

令和2～3年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	<i>In silico</i> 手法の導入による食品関連化学物質の肝毒性予測の精緻化に関する事例研究（課題番号：2006） 2 健康影響発現メカニズムの解明 (2) 食品中の化学物質のリスク評価の精緻化に関する研究
主任研究者	研究者名：山田 隆志 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和2年度～令和3年度（2年間）

2 研究目的

本研究では、既存の毒性データと *in silico* 予測ツールの情報を活用した肝毒性予測手法の評価を行う。さらに、広範な食品関連化学物質の毒性学的知見を整備する一方、ヒト肝毒性の懸念のある物質を対象に、ヒトへの外挿の精緻化に資するヒト生理学薬物動態（PBPK）モデルとヒト毒性予測のモデルを活用して生体内代謝の個人差を考慮した体内動態推移を考慮してヒト肝毒性リスクを評価する事例研究を実施する。その結果に基づき、食品健康影響評価におけるヒト外挿の精緻化のための新手法の有用性や今後の課題を整理する。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
<i>In silico</i> 手法の導入による食品関連化学物質の肝毒性予測の精緻化に関する事例研究	ヒトへの外挿性を考慮した新規 <i>in silico</i> 手法のデータを活用した食品関連化学物質の肝毒性予測の事例研究	山田 隆志（国立医薬品食品衛生研究所）
	食品関連化学物質を対象とした PBPK モデルの簡易構築とヒト外挿性を考慮した精緻化に関する研究	山崎 浩史（昭和薬科大学）
	食品関連化学物質のヒト健康影響評価の外挿精緻化に資する <i>in vitro</i> ADME 試験研究	村山 典恵（昭和薬科大学）

4 倫理面への配慮について

本研究では、ヒトを対象とした解析及び疫学研究を実施していない。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目：In silico 手法の導入による食品関連化学物質の肝毒性予測の精緻化に関する事例研究

(1) 個別課題：ヒトへの外挿性を考慮した新規 *in silico* 手法のデータを活用した食品関連化学物質の肝毒性予測の事例研究（山田 隆志（国立医薬品食品衛生研究所））

本個別研究では、既存の肝毒性予測ツールの評価と、データを用いて肝毒性の予測精度を改善する手法を検討した。さらに、ヒト肝毒性の懸念がある物質を対象に、3つの事例研究を実施した。

まず、食品関連物質のリスク評価の優先順位付けや有害性の同定に際して、化学構造から推定される有害性情報をエビデンスの一つとして提供することを想定し、肝毒性を対象に既存の構造活性相関モデルの性能を評価した。評価の結果、肝毒性陽性物質の検出感度が低いことが判明したため、物性、ADME、作用機序や、毒性データの総合的な解析を行うことにより、肝毒性の検出感度を向上させる方法を検討した。

ピロリジジンアルカロイド（PA）は、植物で生合成される毒素であり、PA を含む植物を含有または混入した食品の報告から、肝毒性が懸念されている。PA はこれまで 600 種類以上が知られているが、毒性情報不足している。PA のリスク評価を促進するためには、グループとして包括的に評価する方法が有効である。事例 1 では、フキに含まれるオトネシンタイプの PA を対象に、構造毒性相関および生体高分子との反応性等のデータに基づいて、相対的な肝毒性強度を推定する方法を検討した。

リスク評価において、代謝情報は、実験動物の結果のヒトへの外挿を精緻化するために必須である。しかし、農薬や化学物質のヒトにおける代謝情報は限られている場合が多い。事例 2 では、アゾール系とフェノール系物質を対象に、精度の高いヒト *in silico* 代謝予測系を適用し、その有用性と課題を考察した。

事例 3 として、食品成分であるクマリンについてヒトにおけるリスク評価をより精緻化するために、既存のばく露と毒性データを再評価して課題を整理するとともに、主要標的である肝臓について、医薬品のヒト肝毒性予測構造活性相関モデルを活用し、食品成分への適用の可能性と有用性を検討した。

最後に、得られた結果を総合的に考察して、*in silico* 手法の適用による食品関連物質の肝毒性リスクの評価に対する有用性と留意点を整理した。

(1-1) 構造活性相関手法による食品関連化学物質の肝毒性の検出感度向上のための研究

平成 29-30 年度に実施した、食品健康影響評価技術研究「インビボ毒性試験成績のデータベース化とそのインシリコ解析・評価への応用に関する研究（課題番号：1602）」において、毒性データベースを構築した。本研究では、本データベースの農薬を中心とする 170 物質の 90 日間反復投与毒性試験結果について、肝毒性予測結果との関連を検討した。本検討では、肝細胞壊死あるいは ALT 上昇を肝障害の指標とし、これらのいずれかが認められた場合を肝毒性陽性、肝臓に病理所見がみられない場合を陰性、それ以外で肝臓になんらかの病理所見がみられた場合を不確定とした。肝毒性について、予測モデル、物性、体内動態（ADME）、作用機序といった多角的な観点から解析を行った。

既存の構造活性相関モデルによる肝毒性予測性能の評価

異なるアルゴリズムに基づく既存の 2 種類の肝毒性予測モデル（知識ベースの DerekNexus (v.6.1.0) および統計ベースの VEGA (version 1.0.0)）に上記物質を適用し、予測結果と実際の毒性試験結果との比較を行った（表 1-1）。適応した物質の予測結果に付随して、DerekNexus ではアラート構造と参考文献情報、VEGA では類似構造を持つ物質の実測および予測データが提示され、これらのモデルではその根拠が理解しやすい。この点で、両モデルは本研究での解析に適していると考えられた。なお、

モデルでの予測結果については、DerekNexusでは「Plausible」「Probable」、VEGAでは「Toxic (good reliability)」「Toxic (moderate reliability)」を、Positiveと判断した。

その結果、肝毒性陽性の54物質で、本モデルにおいてPositiveと予測されたのはDerekNexusが10物質(19%)、VEGAが9物質(17%)に過ぎなかった。一方で、54物質中の38物質(70%)については、いずれのモデルを用いてもPositiveと予測されずに偽陰性の結果であった。

表 1-1. 肝毒性予測構造活性相関モデルの食品関連物質を用いた検証結果

Model	<i>In silico</i> prediction	<i>In vivo</i> 肝毒性		
		陽性	陰性	不確定
DerekNexus	Positive	10	5	21
	Not positive	44	13	77
VEGA	Positive	9	3	20
	Not positive	45	15	78
計	-	54	18	98

データベースを用いた肝毒性とADME等の関連についての解析

肝臓は化学物質の主要な標的で、これまでに数多くの肝毒性予測モデルが開発されてきた。しかし、学習データセットには食品関連物質の使用が不十分であること、あるいは体内での蓄積や代謝などのADMEが考慮されていないことが、予測精度向上へ向けた課題と考えられた。そこで、食品安全委員会の食品健康影響評価書収載の毒性試験とADMEに関する情報を用い、肝毒性に関係する要因の抽出を試みた。また、農薬は生体内分子と特異的な反応をするものが多いため、その作用機序が毒性に関係する可能性も考えられる。毒性と関連する要因を可能な限り検討するため、作用機序についても情報を収集し、毒性との関連性を検討した。

食品健康影響評価書、農薬抄録、Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPR)の報告書などから情報を収集し、132物質のADMEに関する情報をデータベース化した。化合物が肝臓に長時間ばく露されることは肝毒性のリスクになることから、表 1-2 に示す9項目について解析した(表 1-2)。

各項目について、表 1-2 に示す閾値を設定し、それに従って解析した。その結果、肝毒性陽性の物質は陰性の物質に比べて、全般にlogPが高く、分子量が大きく、 $T_{1/2}$ あるいは T_{max} が長く、タンパク結合率が高い(fuPが低い)傾向がみられた(図 1-1)。一方で、肝毒性陰性の物質では、非常に長い $T_{1/2}$ あるいは T_{max} や、非常に高い肝/血中比率あるいは脂肪/血中比率はみられなかった(図 1-2)。なお、胆汁中/尿中比率、糞中/尿中比率については明確な傾向がみられなかった。

表 1-2. 肝毒性に関連するADMEの項目

分類	項目	予測/実測	閾値	備考
物性	logP	予測	3 / 6	脂溶性
	分子量 (MW)	予測	350 / 500	
	fuP	予測	5 / 10	タンパク結合率=100-fuP(%)
血中濃度 時間	$T_{1/2}$	実測	12h / 48h	血中濃度半減期
	T_{max}	実測	6h / 24h	最高血中濃度時間
分布	肝/血中濃度比率	実測	3	肝内濃度/血中濃度
	脂肪/血中濃度比率	実測	3	脂肪組織濃度/血中濃度
排泄	胆汁中/尿中比率	実測	1 / 3	
	糞中/尿中比率	実測	1 / 3	

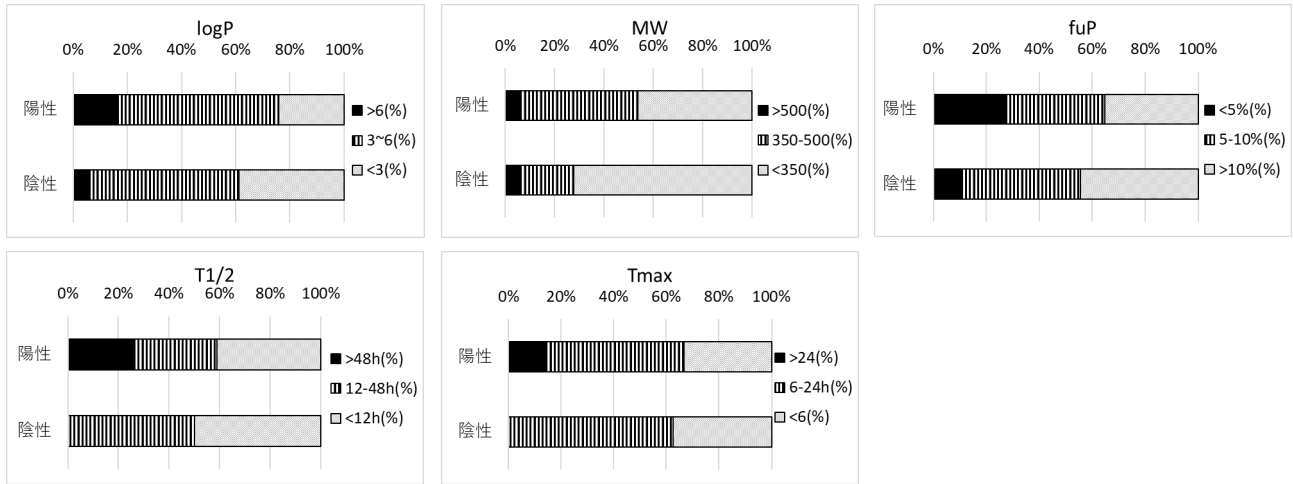


図 1-1. ADME 項目と肝毒性の関連

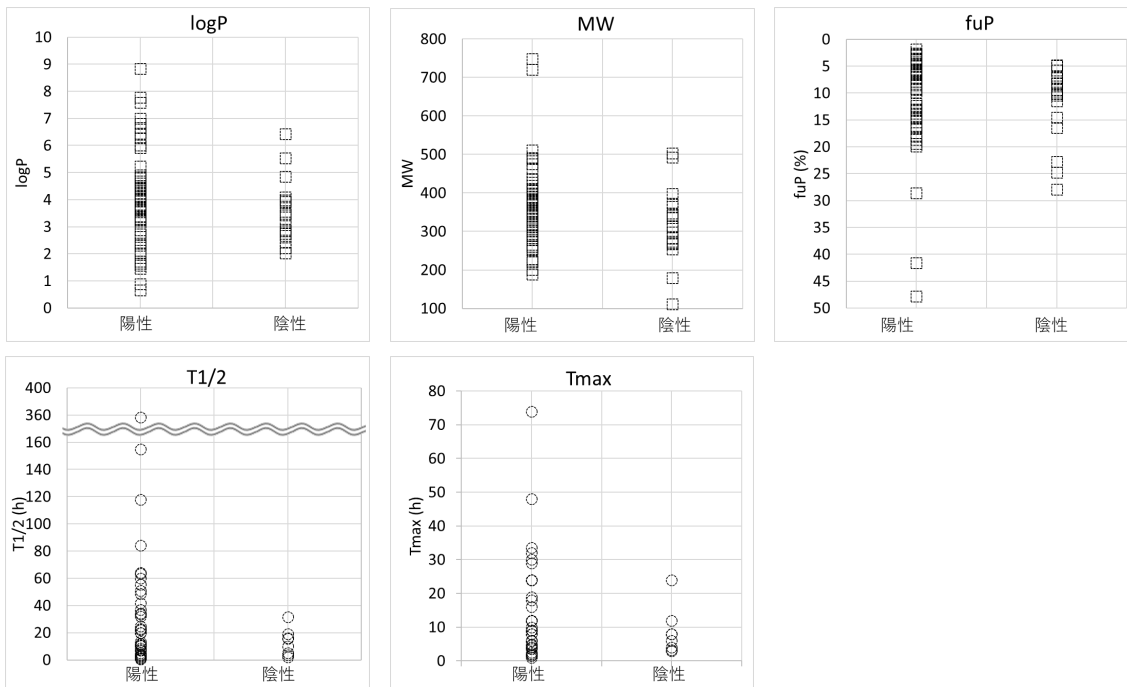


図 1-2. 各項目の分布と肝毒性の関連

さらに、閾値を超える項目の数の比較や、複数の項目を組み合わせた場合について検討した。その結果、肝毒性の懸念がある物質をスクリーニングするための条件を見出した。

3 < logP < 6 および 分子量 > 350

両条件を満たすのは 170 物質のうち不確定も含め 51 物質で、そのうちの肝毒性陽性が 15 物質であるのに対し、陰性が 2 物質と少数であった (表 1-3)。この結果から、両条件は肝毒性リスクに関連するものであり、多角的にスクリーニングする際の条件の一つとして有用であると考えられた。logP が高いのは疎水性を示す物質で、体外への排出が難しいため、肝臓で代謝されることで肝臓が長くばく露されるが、疎水性が極端に高い物質は全身の組織中に分布し、血中あるいは肝臓へは還流しにくい。このため、肝臓でのばく露は少なく、肝毒性のリスクは高くないと推測される。また、分子量が小さければ代謝されずに尿中へ排泄されるが、分子量が大きいと代謝されてから排泄されるため、肝臓の

ばく露量が多くなる。このため、肝毒性のリスクにつながると考えられる。

表 1-3. logP と分子量によるスクリーニング結果

	<i>In vivo</i> 肝毒性	
	陽性	陰性
3 < logP < 6 かつ MW > 350	15 (28%)	2 (11%)
上記以外	39 (72%)	16 (89%)
計	54	18

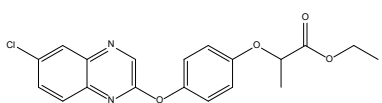
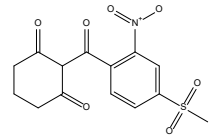
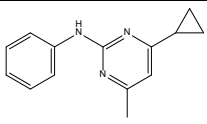
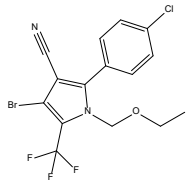
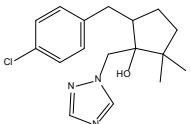
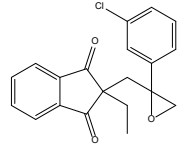
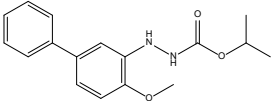
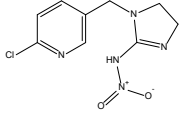
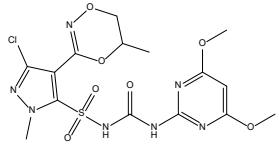
本条件を満たす個々の物質について ADME 情報を参照した。その結果、logP の条件に入る物質では肝/血中比が高いものが多く、肝臓への高い分布が裏付けられた。分子量の条件を満たす物質は尿中排泄より胆汁排泄が多い傾向が確認され、肝臓での代謝を必要とすることが示唆された。また、fuP が 5%~20%程度でタンパクに比較的結合しやすいことから、これらの物質は血中に長く留まりながら、肝臓が長時間ばく露されることが示唆された。T_{1/2} が長い傾向が同様にみられたことも長時間のばく露を示唆していた。これらのことから、本条件を設定する妥当性が確認され、肝毒性リスクを検討すべき物質の条件について絞り込みができた。

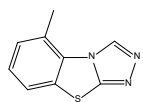
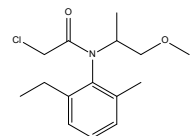
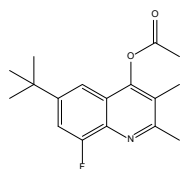
以上のように肝毒性と ADME の関連について提示できたが、肝毒性陰性物質の数が少なく、データ数が少ないことでそのばらつきについては慎重な解釈が必要である。項目によっては大きな差は見えず、毒性と長時間ばく露と関係は必ずしも一致しなかった。また、ADME と毒性の試験は通常独立して行われるため、用量が一致しない場合が多い。このため、毒性用量での ADME は不明であったり、放射能標識体を用いて ADME 試験が実施されるため、代謝物と区別できないことが問題となる場合がある。また、ADME 情報は概ね量的にも質的にも十分ではなく、多くの場合で解析は困難であった。

個別の肝毒性物質での肝毒性と ADME 等の関連についての探索

データベースを用いた解析には限界があったため、肝毒性に寄与する要因を詳細かつ多岐に渡って探索するため、個別の物質をいくつか選定し、構造、物性、ADME、あるいは農薬としての作用機序などについての検討を行った（表 1-4）。肝毒性陽性物質の中で、肝臓への負荷が大きいと考えられる構造や ADME 情報、作用機序を持つものを対象とした。構造は難代謝性や化学反応性、ADME は肝臓ばく露に関連する要因、作用機序については、ほ乳類にも共通する酵素や反応系を標的とし、肝臓への影響が大きいと考えられるものに着目した。さらに、陽性でない物質についても、これらの構造、ADME、作用機序が類似したものを対象に追加した。作用機序については、農薬製造会社の国際団体が定める農薬の作用機構分類（RAC コード）を参照し、文献情報等も参考にした。比較のため、肝毒性以外に肝臓以外の臓器にも強い毒性が認められる物質についても検討の対象とした。

表 1-4. 個別の検討を行った物質

ID	Structure	Chemical Name	肝毒性	肝毒性に寄与する要因や考察
5		quizalofop-ethyl	陽性	<ul style="list-style-type: none"> フェニルエーテルやハロゲンが存在し、難代謝性で肝臓への蓄積が示唆される。 長い $T_{1/2}$ や高い脂肪/血中比などの ADME 情報が肝毒性陽性とよく一致する。 エステルは加水分解が速やかで、毒性を低減する可能性がある。
7		mesotrione	陽性	<ul style="list-style-type: none"> 低用量で ALT 上昇を示す 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (4-HPPD) 阻害剤。 4-HPPD はほ乳類を含む多様な生物が持ち、アミノ酸代謝に関与する。 医薬品に用いられる 4-HPPD 阻害剤もある。 農薬の機序に関わる特異的な相互作用が肝毒性に寄与する可能性がある。
12		cyprodinil	陽性	<ul style="list-style-type: none"> モデルで予測できていない。 シクロプロパン構造はゆがみがあり、比較的反応性が高い可能性がある。しかし、毒性との関連を示す十分な知見はそろっていない。
13		chlorfenapyr	陽性	<ul style="list-style-type: none"> ハロゲン、特にトリフルオロ構造から難代謝性が示唆される。 $T_{1/2}$ が長く、胆汁排泄が多いことが肝毒性陽性とよく一致する。 さらに、農薬の機序として、ミトコンドリアへの作用があるため、より強く毒性に結びつく可能性がある。
14		metconazole	陽性	<ul style="list-style-type: none"> トリアゾール系農薬は今回のデータベースに多数含まれており、P450 阻害剤である。 予測モデルに対応する「フェニルアルキルトリアゾール」アラートがある。
17		indanofan	陽性	<ul style="list-style-type: none"> アルケンエポキシドのため epoxide hydrase は比較的作用しやすい。 しかしエポキシ環は概して反応性が高く、この物質は加水分解後の構造も脂溶性が高い。 全体構造からは vitamine K 依存性血液凝固阻害作用の可能性もある。 反応性や脂溶性が $T_{1/2}$ の長さや毒性に繋がると示唆される。
19		bifenazate	陽性	<ul style="list-style-type: none"> ヒドラジン構造は肝毒性が知られている。 予測モデルでもヒドラジン構造によるアラートがある。
37		imidacloprid	陽性	<ul style="list-style-type: none"> ネオニコチノイドであり、神経毒性物質。 肝毒性を示すより低用量で他臓器への毒性を示すことが知られる物質は、肝毒性評価の対象からは除外することが妥当と考えられる。
46		metazosulfuron	陽性	<ul style="list-style-type: none"> ADME の数値から重篤な肝毒性は示唆されないが、高用量で $T_{1/2}$ が延長する。 肝毒性も高用量でしか出ないものの、壊死と ALT 上昇の他、複数の肝毒性関連所見が見られる。 高分子だが親水性が高く、胆汁排泄と尿中排泄の比率が偏っていないことが毒性低下に寄与している可能性がある。

ID	Structure	Chemical Name	肝毒性	肝毒性に寄与する要因や考察
50		butachlor	陽性	<ul style="list-style-type: none"> ALT の上昇がみられる。 クロルアセトアミド構造自体が肝細胞壊死やグルタチオンの枯渇といった肝毒性を示すという文献もある。 今後、予測モデルに追加すべきアラート構造と言えるのではないか。
52		tricyclazole	陽性	<ul style="list-style-type: none"> 14 metconazole と同様にトリアゾールの一種で、肝臓に蓄積しやすい可能性がある。 農薬の機序（メラニン合成阻害）の影響も考えられる。 T_{1/2} は長いものの肝/血中比や脂肪/血中比が低い。 グルタチオン抱合などを受け代謝は比較的速いと考えられ、長い T_{1/2} は代謝物も含む見かけの T_{1/2} と考えられる。
53		metolachlor	陰性	<ul style="list-style-type: none"> 50 Butachlor と同様、クロルアセトアミド構造を持つ。 ALT 上昇や壊死はないものの、複数の肝毒性所見が見られる。
55		Acifluorfen-sodium	陽性	<ul style="list-style-type: none"> ニトロ基を持つ芳香環があり、構造活性相関モデルでも毒性が予測できている。 カルボン酸部分のグルクロン酸抱合が、嵩のあるニトロ基により進みにくい可能性が示唆される。 代謝物には抱合体の割合は多くなく、ニトロ基が還元されてアミノ基になった代謝物が認められた。
62		lufenuron	陽性	<ul style="list-style-type: none"> ハロゲンの多さや代謝できる構造が少ないことから非常に難代謝性と考えられる。 アミドの加水分解を受けるが、それ以外の代謝を受けにくいことが、T_{1/2} の延長につながるであろう。
84		tebufloquin	陽性	<ul style="list-style-type: none"> 難代謝性の tert-ブチル構造を持つ。 キノロン構造を持つ。 肝/血中比が高く、T_{1/2} がやや長い。 また、ミトコンドリアへの作用があることも肝毒性に寄与するかもしれない。 同じくキノロン構造を持つ 120 acequinocyl も類似した肝毒性の傾向を示す。
85		tefuryltrione	不確定	<ul style="list-style-type: none"> 7 mesotrione 同様、4-HPPD 阻害剤であり、肝毒性関連所見が見られる。 農薬の機序に関わる特異的な相互作用が肝毒性に寄与する可能性がある。
120		Acequinocyl	陽性	<ul style="list-style-type: none"> 84 tebufloquin と類似したナフトキノン構造を持つ。 肝毒性、ADME、ミトコンドリアへの作用なども類似している。

個々の物質に関して検討した結果、表 1-4 に示したとおり、いくつか重要な情報が整理できた。まず、肝以外の臓器においてより低濃度で臓器毒性を示す物質は、肝毒性評価の対象から外するのが妥当である。次に、物質の構造に着目すると、難代謝性の部分構造/官能基（フェニルエーテル、ハロゲン、*tert*-ブチルなど）や、反応性が高い官能基（エポキシド、ヒドラジン、ニトロ基など）は肝毒性に寄与する可能性が高いことが裏付けられた。これらの情報は予測ソフトにも記述が充実してきているものの、さらなる知見の蓄積がより精緻な予測に貢献することが期待できる。構造アラートに関連しては、今回、肝毒性の新規アラートとしてクロルアセトアミドの構造を提案することができた。農薬としての作用機序との関連については、シトクロム P450 (P450) 阻害、4-HPPD 阻害やミトコンドリア電子伝達阻害など、肝への影響が想定される生物学的な作用を持つ物質では、作用機序によるカテゴリーアプローチが有用であることが示唆された。ADME、特に代謝の視点からは、速やかに加水分解を受けるエステル構造を持つ物質については、代謝物についても評価を行うべきであること、抱合反応が想定される物質については、抱合できる官能基の有無だけでなく、官能基周辺の分子環境など抱合反応の受けやすさを参考にすると予測精度が向上できることが示唆された。

外部データによる再検証

以上の検討で得られた知見に基づき、肝毒性の予測について外部データを使用して再検証を行った。外部データとして、米国 ToxRefDB を参照して、我々のデータベースに含まれない農薬関連物質を選出した。肝毒性予測モデルによる予測結果は、肝毒性陽性の 44 物質のうち、Positive と予測されたのは DerekNexus が 20 物質（45%）、VEGA が 13 物質（30%）で、我々のデータベースでの予測よりは良好であったものの、44 物質中の 19 物質（43%）については、いずれのツールを用いても Positive と予測されずに偽陰性の結果であった（表 1-5）。

表 1-5. 予測肝毒性予測構造活性相関モデルの食品関連物質を用いた外部検証の結果

Model	<i>In silico</i> prediction	<i>In vivo</i> 肝毒性	
		陽性	陰性
DerekNexus	Positive	20	18
	Not positive	24	29
VEGA	Positive	13	12
	Not positive	31	35
計	-	44	47

外部データの物質について、logP と分子量の条件（ $3 < \log P < 6$ かつ $MW > 350$ ）でスクリーニングを行った。両条件を満たしたのは、肝毒性陽性で 11 物質（25%）、陰性で 5 物質（11%）となり、表 1-3 と同様の割合であったことから、このスクリーニング条件が有用であることが検証された（表 1-6）。

表 1-6. logP と分子量によるスクリーニング結果

クライテリア	<i>In vivo</i> 肝毒性	
	陽性	陰性
$3 < \log P < 6$ かつ $MW > 350$	11 (25%)	5 (11%)
上記以外	33 (75%)	42 (89%)
計	44	47

次に、外部データについて構造アラートの確認を行った。その結果、肝毒性陽性の物質ではフェニルエーテル、ハロゲン多置換（3 以上）、*tert*-ブチル構造を持つものが、肝毒性陰性の物質より明らか

に多かった（表 1-7）。さらに、その 1/3～半数は予測モデルでは偽陰性の結果であった。すなわち、これらの構造アラートは肝毒性と関連すること、および市販の予測モデルで偽陰性を示す物質の肝毒性リスクを見出せる可能性が確認された。

表 1-7. 官能基による肝毒性の推定と予測結果との比較

官能基	<i>In vivo</i> 肝毒性	
	陽性	陰性
フェニルエーテル	7 (2)	4
ハロゲン多置換	17 (8)	5
<i>tert</i> -ブチル	6 (3)	1

※括弧内は、このうち、予測ソフトで Not positive となった偽陰性物質数

最後に、外部データについて農薬としての作用機序を確認した。その結果、P450 阻害作用を持つ物質では肝毒性陽性は 4 物質である一方で、陰性の物質には一つもなかった。肝臓とは直接関係しない神経系に作用する物質は、肝毒性陽性物質中には 2 物質と少なく、一方で、陰性には 12 物質と多く含まれた。ミトコンドリアに作用する物質は数が少なく判断できなかったが、肝毒性陽性の偽陰性物質が一つ含まれた。各国での農薬の種類と使用頻度が異なることから、ToxRef 以外の農薬の毒性試験データを対象とすれば、ミトコンドリア作用物質についてより正確に検証可能かもしれない。

総合すると、物性、官能基、農薬としての作用機序を考慮することにより、既存の予測モデルにおいて偽陰性である 19 物質のうち 13 物質については、肝毒性リスクを検出できることが確認された。

総括

肝毒性予測の精緻化のために、どのようなタイプのデータを、どのように合理的に統合してモデル化すればよいかについては、多くの検討が必要と考えられる。本研究では、比較的情報が多い農薬を中心にその薬効、想定される肝毒性機序、リスク評価書に記載されている物性や ADME と詳細な肝毒性データを収集・整備した。しかしながら、データセット化合物数は多くなく、統計的な手法によるモデル構築は難しいと考えられたため、既存の種々のデータを集約して解析することにより、肝毒性予測の精度向上に寄与する専門的知見の蓄積を図った。

その結果、以下のように、肝毒性の懸念がある物質をスクリーニングする際に有用な知見を整理できた。logP と分子量の 2 項目の物性情報に絞り込むことにより、肝毒性リスクがある物質を簡易にスクリーニングすることが可能である。肝血中比、胆汁/尿中排泄比、 $T_{1/2}$ 、 T_{max} といった肝臓への分布の高さや代謝のされにくさに関係する ADME 情報は、この 2 項目との相関がみられ、肝毒性リスクを裏打ちすることが確認できた。また、構造アラートによって肝臓への蓄積や反応性の高さを推定することができた。これは今後の予測モデルに組み込むことが可能と考えられ、*in silico* 予測の精緻化に資するため、さらなる知見の蓄積を進めていく必要がある。さらに、農薬としての作用機序の中にも肝毒性リスクが見いだされた。すなわち、アラート構造、作用機序、物性、体内動態を考慮に入れることで、簡便かつ多角的に肝毒性の懸念がある物質をスクリーニングできることが確認できた。

本検討では、肝毒性陽性物質を検出する感度を向上させることに焦点を当てたが、予測結果の利用にあたっては、その目的に応じて予測結果の信頼性を評価する必要がある。その信頼性の向上のためには、物性情報と構造アラートあるいは毒性機序、毒性既知の類似物質の予測性を確認した結果など、複数の情報を組み合わせて予測結果を総合的に評価することが重要である。

(1-2) NAMデータの活用によるピロリジジナルカロイドの肝毒性の包括的な評価事例

ピロリジジナルカロイド (pyrrolizidine alkaloid, PA) は、植物で合成される毒素であり、PA を含む植物を含有または混入した食品の報告から、それらをヒトが摂取した場合、肝毒性、遺伝毒性および発がん性の懸念がある。600 種類以上の PAs が存在し、構造から 3 タイプ (レトロネシン/ヘリオトリジン/オトネシン) に大別されるが、その多くについてリスク評価は行われていない。一方、いくつかの PA について、構造毒性相関、PBPK モデリング、毒性バイオマーカー、*in vitro* 肝毒性、*in vitro* 遺伝毒性を含む安全性評価研究が進められている。このような toxicokinetics や toxicodynamics を包含する動物を用いない *in silico*, *in vitro* 等のアプローチは、近年 New Approach Methodology (NAM) として総称され、それらを統合して利用することにより、リスク評価の信頼性を向上させると期待されている。本研究では、有害性情報が限られているフキのオトネシンタイプの PA の肝毒性について、既存情報と NAM データを精査し、それらを統合して包括的に有害性を評価する事例研究を実施した。なお、収集した情報の詳細と出典は、付録 1-3 の PA 評価書に記載している。

PA の化学構造・分類

PA はネシンと称される塩基母核 (ネシン塩基) とネシン酸と称される炭素数 5 から 10 までの有機酸から構成される化合物で、ネシン塩基の構造により、レトロネシン、ヘリオトリジン及びオトネシンの 3 タイプに分類され、ネシン酸のエステル結合によりモノエステル、ジエステル及び環状ジエステル構造が含まれる。フキの PA としては、petasitenine、neopetasitenine、senkirkine が知られており、フキ (キク科キク属、*Petasites japonicus* Maxim.) の葉柄 (ふき) と花穂 (ふきのとう) に含まれる。いずれも 1,2-unsaturated PA で、環状ジエステル構造をもつオトネシンタイプである (図 1-3)。

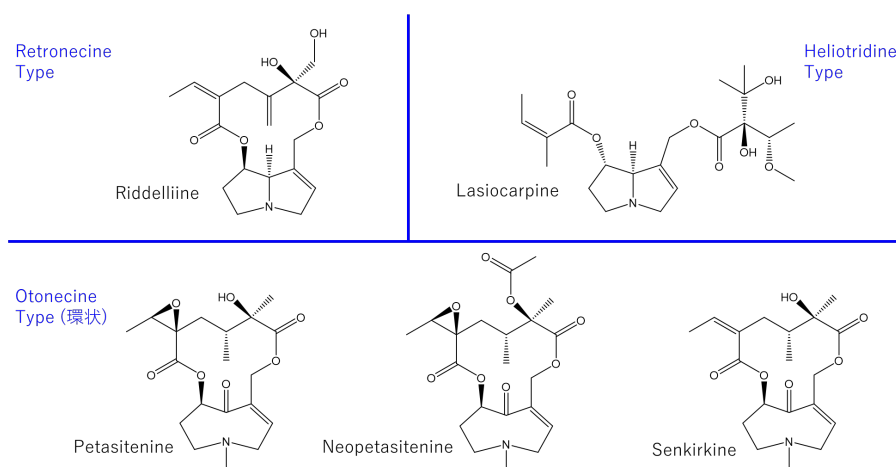


図 1-3. PA のタイプと主な PA の化学構造

Petasitenine および関連する PA の毒性

Petasitenine の毒性情報は非常に限られている。急性毒性の試験データは見つけれなかった。反復投与毒性試験では、ラットに petasitenine を飲水投与した際の死亡例において肝臓の出血、壊死および胆管増生がみられた。一方、senkirkine は、急性毒性試験では、LD50 は 220 mg/kg (i.p.) であったが、反復投与毒性試験データは認められなかった。

レトロネシンタイプの riddelliine をラットに週 5 日間で 105 週投与した際には、0.033 mg/kg/day で肝細胞肥大が認められ、NOAEL は 0.01 mg/kg/day と判断された。その他の PA の動物における慢性毒性試験では、単回投与の致死用量以下あるいは反復投与可能な用量において、巨大肝細胞、肝線維化、

中心静脈および小葉下静脈の閉塞、胆管増生および結節が認められた。ヒトにおいて、PAを含む漢方薬やお茶などの摂取により急性肝障害が生じ、時には死亡した事例が報告されている。特徴的な症状として、肝静脈閉塞症（HVOD）あるいは肝類洞閉塞症（HSOS）が知られている。いくつかの症例から、ヒトにおいて急性または短期ばく露後に肝毒性を発現するPAの最低用量は0.8~1.7 mg/kg/dayと結論された。

遺伝毒性については、オトネシンタイプの *petasitenine* および *senkirkine* において、Ames 変異原性および *in vitro* 染色体異常試験で陽性結果が見られた。レトロネシンあるいはヘリオトリジンタイプのPAにおいて、DNA付加体形成、DNA鎖切断、UDS試験、Ames試験、小核試験などで陽性結果がみられ、PAは全般に遺伝毒性があると考えられている。

発がん性については、*petasitenine* および *senkirkine* において肝血管肉腫と肝細胞腺腫および肝細胞腺腫がそれぞれ認められた。レトロネシンタイプの *riddelliine* では肝血管肉腫と単核細胞白血病、*monocrotaline* では肝細胞がんと肺腺がん、ヘリオトリジンタイプの *lasiocarpine* では肝血管肉腫と気管および肺胞の腫瘍が報告されている。*Riddelliine*、*monocrotaline* および *lasiocarpine* は、International Agency for Research on Cancer (IARC) の発がん性分類においてグループ2B（ヒトに対して発がん性がある可能性がある）である。ほかのPAについては同分類でグループ3（ヒトに対する発がん性について分類できない）とされている。いずれのPAについても、ヒトでの発がん性に関する疫学データはない。

PAのADMEおよび肝毒性の想定作用機序

オトネシンタイプ *petasitenine*、*neopetasitenine* および *senkirkine*、レトロネシンタイプの *riddelliine* の経口投与後の T_{max} は1時間以内であり、吸収は速やかである。PAの肝毒性発現に関連した代謝経路を図1-4に示した。

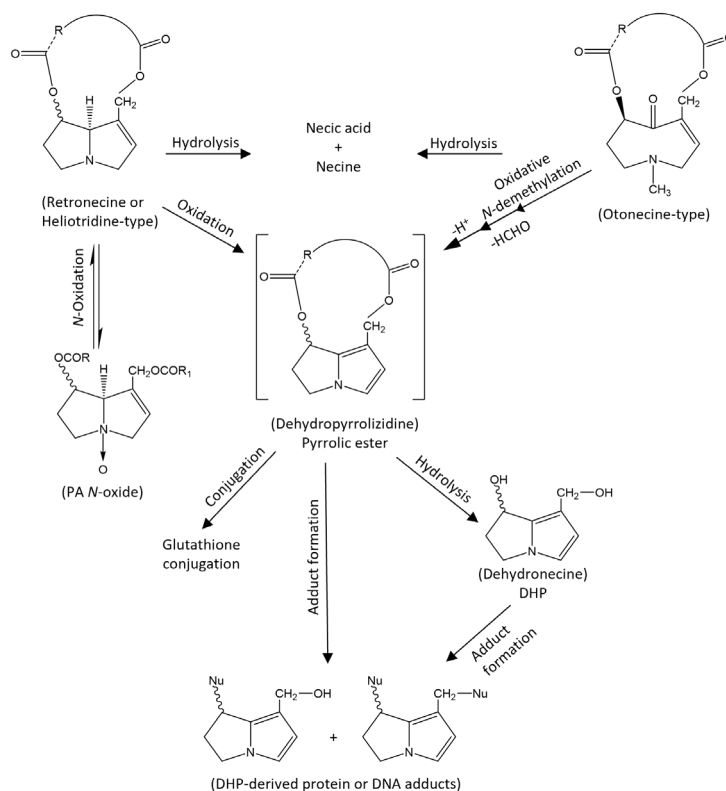


図 1-4. PAの代謝経路（Chen et al, 2010 より改変）

レトロネシン、ヘリオトリジンタイプの PA は、肝細胞のミクロソームに多く含まれる P450 やフラビン含有モノオキシゲナーゼにより一部は N-oxide に代謝され、その一部は尿に排泄される。オトネシンタイプの PA は酸化的 N-脱メチル化によりホルムアルデヒドが外れ、N-oxide の形成はない。いずれのタイプも P450 などにより dihydropyrrolizine (DHP) エステルに代謝され、さらに加水分解され DHP を形成する。DHP はタンパク質や DNA 等生体内高分子と付加体あるいは架橋を形成するため、肝毒性の原因となると考えられている。ヒトでは、CYP3A、CYP2A および CYP2B などがこの代謝活性化に関与している。

げっ歯類を用いた PA 急性毒性試験では、小葉中心性に巨大肝細胞がみられ、引き続き細胞死が起こるが、これは DNA との結合により細胞増殖が G2/M 期で停止したためと考えられている。一方、PA を反復投与した際には類洞内皮細胞の破壊により出血が起こり、肝細胞が虚血に陥る。P450 により代謝された際にグルタチオンの枯渇が起こり、最も感受性が高い類洞内皮細胞に影響すると考えられている。これらの変化は、ヒトにおける肝静脈閉塞症あるいは肝類洞閉塞症の病態に関連していると考えられている。

NAM を用いたオトネシンタイプの PA の肝毒性の評価

以上の既知情報の精査により、オトネシン、レトロネシン、ヘリオトリジンタイプの PA はいずれも肝臓が主要な標的であり、その毒性発現は、肝臓での代謝により生成する反応性が高い DHP 体の生体高分子との反応が関連すると考えられる。したがって、*in vivo* の定量的な毒性試験データが不足するオトネシンタイプの PA の肝毒性を効率的かつ迅速に評価するためには、レトロネシン、ヘリオトリジンタイプの PA と相対的な毒性強度を比較し、包括的に評価するアプローチの適用が有用と考えられる。

PA の肝毒性は、肝臓での P450 による酸化的代謝により生成した反応性が高い DHP エステルまたは DHP が、生体高分子と付加体を生成することにより引き起こされると考えられている (図 1-4)。そこで、DHP 体の生成および生体高分子との付加体形成と関連する *in vitro* および *in vivo* の指標を選定してその効力のデータを相互比較することにより、*in vivo* での相対的な肝毒性強度の予測を検討した (表 1-8)。

本研究課題では、オトネシンタイプの petasitenine、neopetasitenine、senkirkine およびレトロネシンタイプの riddelliine について、システイントラップ法によるヒト肝ミクロソームにおける反応性代謝物の生成量を測定した^{*2}。その結果、riddelliine の反応性代謝物の生成率を 1 とした場合、petasitenine および senkirkine はそれぞれ 0.64、0.30 と低かった。Neopetasitenine は、riddelliine と比べて反応性代謝物の生成率はやや高かった (2.14) が、個別課題 2 の結果で示されたように、生体内では、neopetasitenine は脱アセチル化を受けて速やかに petasitenine に変換されることから、neopetasitenine は生体内では petasitenine と肝毒性発現の観点から類似すると考えられる。

また、Ruan ら^{*1}は、12 種類の PA について、ヒト肝ミクロソーム反応系における GSH 付加体量を測定したところ、GSH 付加体量は、レトロネシンタイプの riddelliine を 1 とした場合、ヘリオトリジンタイプの lasiocarpine の 1.59 に対し、オトネシンタイプの senkirkine で 0.21、clivorine で 0.38 であった。

Louisse ら^{*3}は、37 種類の PA について、ヒト HepaRG 細胞において二本鎖 DNA 切断の指標となるヒストンリン酸化 (γ H2AX) の誘導を比較した。Benchmark Concentration (BMC) やそれに基づく相対的な効力 (Relative Potency Factor, RPF) を比較した結果、オトネシンタイプの senkirkine と otosenine (それぞれ 0.23、0.11) は、レトロネシンタイプの riddelliine、jacobine、senecionine およびヘリオトリジンタイプの lasiocarpine (それぞれ 1、0.94、1.24、1.08) より数倍弱かった。

表 1-8. PA の反応性代謝物の生成および生体高分子との反応性に関連するデータの比較

Type	Retronecine Type							
Chemical name	Riddelliine	Riddelliine <i>N</i> -oxide	Retrorsine	Seneciphylline	Senecionine	Integerrimine	Monocrotaline	Jacobine
Structure								
MW	349.386	365.386	351.402	333.387	335.403	335.403	325.364	351.402
S+logP (ADMET Predictor)	-0.419	-1.424	-0.291	0.418	0.597	0.597	-0.636	0.287
CYP species involved in protein adduct formation ^{*1}	3A4, 3A5, 2A6, 2D6, 2B6, 2E1, 2C9, 1A2, 1A1, 2C19	-	2A6, 3A4, 3A5, 2D6, 2B6, 2C19, 2C9, 2E1, 1A2, 1A1	3A5, 3A4, 2A6, 2D6, 2B6, 2E1, 2C19, 2C9, 1A1, 1A2	3A4, 3A5, 2A6, 2D6, 2C9, 2C19, 2B6, 2E1, 1A2, 1A1	3A5, 3A4, 2E1, 2C19, 2D6, 2B6, 2A6, 1A2, 1A1, 2C9	2A6, 2E1, 3A5, 2B6, 3A4, 2D6, 1A2, 1A1, 2C9, 2C19	-
Cysteine adduct formation in human liver microsomes ^{*2}	1	-	-	-	-	-	-	-
GSH adduct formation in human liver microsomes ^{*1}	1	-	0.79	1.24	1.53	1.18	0.44	-
Induction of histone phosphorylation in HepaRG ^{*3}	1	-	0.9	1.2	1.24	0.75	0.06	0.94
Amount of GSH adduct in liver of mice ^{*2}	1	-	1.04	0.8	1.24	1.47	0.16	-
Amount of DNA adduct in liver of rat ^{*4}	1	0.64	2.57	-	-	-	0.95	-
Levels of DHP-protein adducts in Hgb fraction ^{*5}	1	0.59	1.08	-	-	-	2.19	-
Type	Heliotridine Type		Platyneceine Type	Otonecine Type				
Chemical name	Lasiocarpine	Heliotrine	Platyphylline	Senkirkine	clivorine	petasitenine	neopetasitenine	Otosenine
Structure								
MW	395.499	313.396	337.419	365.429	405.451	381.429	423.466	381.429
S+logP (ADMET Predictor)	2.08	0.636	0.593	0.505	1.11	0.326	0.793	0.326
CYP species involved in protein adduct formation ^{*1}	3A4, 3A5, 1A1, 2D6, 2C19, 2C9, 1A2, 2B6, 2A6, 2E1	-	-	3A5, 3A4	3A5, 3A4	-	-	-
Cysteine adduct formation in human liver microsomes ^{*2}	-	-	-	0.64	-	0.3	2.14	-
GSH adduct formation in human liver microsomes ^{*1}	1.59	0.03	ND	0.21	0.38	-	-	-
Induction of histone phosphorylation in HepaRG ^{*3}	1.08	0.09	-	0.23	-	-	-	0.11
Amount of GSH adduct in liver of mice ^{*2}	1.14	N.D.	ND	0.65	0.27	-	-	-
Amount of DNA adduct in liver of rat ^{*4}	1.91	0.31	<LOD	0.39	0.28	-	-	-
Levels of DHP-protein adducts in Hgb fraction ^{*5}	0.94	0.2	0.07	0.52	0.21	-	-	-

-: no data, ND: not detected, LOD: limit of detection

*1 Ruan et al., Chem. Res. Toxicol. 2014, 27, 1030–1039

*2 performed in this study

*3 Louisse et al., Food Chem. Toxicol., 2019, 131, 110532

*4 Xia et al., Chem. Res. Toxicol. 2013, 26, 1384–1396

*5 Xia et al., Chem. Res. Toxicol. 2016, 29, 1282–1292

Ruan ら^{*2}は、12 種類の PA について、それぞれを一定量マウスに投与し、24 時間後の肝臓におけるグルタチオン抱合体量を測定した。オトネシンタイプの senkirkine と clivorine の GSH 付加体量は、レトロネシンタイプの riddelliine と比べてそれぞれ 7 割未満、3 割未満であり、ヘリオトリジンタイプの

lasiocarpine と比べてそれぞれ 6 割未満、3 割未満であった。

Xia ら^{*4}は、11 種類の PA について、それぞれ一定量を 3 日間ラットに投与し、肝臓における DNA 付加体量を測定した。オトネシンタイプの *senkirikine* と *clivorine* のタンパク付加体量は、レトロネシンタイプの *riddelliine* と比べてそれぞれ 4 割未満、3 割未満であった。

Xia ら^{*5}は、11 種類の PA について、それぞれ一定量を 3 日間ラットに投与し、血液における付加体量を測定した。オトネシンタイプの *senkirikine* と *clivorine* の DNA 付加体量は、レトロネシンタイプの *riddelliine* と比べてそれぞれ約 5 割、3 割であった。

オトネシンタイプの PA 同士の構造の相違は、トキシコキネティクスの観点から、個別研究 2 の結果より、*senkirikine* と *petasitenine* の間に大きな影響を及ぼさないと考えられた。さらに、肝ミクロソーム系の反応性代謝物生成の観点から、*senkirikine* は *petasitenine* と比べてやや値は高かったが、その差は 2 倍以内であった^{*2}。

いずれの試験においても、オトネシンタイプの PA はレトロネシンタイプの *riddelliine* よりも弱く、ほぼ一貫した結果が得られている。これらを総合して評価すると、フキに含まれるオトネシンタイプの PA (*petasitenine*、*neopetasitenine*、*senkirikine*) の肝毒性は、ほかのいくつかの PA と同等に強力であるものの、毒性情報が豊富で最も強力なレトロネシンタイプの *riddelliine* と比較すると、相対的にやや低いか安全側に立つとほぼ同等と予測される。

ヒトでの肝毒性のポテンシーを比較するうえで臨床の知見は重要であるが、PA による肝毒性の発症について体系的に調べることは困難である。しかし、毒性を予測できるような臨床におけるバイオマーカーがあれば、その可能性は広がる。血中での DHP とタンパク質との付加体は PA の肝毒性バイオマーカーの候補になりうるもので、PA によって肝毒性が発症した症例について検討が実際に行われている (Lin et al, 2011)。中国で肝障害を発症した数百人の患者から、その血液中の DHP タンパク付加体を検査した結果、PA を摂取したことが判明した患者の約 35%において陽性結果が得られた (Gao et al., 2015; Ruan et al., 2015)。今後、各々の PA の肝毒性ポテンシーについての臨床における知見が増えていくものと思われる。

本事例研究では、オトネシンタイプの PA は、レトロネシンタイプやヘリオトリジンタイプの PA と同様に、肝臓での代謝により、反応性が高く肝毒性と関連する DHP 体が生成するという類似性の仮説に基づき、関連する NAM のデータを収集し、肝毒性の相対的強度を検討した。しかし、オトネシンタイプの PA の代謝情報は不足しており、別の代謝経路が存在する可能性も排除できない。したがって、その肝毒性についてより精緻な定量的評価が必要な場合には、このような不確実性が存在することに留意する必要がある。

(1-3) 食品関連物質の安全性評価に資するヒト代謝予測データの生成

農薬や化学物質の安全性評価では、実験動物で得られたデータをヒトへの外挿に利用する。代謝は重要な情報であるが、評価対象となる物質のヒトにおける代謝情報は限られている場合が多い。そこで本事例研究では、肝毒性が懸念される農薬や化学物質を対象に、精度の高い *in silico* 代謝予測系を適用してヒト安全性評価に資する代謝情報の提供を例示し、その有用性と課題を考察する。

基質テンプレートシステムに基づくヒト P450 代謝予測系

近年、医薬品などを対象に、代謝を予測する種々のモデルが開発されている。多くのモデルは統計的なアルゴリズムに基づいており、予測の根拠は明確でない。生成される可能性がある代謝物の構造を複数提示し、感度は高いが、確からしい代謝物の選定はユーザーに委ねられ、予測結果の活用は容

易ではない。

一方、国内では、ヒトの P450 の基質構造の重ね合わせにより構築されたテンプレートと、基質の代謝部位等の詳細な解析から提唱された立体的な認識機構に基づく精度の高い P450 代謝予測モデルが確立しつつある。P450 分子種毎にモデルが開発されているが、本事例では、ヒトにおける薬物代謝に重要な役割を果たす CYP3A4 を対象とした (Yamazoe et al., 2020, 2021)。

アゾール系抗菌剤のヒト CYP3A4 阻害と酸化代謝の予測

イミダゾール系およびトリアゾール系殺菌剤は、臨床用医薬品や農薬として使用されている。ステロール生合成やレチノイン酸代謝に影響を及ぼし有害事象と関連する可能性があると考えられている。これらの殺菌剤の実験動物やヒトにおける生物学的半減期は長い。臨床で使用される殺菌剤のヒト代謝動態は、代謝酵素の種類や代謝物の性質など個人差を考慮した検討が必要である。しかし、農薬ではげっ歯類での代謝経路情報はあつものの、ヒトでの代謝経路はほとんど未解明である。

CYP3A4 と相互作用することが知られている臨床用アゾール系殺菌剤のデータを用いて、CYP3A4 テンプレート系の適用性を確認し、テンプレート上での相互作用を忠実に再現できることを確認した。次に、20 種類以上のアゾール系農薬を同テンプレート系に適用した。タラロゾールを除くすべてのアゾール類の立体異性体は、トリアゾールまたはイミダゾール部分の窒素原子を介して相互作用し、3 つの必須相互作用を満たすことで安定に阻害されることが確認された。

CYP3A4 を介した酸化反応では、アゾール系農薬のエナンチオマー (図 1-5) とジアステレオマー (data not shown) は明確に区別されることが示唆された。したがって、これらの立体異性体は、それぞれの位置および立体選択的な代謝プロファイルを有すると考えられる。CYP3A4 テンプレート系で得られた各アゾールの代謝プロファイルは、ラットにおける *in vivo* 代謝のプロファイルと類似していた。これらの結果は、ラットおよびヒトにおいて、ほとんどのアゾール系農薬の代謝に CYP3A が関与していること、さらに、アゾール系農薬の代謝に関して、ラットとヒトの間に顕著な種差はないことを示唆している。ただ、ヒトの CYP3A4 とラットの CYP3A1 では基質特異性が若干異なることが知られている。このため、確実な予測には慎重な実験と解析が必要である。



図 1-5. ヒト CYP3A4 による抗菌剤 Myclobutanil の立体特異的な代謝とその部位の予測

CYP3A4 を介したブチルヒドロキシトルエンのヒト代謝予測

ジ-*tert*-ブチルフェノール骨格を有するタゾフェロンをヒト CYP3A4 テンプレートシステムに適用したところ、テンプレート上の特定部位と基質の共通の相互作用に基づいて、代謝物であるキノールが生成されることが予測された (図 1-6)。

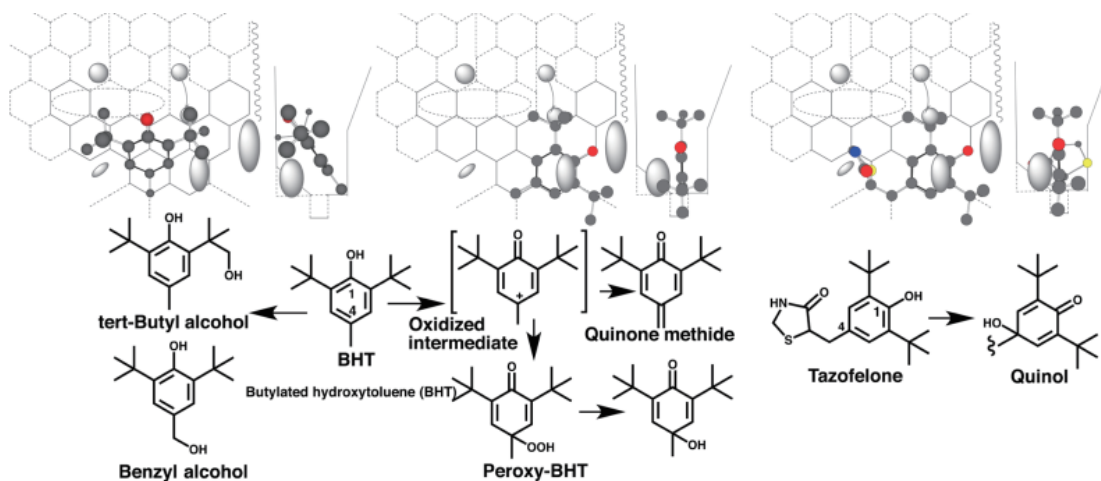


図 1-6. ヒト CYP3A4 を介した BHT とタゾフェロンの酸化反応とテンプレートへの配置

さらに、動物用飼料ならびにプラスチック製品に対する抗酸化剤として使用されるブチルヒドロキシトルエン（BHT）を適用したところ、同様の相互作用により、代謝物として tert-butyl alcohol、benzyl alcohol、hydroperoxy 誘導体および反応性が高い quinonemethide 体が予測され、既報の代謝物構造が再現された。BHT およびこれらの代謝物は肝臓に蓄積されやすく、肝毒性の可能性を示唆する。

In silico ヒト代謝予測系の利点と課題

本事例では、選定した農薬と化学物質をヒト CYP3A4 代謝予測モデルに適用した結果、CYP3A4 の基質となる物質の代謝物の予測された構造は、既知の構造と一致することが確認された。さらなる検討は必要であるが、同モデルが農薬や化学物質のヒト代謝情報を提供するツールとして利用できる可能性が示唆された。

ただ、CYP3A4 ならびに他の P450 分子種は、基質のわずかな構造の違いにより、異なる代謝物を生成する場合があることも知られている。予測結果の信頼性を確認するためには、評価対象物質および代謝既知の関連物質が共通の相互作用に基づいて予測されるかを確認するとともに、評価に関連するあらゆる情報の収集とその多面的な解析により、エビデンスの一貫性を確認することが有効であると考えられる。

評価対象物質のヒトでの代謝に関する情報は、ヒト試料を用いた *in vitro* 試験の実施によって得ることができる。しかし、*in silico* ヒト代謝予測モデルは、*in vitro* 試験で検出が難しい不安定な代謝物も含めて推定される代謝物の構造情報を提示する。これらの情報を活用することにより、代謝と毒性発現の関連性を考察することが可能となるほか、実試験における代謝物の同定に要する時間やコストを削減して効率化を図ることが可能になると考えられる。本事例研究では、ヒト CYP3A4 の役割のみを検討したが、*in vivo* の精緻な代謝予測へ向けては、他の P450 分子種の相対的な寄与も検討する必要がある。

(1-4) ヒトで肝毒性の懸念がある物質のリスク評価を精緻化するための *in silico* 手法の適用

ヒトが食品を介してある程度摂取しており、ヒトで毒性症例が認められていることが知られている物質を事例として取り上げることが *in silico* 手法の有用性の実証のためによいと考えられることから、クマリンを対象とした。本事例研究では、ヒトにおけるクマリンを介した肝毒性を理解するために、

ばく露、体内動態および毒性情報を多面的に再評価した。さらに、ヒト肝毒性構造活性相関モデルと個別課題 2 において開発したヒト PBPK モデルを適用した。ヒトでのリスクの評価を精緻化するために、*in silico* 手法がどのような情報を提供できるかを明示し、その有用性を考察する。

ばく露評価

クマリンは桜餅や明日葉等に含まれるが、食品からの摂取は、主にシナモンを含む製品由来と考えられている。東京都健康安全センターの平成 19 年の調査では、シナモンの摂取量をシナモンを振りかけたトーストで 0.4 g、コーヒーで 0.05 g、紅茶（チャイ）で 0.05 g、及びシナモンクッキーで 40 g と仮定すると、クマリンの総量として、1日に 2.45 mg が摂取されるとしている。一方、同調査ではシナモンが含まれるサプリメントが服用されると、クマリンとして 2.73 mg が摂取されるとしている。その場合には、クマリンの 1 日摂取量は 5.18 mg となる。海外では、EFSA の評価において、シナモンなどからのクマリンの平均摂取量は成人において 1.3 mg/day と算出されている。ノルウェーやドイツでは、食品から 60mg/日（体重 50kg の場合）のクマリン摂取量が報告されている。これらの結果から、平均的な摂取量は 1 日あたり約 1~3mg と推定され、また、最悪の場合、平均摂取量の 10 倍程度となることが示唆される。

ADME 情報

クマリンの ADME の特徴は、経口から摂取されるとその半分以上が消化管で吸収され、主に肝臓で代謝され尿中に排泄され、蓄積性は認められない。肝臓の代謝においてクマリンは主に 7 位が水酸化を受け、グルクロン酸抱合を経て尿中排泄されるが、種差及び個人差が想定されている。一方で、3 位（または 4 位）の酸化により反応性が高いエポキシド、続く反応により *o*-ヒドロキシフェニル酢酸が生成される。このエポキシドを介する代謝経路は肝障害と関連すると考えられている。ヒトにおいては、クマリンの 7 位水酸化に関わる解毒酵素に遺伝的な差異があることが知られているが、この遺伝的な代謝の差異がクマリンの毒性とどのように関わるかについては、よくわかっていない。

毒性情報

反復投与毒性試験において、主要な標的臓器は肝臓であるが、障害性の変化はイヌが最も感受性が高く 25 mg/kg/day の投与でみられた。ラットやマウスでは 50 mg/kg/day 以上でみられているが肝臓の障害性の程度は低く、ヒビでは最高用量の 67.5 mg/kg/day でも障害性の変化は認められなかった。イヌの慢性毒性試験の NOAEL である 10 mg/kg/day に基づき、種差と個体差を考慮した不確実係数（100）から、体重 50 kg で換算すると ADI は 5.0 mg/person/day と考えられた。

一方、ヒトでのデータは限定的で、明確に食品由来のクマリンの毒性を示すデータはないが、クマリン 3.3~6.6mg に相当するシナモン 1~2g を毎日 2 ヶ月間摂取した 23 歳の女性が肝炎で入院した例などがある。クマリンは一時期医薬品として使用され、副作用として血中での肝逸脱酵素の上昇等が報告されている。リンパ浮腫の患者にはクマリンを 25mg/日以上用量で投与していた国もあるが、肝毒性の発現により中止となった。医薬品としての用量は 1 日あたり 25 mg 以上で、食品から摂取される場合よりも全般に多いが、その肝毒性発生頻度は 0.3%程度と推定されている。

ヒト肝毒性構造活性相関モデルの適用

クマリンの主要な標的は肝臓であることから、ヒト肝毒性の評価のための新しい方法として FDA の DILI score モデルの適用を検討した。ヒトにおける数多くの薬物誘発性肝障害(DILI)症例と、一日用量、

疎水性、反応性代謝物の生成などの情報を統合したモデル（米国 FDA National Center for Toxicological Research (NCTR)が開発）であり、構造が類似する薬物ペアのヒト肝毒性物質を正しく識別することが可能とされている。非臨床試験で予測することが困難な発症頻度が極めて低いヒトの薬物性肝障害を予測することができる。一方で食品関連物質を適用した事例はなく、その拡張性は明らかでない。そこで、クマリンが DILI score モデルの適用範囲内にあるかを検討した。本モデルは logP が最も重要な記述子であるが、クマリンの logP（計算値）は 1.39 であり、公開されている医薬品データセットの logP 計算値（-4~8）の範囲内であった（図 1-7）。

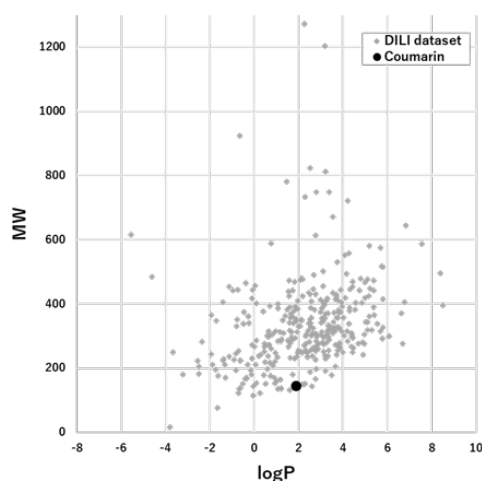


図 1-7. DILI score モデルの構築に使われた医薬品とクマリンの logP 推計値と分子量の分布

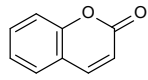
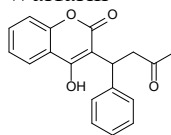
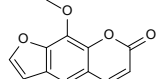
Chemotype はデータセットの化学空間を記述するための方法のひとつとしてしばしば用いられる。Benzopyron 構造を含むクマリンの chemotype はいずれも DILI score モデルのデータセットに認められた（表 1-9）。OECD QSAR Toolbox を用いた種々の化学構造のプロファイリングによっても同様の結果が得られた（data not shown）。まとめると、DILI score モデルの構築に用いられた 354 種類の薬剤とクマリンの logP、分子量及びケモタイプの比較を行い、クマリンは 354 薬剤の範囲に入ることを確認した。以上から、クマリンは本モデルの適用範囲内にあると考えられた。

表 1-9. Chemotype of coumarin and duplication in the set of 354 molecules for constructing the FDA DILI score model.

Chemotype contained in coumarin	No. of duplications in the set molecules
bond:C(=O)O_carboxylicEster_alkenyl	9
bond:C=O_carbonyl_generic	228
chain:alkeneCyclic_ethylene_C(connect_noZ)	37
chain:alkeneCyclic_ethylene_generic	67
chain:aromaticAlkane_Ph-C1_cyclic	83
chain:aromaticAlkene_Ph-C2_cyclic	11
ring:aromatic_benzene	264
ring:hetero [6] O_pyran_generic	15
ring:hetero [6] Z_1-	100
ring:hetero [6] Z_generic	152
ring:hetero [6 6] O_benzopyran	3
ring:hetero [6 6] O_benzopyrone (1 2-)	1
ring:hetero [6 6] Z_generic	52

クマリンを本モデルに適用すると、摂取量が 2.5 および 25 mg/day（食品からのクマリンの平均的な摂取量およびその 10 倍量でおよそワーストケースに相当）の場合は DILI score は 3.71 および 5.11 で、いずれも moderate risk（3～6）と判定された（表 1-10）。いずれも、代謝においてエポキシド体が生成されることから反応性代謝物の生成ありとした場合の結果である。

表 1-10. Application of coumarin and relating drugs to FDA DILI score model.

Chemicals	Daily Dose (mg/day)	logP	RM Formation	DILI score	DILI risk	Remarks
Coumarin 	2.5	1.39	Yes (1)	3.71	M	Daily dose as food with very occasional elevated liver enzymes.
	25			5.11	M	Daily dose as medicine for lymphedema and occasionally taken as food with occasional elevated liver enzymes.
Warfarin 	2	2.44	No (0)	0.98	L	Daily dose as medicine (anticoagulant) with rare hepatotoxicity cases.
	10			1.95	L	
Methoxsalen 	3	1.93	Yes (1)	3.92	M	Daily dose as medicine for psoriasis with occasional elevated liver enzymes (2%–12% of patients).
	40			5.51	M	

クマリン系の薬剤は医薬品にいくつか含まれる。そのひとつであるワルファリンは、抗凝固剤として広く使われ、多くの患者に長期間に渡って投与されてきたが、肝障害との関連はあまりない。一方、同様にクマリン系の薬剤である methoxsalen は、臨床試験において投与された患者の 2%～12%に肝酵素の上昇がみられたとの報告がある。これらについて本モデルに適用した場合には、ワルファリンは、10 mg/day 投与で low risk（DILI score = 1.95）である一方、methoxsalen は 3 mg/day で middle risk（DILI score = 5.51）と判定された（なお、methoxsalen はクマリンと同様にエポキシド体を生成することから、反応代謝物の生成ありとした。）。これらのクマリンと構造類似の薬剤の肝毒性予測結果は、ヒトでの肝毒性とよく一致した。

構造活性相関モデルには、予測性の高い領域と低い領域が存在し、予測性能は局所的に変化することを考慮する必要がある。評価対象物質と類似する物質について、既知の毒性を予測モデルが正しく予測できるかを確認することによって、評価対象物質の予測結果の信頼性を確認することができると考えられる。以上より、DILI score モデルにより生成されたクマリンの肝毒性の予測結果は、ヒトでのクマリンの肝毒性の懸念を示唆すると考えられる。

クマリンによるヒトの肝毒性リスク評価の精緻化へ向けた課題

ヒトにおいて、クマリンは 7-水酸化クマリンへの解毒代謝が主体で、すみやかに尿中排泄されるのに対し、ラットでは、血中濃度において毒性経路である 3,4 位エポキシド化を経由して生成される o-ヒドロキシフェニル酢酸が、未変化体の半分程度まで増加することが報告されている。ラットでは胆汁排泄が主であるために肝毒性発現が起りやすいと考えられる。一方、ヒトでは尿中排泄が主体で、o-ヒドロキシフェニル酢酸の濃度はわずかに増加するだけである。

個別課題 2 で開発されたクマリンを対照としたヒト PBPK モデルを使用して、ヒトにおけるクマリンおよび *o*-ヒドロキシフェニル酢酸の最大血漿中濃度を推定したところ、25 mg/day を投与した際には最大でそれぞれ 19 nM、2 nM であった。これはラットで肝毒性が観察されたときのクマリンと *o*-ヒドロキシフェニル酢酸の血中濃度（それぞれ約 200 μM, 80 μM）と比較すると明らかに低かった。個別課題 3 で行われた試験結果より、クマリンの解毒過程である 7 位水酸化の反応速度は、ヒトはラットよりも 10 倍以上高いことが判明した。以上の薬物動態のデータから、ヒトのクマリン 25mg の摂取は、クマリン代謝の能力が平均的なレベルである限り、肝毒性に対する懸念は低いと考えられた。しかし、ヒト PBPK モデルによる薬物動態プロファイルは、クマリンを投与された少数の健常人の限られたデータに基づいて作成されていることに留意すべきである。

一方で、Abraham ら（2010 年）の報告では、医薬品としてのクマリンの臨床データの評価より、ヒトでは 25mg 以上のクマリンの摂取で肝毒性の懸念が否定できないことと、クマリンによる肝毒性に対して高い感受性を持つ亜集団の存在を示唆している。個別課題 3 では、クマリンの解毒過程に関係する 7 位水酸化には主に CYP2A6 が関与することが示された。クマリンの肝毒性発現に関係する *o*-ヒドロキシフェニル酢酸の生成には、CYP1A2 と CYP2E1 が関与することが示された。CYP2A6 には遺伝多型が知られている。また、CYP1A2 や CYP2E1 の発現量には喫煙や飲酒などの様々な環境要因が関与することが知られている。CYP2A6 遺伝子を欠損したタイプの人に CYP1A2 や CYP2E1 の誘導が起きた場合には、毒性影響が大きくなる可能性がある。ヒトにおけるクマリンで誘発される肝毒性を評価する際には、環境要因も含めた代謝の個人差を考慮する必要があることが示唆された。

また、本事例研究で使用した体内動態および肝毒性 *in silico* 予測モデルは、クマリンに限らず他の食品成分への適用事例を増やしていくことにより、ヒトでの肝毒性評価のための有効な手段となりうることを示唆された。

(2) 個別課題：食品関連化学物質を対象とした PBPK モデルの簡易構築とヒト外挿性を考慮した精緻化に関する研究（山崎 浩史（昭和薬科大学））

食品関連成分 104 種を経口投与した際のラットに対する毒性を示唆する 96 文献を収集した（付録 2-1）。経口投与されたクマリンのラット血中濃度文献情報を元に生理学的薬物動態モデルを構築した（図 2-1）。ラットとヒト肝試料によるクマリンの代謝消失の種差係数と、体重のべき乗比を考慮し、モデルで利用するパラメータ値をヒト用に外挿し、経口投与したクマリンのヒト体内動態予測を行った。項目 1 にて情報整理して得たクマリンの 1 日耐容量 5 mg/day を考慮し、クマリン 25 mg を 1 日 1 回 28 日仮想反復投与したところ、そのヒト血中濃度は初日と 28 日目で大きな変化はなく、それぞれ 0.40 と 0.41 ng/mL と推定された。

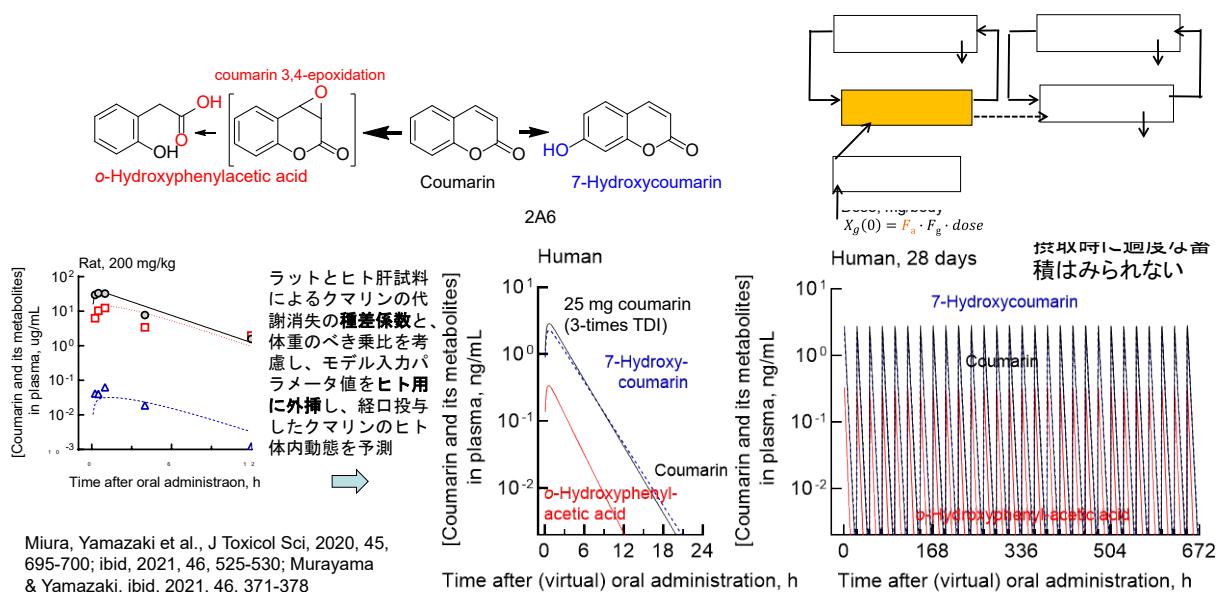
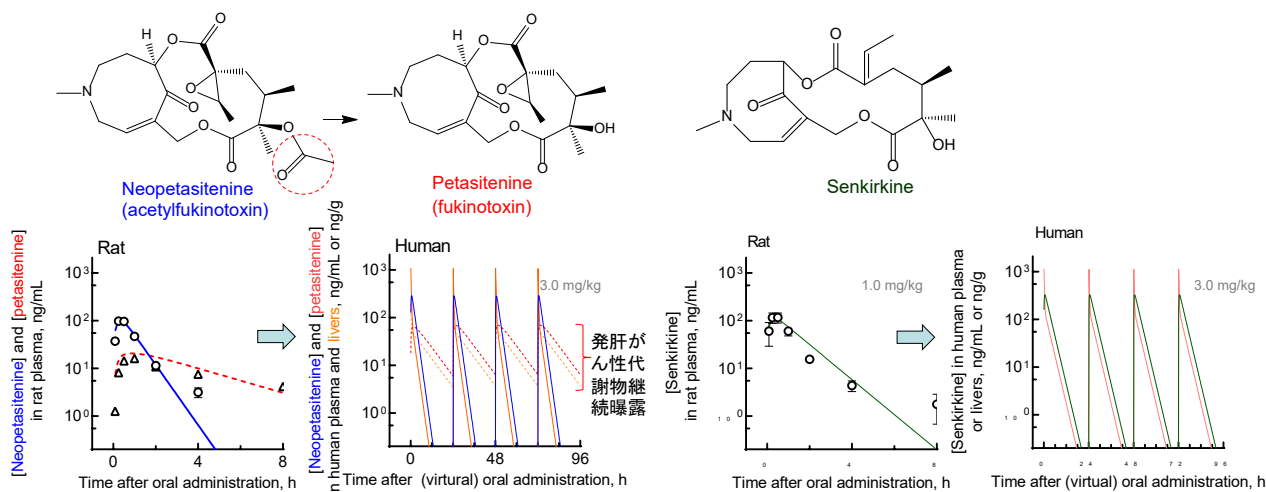


図 2-1 食品成分クマリンの生理学的薬物動態モデルを用いるヒト体内動態

和食での重要食材である国内産フキ試料において、neopetasitenine、petasitenine、senkirkine の 3 種でフキピロリジジナルカロイドの 99% に相当し、ネオペタシテニンが平均で約 6 割を占めることが判明している（農水省ホームページ）。標記フキ成分について、ラット生理学薬物モデルを構築した。これらを 1.0 mg/kg 仮想経口投与時の出力血中濃度レベルが実測可能と判断し、実際に経口投与後のラット血中濃度推移実測値を得た。これらの知見を元に、neopetasitenine が脱アセチル化を経て代謝物 petasitenine を主代謝物として生成する過程を数学的に記述するラット生理学薬物動態モデルを構築した（図 2-2）。

後述するラットとヒト肝試料によるピロリジジナルカロイドの代謝消失の種差係数を検討（個別課題 3）ののち、ラットとヒトの体重のべき乗比を考慮し、ラット用モデルで利用したパラメータ値をヒト用に外挿し、ヒト生理学薬物動態モデルを構築した。欧州にて総ピロリジジナルカロイド服用 4 日後に死亡例のあった投与量(3 mg/kg/day)を neopetasitenine の事例にあてはめ、フキ毒成分仮想ヒト経口投与と血中濃度曲線を得た。個別課題 3 にて後述する、より高肝毒性代謝物 petasitenine が一定程度ヒト血中濃度を保つことが推察され、これら知見を誌上発表した（Yanagi et al., 2021）。同様に、第 3 のフキ成分である senkirkine についても動物からヒト用モデルを構築し、誌上発表した（Kamiya et

al. 2022)。日本産フキ毒成分をピロリジンアルカロイドが混入したサラダ、シリアルや小麦の摂取により発生した欧州での事故事例にあてはめて考察すると、予め本物質の水溶性を利用した熱水中（除去）調理の上での食用利用が推奨された。



Yanagi, Yamazaki et al., J Toxicol Sci 46, 391-399, 2021; Kamiya, Yamazaki et al., Drug Metab Lett, in press (doi: 10.2174/1872312801666211220110055)

図 2-2 和食フキ成分(ピロリジンアルカロイド)のヒト体内動態

経口摂取食品成分の生理学的薬物動態モデルによる体内ばく露推定値を加味したリスク評価が今後の課題のひとつとなりうると思慮される。すなわち、入手可能な食品成分の動物毒性試験結果の文献情報を整理統合し、被験物質の生体外からの適応量から、生理学的薬物動態モデル手法を用い、個別動態パラメータ値を決定の上、毒性惹起に寄与する生体内血液や肝中物質濃度を推定し、体内ばく露推定値を加味したリスク評価へと発展させる方策である。本アプローチの検証事例を積み重ねることにより、将来の食品健康影響評価への適用が期待できる。

(3) 個別課題：食品関連化学物質のヒト健康影響評価の外挿精緻化に資する *in vitro* ADME 試験研究 (村山 典恵 (昭和薬科大学))

サプリメントとして汎用されるメリロートエキス中の指標成分クマリンは、市販製品ごとに含有量が異なり、一日許容摂取量以上が服用され中毒症状を呈することも少なくない。クマリンの毒性発現に関連するクマリン代謝消失経路について詳細に検討し、個別課題 2 の PBPK モデル構築のため、ヒトとラット肝酵素源の代謝消失速度を検討した (Miura et.al, J Toxicol Sci, 2020)。ラットとヒトのクマリン毒性発現の種差に関連した代謝経路の比率の差異を調べ、解毒経路である 7-水酸化体とは別に、代謝活性中間体を経て安定代謝物として捕捉される *o*-hydroxy phenyl acetic acid 生成経路がクマリン毒性発現に重要であった (図 3-1)。ヒト肝マイクロゾームを酵素源とし、典型的な酵素阻害剤共存下の酵素活性抑制作用と、組換えヒト P450 分子種を酵素源として用いたクマリン代謝反応速度の評価から、その生体内変換を司る責任酵素がヒト肝 CYP1A2 分子種であることを明らかにした (図 3-2, 図 3-3; Murray and Yamazaki, J Toxicol Sci, 2021)。本 CYP1A2 酵素はタバコや粉塵など外来化学物質による酵素誘導による変動が生じるヒト肝主要 P450 分子種であり、CYP1A2 上流の遺伝子多型に基づき CYP1A2 酵素誘導効果が増強される群が日本人では一定数存在することから、クマリン肝毒性発現の個人差の一要因となりうることを示唆された。

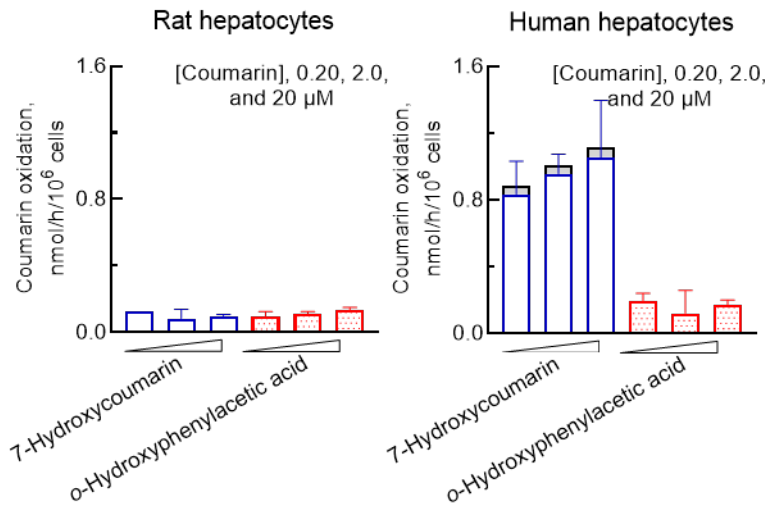


図 3-1 培養ラットおよびヒト肝細胞による 2 種のクマリン代謝物生成

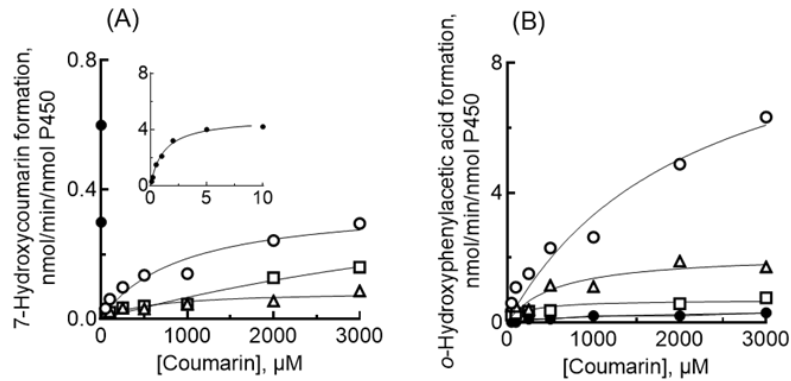


図 3-2 組換えヒト P450 酵素によるクマリン 7-水酸化と *o*-hydroxyphenylacetic acid 生成速度 : CYP 1A2 (open circles), 2E1 (triangles), 3A4 (squares), and 2A6 (closed circles)。

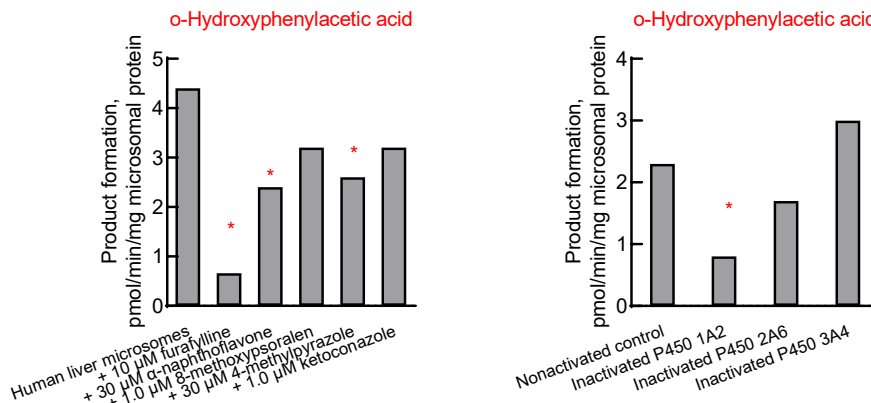


図 3-3. ヒト肝試料を用いたクマリン酸化的代謝に及ぼす P450 阻害剤の影響 (* $p < 0.05$)

前項(2)の PBPK モデル構築に必要なヒトとラットの種差係数算出のため、クマリンと同様に、日本産の和食用フキに含まれ、ピロリジンアルカロイド類に分類される **neopetasitenine**、**petasitenine** および **senkirkine** を選択し、ヒトとラット肝画分を用いて代謝消失速度(肝固有クリアランス) 算出した。**neopetasitenine** のラットおよびヒト肝固有クリアランス値は、肝ミクロゾームを用いた場合にそれぞれ 35 および 43 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ **microsomal protein**、ならびに肝臓 S9 を用いた場合に 4.5 および 5.6 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ **S9 protein** と算出された。ラットおよびヒト肝ミクロゾームによる代謝物 **petasitenine** の生成速度は、それぞれ 2.0 および 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ **microsomal protein** であった。代謝物 **neopetasitenine** のラットとヒト肝が触媒する 2 次代謝固有クリアランス値は、それぞれ 8.1 および 7.4 $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ **microsomal protein** であった。以上の結果より、ラットとヒトで **neopetasitenine** とその代謝物 **petasitenine** の肝固有代謝消失速度には大きな種差は認められないことが示唆された。第 3 のフキ毒成分 **senkirkine** に関しても、図 2-2 に示すヒト体内動態モデル予測のために、検討を行い、概ね同様の結果を得た。

日本産フキでの存在量が最大である **neopetasitenine** は、生体内で脱アセチル化を受け、**petasitenine** に変換されることから、**senkirkine** を加えた 3 種ピロリジンアルカロイドのヒト肝がん由来 HepaRG 細胞に対する毒性評価を行った。細胞毒性評価指標として、逸脱酵素 LDH 活性を測定した結果、**neopetasitenine** および **petasitenine** では添加濃度から換算した実際の血漿中濃度として、10~100 μM で有意な LDH の増加が認められた (図 3-4)。以上のことから、**neopetasitenine** は、肝への高用量ばく露によって、**petasitenine** への変換を経て肝毒性を惹起させる可能性が推察された。

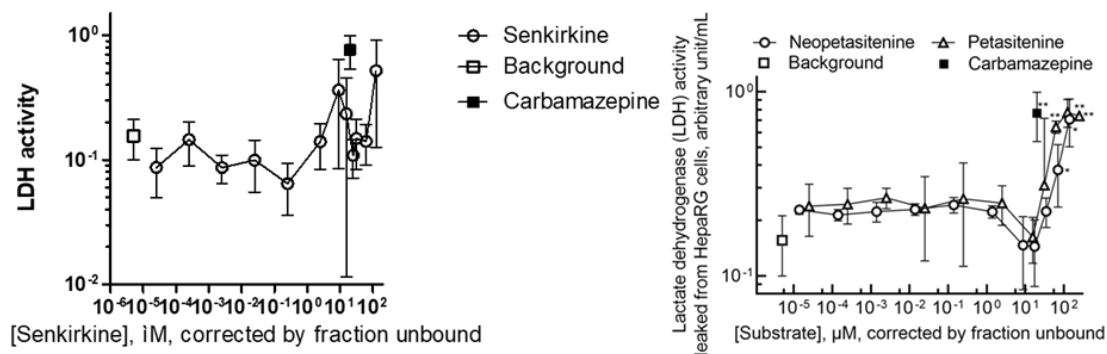


図 3-4 和食フキ成分ピロリジンアルカロイド化合物のヒト肝細胞障害性

2 研究全体の成果、考察及び結論

本研究では、食品関連物質のリスク評価を支援する *in silico* 手法の有用性を明示することを目的に、まず、既存の肝毒性予測モデルを評価し、関連データを用いて予測精度を改善する方法を検討した。次いでヒト肝毒性の懸念がある物質を対象に事例研究を実施した。事例研究では、PBPK モデル、代謝予測モデル、肝毒性予測モデルを活用して、ヒト肝毒性リスクを評価した。

食品健康影響評価書の情報を活用した肝毒性の予測精度向上のための研究では、既存の予測モデルは検出感度が低いことが判明した。この原因として、学習データセットに食品関連物質が十分に使用されていないこと、および体内における蓄積や代謝などの ADME が十分に考慮されていないことが考えられた。そこで、物性、体内動態、さらに作用機序を考慮に入れることで予測精度は向上し、多角的に肝毒性の懸念がある物質をスクリーニングできることが示された。この過程で提供される情報は、リスク評価すべき物質の優先順位付けにとどまらず、評価の現場において毒性データを解釈する際に、物性、体内動態データを関連付けることで、リスク評価の精緻化を可能にすると考えられる。

In silico モデルの予測性能は、予測する物質ごとに一律ではなく、局所的に変化することを考慮する必要がある。したがって、他のツールの出力結果や既知の関連情報、新しく抽出した知識などの一貫性を確認して予測結果の信頼性を評価し、それらの複数のエビデンスを付加的に統合するなどにより、使用する目的に応じて予測の不確実性を軽減することが求められる。

肝毒性予測の事例研究では、少数の *in vitro* 試験データを利用してヒトへの外挿を可能にする精緻なヒト PBPK モデル、ヒト肝障害スコアモデル、基質と酵素の三次元構造を用いた代謝予測モデル、機序と関連する *in silico/in vitro* のデータを生成・統合する New Approach Methodology (NAM) を適用した結果、ヒト外挿性の向上や、類似物質群の包括的な毒性予測の信頼性の向上が可能となることを示した。用いた *in silico* モデルや手法は、他の食品成分への適用事例を増やし、有効性を裏付けることができれば、ヒトにおける肝毒性の評価を支援する有効な手法となりうる。

化学物質のリスク評価を支援する NAM の行政的受け入れは未だ限られており、まだ検討段階にある。いくつかの事例研究に基づいた議論から、NAM は評価対象物質と毒性情報が既知の関連する物質との類似性の実証や、有害作用レベルと相関する定量的データを提供し、最終結論の不確実性を軽減するのに有効であるとされる。一方で、現段階ではすべてのケースに適切な単一のアプローチはなく、特定のケースごとに専門家による分析と評価がプロセスの重要なステップとなっていることが指摘されている^{*1}。更なる事例研究の積み重ねによって、NAM がリスク評価の信頼性や規制上のニーズを満たすことに貢献できるかを実証し、基本原則を整理していくことが求められている。

諸外国の規制当局やリスク評価機関は、新しい動物試験要求を最小限に抑え、ヒトに焦点を当てた NAM の活用を促進するビジョンやロードマップを近年相次いで公表している^{*2,3}。これらの短期・長期の戦略に基づき、様々な研究開発が促進されると予想させる。その受け入れを促進するためには、NAM の知識をリスク評価の関係者が共有することが必要になると考えられる。

*1: Rovida C. et al., (2021) NAM-supported read-across: From case studies to regulatory guidance in safety assessment. ALTEX, 38(1), 140-150, doi.org/10.14573/altex.2010062

*2: US EPA, New Approach Methods Work Plan (2021), https://www.epa.gov/system/files/documents/2021-11/nams-work-plan_11_15_21_508-tagged.pdf

*3 Escher S. et al., (2022) Development of a roadmap for action on new approach methodologies in risk assessment. EFSA Supporting publication. doi:10.2903/sp.efsa.2022.EN-7341

III 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

- ◎Kamiya, Y., Miura, T., Kato, A., Murayama, N., Shimizu, M. and Yamazaki, H. (2022): Plasma concentration profiles for hepatotoxic pyrrolizidine alkaloid senkirkine in humans extrapolated from rat data sets using a simplified physiologically based pharmacokinetic model. *Drug Metab Lett*, **15**, 64-69.
- ◎Miura, T., Uehara, S., Shimizu, M., Murayama, N., Suemizu, H. and Yamazaki, H. (2021): Roles of human cytochrome P450 1A2 in coumarin 3,4-epoxidation mediated by untreated hepatocytes and by those metabolically inactivated with furafylline in previously transplanted chimeric mice. *J Toxicol Sci*, **46**, 525-530.
- ◎Yanagi, M., Kamiya, Y., Murayama, N., Banju, K., Shimizu, M. and Yamazaki, H. (2021): Metabolic profiles for the pyrrolizidine alkaloid neopetasitenine and its metabolite petasitenine in humans extrapolated from rat *in vivo* and *in vitro* data sets using a simplified physiologically based pharmacokinetic model. *J Toxicol Sci*, **46**, 391-399.
- ◎Murayama, N. and Yamazaki, H. (2021): Metabolic activation and deactivation of dietary-derived coumarin mediated by cytochrome P450 enzymes in rat and human liver preparations. *J Toxicol Sci*, **46**, 371-378.
- ◎Miura, T., Kamiya, Y., Hina, S., Kobayashi, Y., Murayama, N., Shimizu, M. and Yamazaki, H. (2020): Metabolic profiles of coumarin in human plasma extrapolated from a rat data set with a simplified physiologically based pharmacokinetic model. *J Toxicol Sci*, **45**, 695-700.
- ◎Yamazoe, Y., Yamada, T., Nagata, K. (2020): Prediction and Characterization of CYP3A4-mediated Metabolisms of Azole Fungicides: an Application of the Fused-grid Template system. *Food Saf*, **8**, 34-51.
- ◎Yamazoe, Y., Yamada, T., Hirose, A and Murayama, N. (2021): Deciphering Key Interactions of Ligands with CYP3A4-Template* system. *Food Saf*, **9**, 10-21.
- ◎Yamada, T., Katsutani, N, Yamazaki, H, Murayama, N, Yamazoe, Y, Hirose, A. (2021): Combined safety assessment of food-derived coumarin with *in silico* approaches. Submitted to *Food Saf*.

2 本研究を基にした学会発表の実績

船木 理沙、田中 康浩、小島 聡史、加藤 真之、田口 智康、山崎 浩史: 既存情報を活用した食品安全性評価に向けた ILSI Japan の取り組み。 第三回 scChemRISC 研究会(京都(オンライン)) 2021 年 5 月

Hiroshi Yamazaki: Prediction of metabolic fates of food chemicals for risk assessment. 2021 International Workshop for Non-animals Approaches in Food Sector (Tokyo (online)) 2021 年 10 月

山田 隆志: 化学物質リスク評価に資する *in silico* アプローチの改良と国内における行政的受け入れ拡大への取り組み。 日本動物実験代替法学会第 34 回大会 (沖縄-Online Hybrid) 2021 年 11 月

山田 隆志、勝谷成男、丸山多恵子、村山典恵、山崎浩史、山添康、広瀬明彦: ピロリジジンアルカロイドの肝毒性評価への New Approach Method (NAM) の適用。 第 49 回日本毒性学会学術年会 (札幌) 2022 年 7 月

勝谷成男、山田 隆志、村山典恵、山崎浩史、Weida Tong、山添康、広瀬明彦: 食品中に含まれるクマリンの肝毒性リスク評価についての *in Silico* アプローチ。 第 49 回日本毒性学会学術年会 (札幌) 2022 年 7 月

3 特許権等の出願・申請等の状況

該当しない

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物
該当しない

5 その他（各種受賞、プレスリリース等）
該当しない

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
<p>(1) 食品関連化学物質を対象に、既存の毒性データと <i>in silico</i> ツールの情報を活用した肝毒性予測手法の評価と課題整理を行う。さらに、毒性学的文献知見を整理し、ヒト PBPK モデル、薬物誘発性肝障害データに基づくヒト肝毒性予測モデル等を活用してその結果を既知情報と共に統合し、ヒト肝毒性リスクを予測評価するケーススタディを作成する。</p>	5	<p>食品関連物質の既存の毒性データを <i>in silico</i> 肝毒性予測ツールに適用した結果に基づき、ツールの性能評価と予測性向上のための方策を提示することができた（年度内に論文投稿予定）。また、食品関連物質のヒト代謝情報は不足していることから、想定機序に基づくヒト代謝予測モデルへ食品関連物質を適用し、その有用性を示した*。クマリン肝毒性リスクの予測評価のケーススタディの作成は、既存の非臨床、臨床情報、FDA の DILI score モデル、個別課題 2,3 の成果を取りこむことによって完成し、投稿した論文は査読中である**。もうひとつのピロリジジナルカロイドの肝毒性予測の事例も完成させた（年度内に論文投稿予定）。以上より、当初の研究目的を達成することができた。</p> <p>*Yamazoe, Yamada, Nagata, Prediction and Characterization of CYP3A4-mediated Metabolisms of Azole Fungicides: an Application of the Fused-grid Template system, (Food Safety, 2020)</p> <p>**Yamazoe, Yamada, Hirose, Murayama, Deciphering Key Interactions of Ligands with CYP3A4-Template* system, (Food Safety, 2021)</p> <p>**Yamada, Katsutani, Yamazaki, Murayama, Yamazoe, Hirose, Re-evaluation of liver toxicity induced by coumarin in food: <i>in silico</i> approach to refining risk assessment. Submitted</p>
<p>(2) 多くの研究者が比較的容易に取り扱うことが可能である小腸、肝臓および全身循環の要素に着目した簡易化生理学的薬物動態モデルに入力する食品関連化学物質用の重要パラメータを設定する。</p>	5	<p>食品成分クマリンと和食フキ成分のラットおよびヒトの血中濃度を記述する生理学的薬物動態モデルを原著論文として誌上発表するなど、研究が順調に進捗した。</p> <p>Miura, Murayama, Yamazaki et al., Metabolic profiles of coumarin in human plasma extrapolated from a rat data set with a simplified physiologically based pharmacokinetic model (日本毒性学会誌 2020 年 11 月号掲載)</p> <p>Yanagi, Murayama, Yamazaki et al., Metabolic profiles for the pyrrolizidine alkaloid neopetasitenine and its metabolite peta-sitenine in humans extrapolated from rat <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> data sets using a simplified physiologically based pharmacokinetic model (日本毒性学会誌 2021 年 9 月号掲載)</p>
<p>(3) 化学物質の生体内吸収と代謝消失に関する上記パラメータ値の精緻化のための食品成分の <i>in vitro</i> 膜透過係数や肝代謝消失速度を実測する。</p>	5	<p>クマリンの複数の代謝経路のうち、毒性発現に關与する酸化的代謝を触媒する責任酵素の同定結果を原著論文として誌上発表するなど、研究が順調に進捗した。</p> <p>Metabolic activation and deactivation of dietary-derived coumarin mediated by cytochrome P450 enzymes in rat and human liver preparations (日本毒性学会誌 2021 年 8 月号掲載)</p>
<p>(4) 本研究における検証結果をもとに今回使用したツールと手法の利用可能性、ヒト外挿性に関して専門家の判断をサポートする精度の高い情報の提供の可能性についてまとめる。</p>	4	<p>既存の肝毒性予測モデルは、検出感度は低いことが判明したが、学習データセットに食品関連物質が十分に使用されていないことおよび体内における蓄積や代謝などの ADME が十分に考慮されていないことが原因と考えられ</p>

		<p>た。物性、体内動態、さらに作用機序を考慮に入れることで、多角的に肝毒性の懸念がある物質をスクリーニングできることが示された。これらが提供する情報は、評価の優先順位付けにとどまらず、評価の現場において、物性、体内動態と毒性を関連付けてデータを解釈し、有害性を評価するうえで有効であると考えられる。</p> <p>食品関連物質の体内動態、代謝については、情報が限られており、コストなどの観点から実試験の実施も容易でない。少数の <i>in vitro</i> 試験データを利用して構築した精緻なヒト PBPK モデル、ヒト CYP 代謝予測モデル、ヒト肝障害スコアモデルは、リスク評価における実験動物の試験データのヒトへの外挿に際して、専門家判断を支援する有用な情報を与えることができることが示された。他の食品成分への適用事例を増やしていくことができれば、将来的には <i>in silico</i> 手法がヒトにおける肝毒性の評価を支援する有効な手法となりうることを示唆された。</p>
--	--	---

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

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	事前評価の指摘による当初計画の変更にも柔軟に対応し、研究についてほぼ計画通りに進捗した。
(2) 研究成果の有用性	5	本研究で遂行する食品健康影響評価書の情報を活用した <i>in silico</i> 手法による肝毒性予測に資する知見の充実、食品健康影響評価における動物試験結果のヒトへの外挿の精緻化のための <i>in silico</i> 手法の有用性と今後の課題を整理することは、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。
<p>総合コメント</p> <p>本研究から得られた知見は、今後の食品安全委員会における様々な食品関連物質のリスク評価において、<i>in silico</i> 手法により得られた結果を、専門家判断をサポートする情報として活用を促進する際に有用になると考えられる。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

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