似物質について同程度の毒性値（もしくは化学物質群の何らかの性質に 관련된 毒性値）が得られており、それら類似物質で認められている毒性所見に関連性があることが確認された場合にのみ、評価結果は受け入れ可能である。そのため、構造類似度の評価の段階では、あまりに厳密な選択基準を設定せず、ある程度、幅広く類似物質を選択した上で最終的な評価に適用可能な物質選択を行うアプローチも有用と考えられる。

リードアクロスについては、欧州化学品規制 REACH における化学物質の登録に用いられており、欧州食品安全機関 (EFSA) においては農薬、化学汚染物質、食品添加物および容器包装関連化学物質の分野での適用が検討されている。リードアクロスにおける考え方や注意点については、ICCVAM Read-Across Workgroup で整理された手順（決定コンテキスト、データギャップ分析、包括的な類似性の根拠、アナログの識別、アナログの評価、データギャップ補完、不確実性評価）をもとに考え方としてまとめたが、実際の評価はケースバイケースにならざるを得ず、また、評価結果の信頼性（不確実性）をどのように判断するかについて国際機関等でも議論が行われている段階であり、今後の課題である。

最終的に、化学構造の類似性に基づく評価やリードアクロス評価の適用範囲を広げるに

は信頼できるデータベースの充実が課題であり、また評価結果については、1：透明性と再現性、2：類似性の仮説に関連する信頼性や機序的な蓋然性、3：評価に用いる試験データの質、4、In vitro および代替アプローチ等のサポートデータの充実や、一つのソース物質でなくできるだけ多くのソース物質からターゲット物質の毒性を予測することによるエビデンスの重み付け、が示されることが重要である。このうち4.に関しては、本研究では、*in silico* 評価手法のみを対象としたため検討を行っていないが、近年、経済協力開発機構（OECD）では、複雑な毒性エンドポイントについて、Adverse Outcome Pathway（AOP）に基づいて *in silico*、*in vitro*、*in vivo* の情報を組み合わせて化学物質の安全性を評価する“試験と評価のための統合的アプローチ” Integrated Approaches to Testing and Assessment（IATA）のコンセプトが提唱されており、将来的には有望なアプローチの一つであると考えられる。

（3）研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、食品安全委員会でのリスク評価における *in silico* 評価手法の適用に向けた検証を行うこと目的として、まずは非意図的に食品に微量に含まれる化学物質の例として器具容器包装関連物質を対象に、変異原性および一般毒性について既存の毒性試験情報の収集とデータベース化を行った上で、収集されたデータをもとに、これまでに有用性が示唆されている各種の *in silico* 評価手法を適用した評価を実施した。毒性試験データの収集とデータベース化では、反復投与毒性について 107 物質（132 試験）、変異原性について 96 物質について OECD QSAR Toolbox に登録されていない新たなデータの収集を行い、OECD QSAR Toolbox にインポート可能な形式でデータベース化を行った。*in silico* 評価手法の適用において、Ames 変異原性について、Ames 試験情報が入手可能な 812 物質について医薬品 ICH M7 で示された予測手法の異なる 2 つの (Q) SAR ソフトウェアを用いた評価を実施し、毒性試験結果との比較を行った結果、偽陽性は多くなるものの、偽陰性は 2 物質のみであり、規制目的の利用においては、十分適用可能であると判断された。本研究では、(Q) SAR による陽性予測結果の信頼性によらず陽性と判断しており、予測結果の信頼性に応じて構造類似物質の情報などを含む専門家判断を組み合わせることにより精度の高い予測が可能になると考察された。一方、*in vivo* 反復投与毒性については、十分に信頼出来る (Q) SAR モデルは存在しないため、工業用化学物質の評価などで適用が検討されているカテゴリーアプローチおよび食品香料等の評価に用いられている毒性学的閾値（TTC）評価について検討を行った。カテゴリーアプローチの実施には、化学構造の類似性だけでなく、毒性発現メカニズムや代謝の類似性など様々な観点からのエキスパートによる評価が必要であり、実際の評価はケースバイケースにならざるを得ず、また、評価結果の信頼性（不確実性）をどのように判断するかについても今後の課題であると考察された。また、カテゴリーアプローチを行うためには、類推評価に利用可能な毒性情報の得られているソース物質の探索が重要である。多くの場合、ソース物質の探索は、非常に時間やリソースを必要とすることから、本研究では、化学構造類似度を指標として全体構造の類似度から探索された構造類似物質か

らの NO(A)EL 値評価について検討を行った結果、全体構造の類似度から探索された構造類似物質について、cramer クラス分類による毒性類似性の評価、logP 値による物理化学的類似性評価を組み合わせ、さらに評価対象物質が毒性に寄与する置換基を含む場合には、類似物質探索においてその置換基の有無を加味することで類推評価に適用可能なソース物質の効率的な探索における有用性が示された。

一方、TTC 評価に関しては、反復投与毒性試験の NO(A)EL 値が得られた EU 物質について Cramer 分類を実施して、一般毒性の TTC 値の適用について Cramer クラス毎に検証した結果、毒性試験データが利用できる EU 物質にはクラスⅢ TTC 値未満の TDI 値をもつ強毒性物質は含まれていなかった。また NO(A)EL 値の小さい物質は、いずれもクラスⅢに分類されたことから TTC アプローチを適用した評価の有用性が示された。

本研究の最終的な成果として、上記の様々な検討で得られた知見をもとに遺伝毒性および一般毒性それぞれに適用可能な *in silico* 手法の信頼性や適用限界および今後、食品安全委員会で評価対象とする器具容器包装関連化学物質以外の化学物質の評価に適用するにあたって注意すべき事項について検討を行い、「食品関連化学物質の安全性評価における *in silico* 手法適用の考え方」(別添)としてまとめた。

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト(※別添として別刷(投稿中のものは、受理証明書の写し)を提出すること。また、査読付きの場合は、雑誌名の冒頭に◎を付すこと。)

特になし

2 本研究を基にした学会発表の実績

A. Ono, M. Nakamoto, N. Iizuka and M. Isozaki :Development of new risk assessment guideline of Food Contact Materials based on the TTC concept in Food Safety Commission of Japan.. *IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICTXV) Meeting* (2019. July, Hawaii)

近澤 清貴、小野 敦 :化学物質の構造分類に基づいた 28 日間反復投与毒性試験の 14 日間試験からの類推評価に関する検討. *第 46 回日本毒性学会* (2019. June, Tokushima)

3 特許及び特許出願の数と概要

特になし

4 その他(各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

特になし

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
(1) 本研究における検証結果をもとに食品安全委員会における各種評価委員会でのリスク評価に有用なデータベース登録項目を整理し、その基礎となるデータベースを整備する。	5	食品用器具容器包装に用いられる化学物質のリスク評価に必要な遺伝毒性、反復毒性情報について入手可能な情報を整理して OECD Toolbox または HESS に登録可能なデータベース登録用データを取りまとめた。
(2) 本研究における検証結果をもとに食品関連物質の変異原性評価に有用な <i>in silico</i> 評価手法及び評価ストラテジーを提案する。	5	食品用器具容器包装関連化学物質を対象として、Ames 変異原性について毒性試験による評価結果と <i>in silico</i> 評価の比較を行い、予測手法の異なる 2 つの (Q) SAR モデルの組合せによる評価の信頼性と有用性が示された。
(3) 本研究における検証結果をもとに現時点で食品関連物質の反復投与毒性評価に利用可能な <i>in silico</i> 評価手法とその利用のあり方や適用限界やリスク評価に用いる際の注意点を提言する。	5	食品用器具容器包装関連化学物質を対象として、反復投与毒性の <i>in silico</i> 評価手法として、カテゴリーアプローチ、構造活性相関モデル、毒性学的懸念の閾値 (TTC) のそれぞれについて検証研究を行い、各手法が適用可能であることを示すとともに、各手法の適用限界や今後の課題を明らかにした。
(4) 本研究の検証結果をもとに非意図的に食品に含まれる化学物質以外の化学物質のリスク評価における <i>in silico</i> 評価手法の有効な活用のあり方を提案する。	5	上記の検証結果をもとに遺伝毒性および一般毒性について利用可能な <i>in silico</i> 評価手法の適用における注意点や考え方について整理を行い「食品関連化学物質の安全性評価における <i>in silico</i> 手法適用の考え方」(別添) としてとりまとめて提案した。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点すること。

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	研究計画について、ほぼ当初の目標どおり進捗しており、最終的に <i>in silico</i> 評価手法の適用の考え方をとりまとめて提案した。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究で構築した器具容器関連化学物質の遺伝毒性、反復投与毒性データベース、および本研究成果による <i>in silico</i> 評価手法の適用の考え方の提案は、いずれも今後の食品安全委員会における食品関連物質のリスク評価において有用な知見を与えるものである。
総合コメント 本研究の成果として提案した「食品関連化学物質の安全性評価における <i>in silico</i> 手法適用の考え方」は、我が国で新たにポジティブリスト制が導入された器具容器包装関連化学物質の今後のリスク評価に有用であるのみならず、今後、食品安全委員会における様々な食品関連化学物質のリスク評価において <i>in silico</i> 評価の適用を行う際に参考となる指針として非常に有用である。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述すること。

※次のただし書を枠で囲って記載すること。

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。

(別紙) 研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Study on application of in silico evaluation method to risk assessment of trace level chemicals unintentionally contained in food.
Research project number	1803
Research period	FY 2018 – 2020
Name of principal research investigator (PI)	Atsushi Ono

Abstract/Summary

Various chemicals, such as leachable from food containers, can be unintentionally included in food though usually trace amounts. For the risk assessment of such chemicals, sufficient toxicity test information has not been obtained and sometime toxicity test is difficult to conduct. Recently, in silico methods based on toxicological database of “similar” chemicals with structures, physicochemical property etc. are being accepted on the risk assessment in Europe and the United States. Such in silico methods are considered to be useful in the risk assessment by the Food Safety Commission.

In this project, to test reliability and applicability of in silico methods expected to be useful and develop guidance for in silico evaluation, for chemicals which related food packaging as target of risk assessment, in silico evaluation for Ames mutagenicity and NO(A)ELs of repeated dose was conducted and compared the available toxicological information which was collected in this project. For Ames mutagenicity, result of in silico prediction integrating two different (Q)SAR method, rule base and statistical base, shown high specificity indicated sufficient conservativity and reliability of in silico method in application on regulatory risk assessment. For prediction of the NO(A)ELs of repeated dose, read-across from similar chemicals, i.e. category approach, is seems useful if information for similar chemicals is available. To search similar chemicals, the combination of whole structural similarity with physicochemical properties, Cramer class and also substituents that contribute to toxicity was useful. The reliability of read-across may be affected by MoA/AOP, metabolism, etc.,. thus, availability of detailed information for toxicity and also assessment of uncertainty is an issue. For risk assessment of repeated dose toxicity, TTC (Threshold of Toxicological Concern) approach is also useful. NO(A)ELs of all chemicals evaluated in this project were higher than TTC of each of Cramer class. Availability of reliable information for exposure is issue for conduct risk assessment using TTC approach. Finally, based

on the findings obtained from evaluation in this project, we developed “General consideration for applying the in silico methods in the safety evaluation of food-related chemical substances.” and proposed as a reference for developing guidance in future.

次のただし書 (Disclaimer) を枠で囲って記載すること。

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.

A. Ono, M. Nakamoto, N. Iizuka and M. Isozaki: Development of new risk assessment guideline of Food Contact Materials based on the TTC concept in Food Safety Commission of Japan. *IUTOX 15th International Congress of Toxicology (ICTXV) Meeting* (2019. July, Hawaii)

K. Chikazawa, A. Ono: A study on the prediction of a 28-day repeated-dose toxicity from a 14-day study based on the structural classification of chemical substances. The 46th Japan Society of Toxicology (2019. June, Tokushima)

None