

# 化学物質のヒト安全性評価のための *in silico*アプローチの開発と活用

山田 隆志

国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部

発表内容は演者の見解に基づくものであり、国衛研の公式見解ではありません。

# *In silico* 手法が有効な場合

- 化学物質の数が膨大かつ短期間で評価する必要がある場合
- 試験のコストが高い場合
- 試験のサンプルが入手しづらい場合

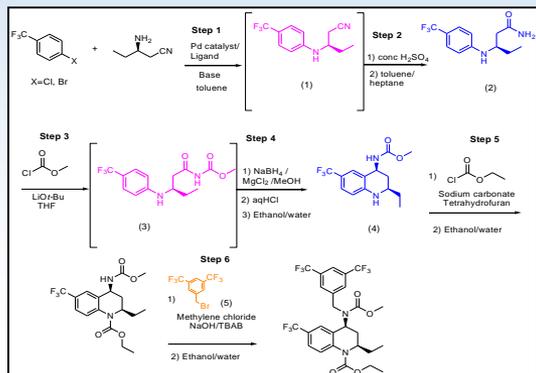


# 内容

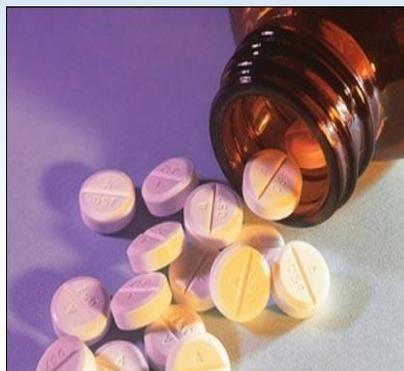
---

- Ames NIHS データベースと (Q)SARモデルの改良
- 医薬品の生態毒性データベースの開発とQSARモデルの評価
- 化学物質の反復投与毒性を対象としたリードアクロス法のケーススタディの提案

# 医薬品中に含まれる遺伝毒性不純物



合成過程の反応中間体・副産物



医薬品分解物

- 対象は低レベルでDNAに直接損傷を与える変異原物質(Mutagens)のみ。変異原性はエームス試験により評価。
- 毒性学的懸念の閾値(TTC)の適用
- エームス試験の代わりに構造活性相関(QSAR)を用いて変異原性を評価することができる。

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE

ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE

ASSESSMENT AND CONTROL OF DNA REACTIVE (MUTAGENIC) IMPURITIES IN PHARMACEUTICALS TO LIMIT POTENTIAL CARCINOGENIC RISK

M7

Current Step 4 version  
dated 23 June 2014

ICH M7

「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性(変異原性)不純物の評価及び管理」ガイドライン (2014. 06)

*This Guideline has been developed by the appropriate ICH Expert Working Group and has been subject to consultation by the regulatory parties, in accordance with the ICH Process. At Step 4 of the Process the final draft is recommended for adoption to the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA.*

# 構造活性相関 (Q)SAR) による変異原性の評価

- インシリコにより、細菌を用いる変異原性試験の結果を予測する。互いに相補的な2種類の(Q)SAR予測法を適用すべきである。一つは、**専門的経験に基づくルールベースの方法**、二つ目は**統計ベースの方法**とする。



# Ames QSARモデル の改良のための国 際共同プロジェクト の提案(QSAR 2014, ミラノ, 2014年6月)

データセット:  
安衛法エームス試験  
データ (1986-2015)  
約 12,000 物質

厚生労働省安衛部・化  
学物質対策室の協力

<http://www.nihs.go.jp/dgm/>

## To QSAR Builders

### -1<sup>st</sup> Circular for Ames (Q)SAR Collaborative Study-

June, 2014

Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan has collected and evaluated new Ames mutagenicity results. The National Institute of Health Sciences has the results of approximately 12,000 new chemicals. The Ames assays were conducted under GLP according to Industrial Safety and Health Act in Japan. We can now provide the Ames data to improve the reliability and applicability of your QSAR models for predicting Ames mutagenicity.

We first provide a list of 4,021 chemicals without the results of Ames mutagenicity assay (Excel and SD files). After calculating the Ames mutagenicity by your QSAR tools, you return the excel file with the results (positive, negative, and others). We evaluate the performance of your QSAR tool (sensitivity, specificity, and others). Then, we disclose the Ames results. You can integrate the Ames results into your QSAR model as learning sets. Next, we provide another 4,000 chemicals list. According to this procedure, we provide 12,000 chemical data totally, and you can integrate these Ames mutagenicity results into your QSAR model. We believe that this project strongly contributes to improve the QSAR models as well as to promote QSAR studies.

If you are interested in this project, please contact with me.

Masamitsu HONMA, Ph.D.  
Director, Division of Genetics & Mutagenesis  
National Institute of Health Sciences  
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku,  
Tokyo 158-8501, Japan  
E-mail: [honma@nihs.go.jp](mailto:honma@nihs.go.jp)

# Ames変異原性のクラス分類

## Class A : 強い陽性

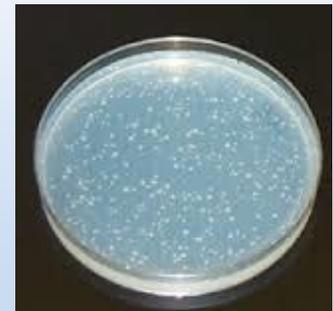
S9存在下または非存在下において、  
少なくとも1つの菌株で1,000 colonies/mg 以上

## Class B : 陽性

S9存在下または非存在下において、  
少なくとも1つの菌株で、コロニー数が陰性対象の2倍以上  
(class Aには該当しない)

## Class C : 陰性

class A にも Bにも該当しない

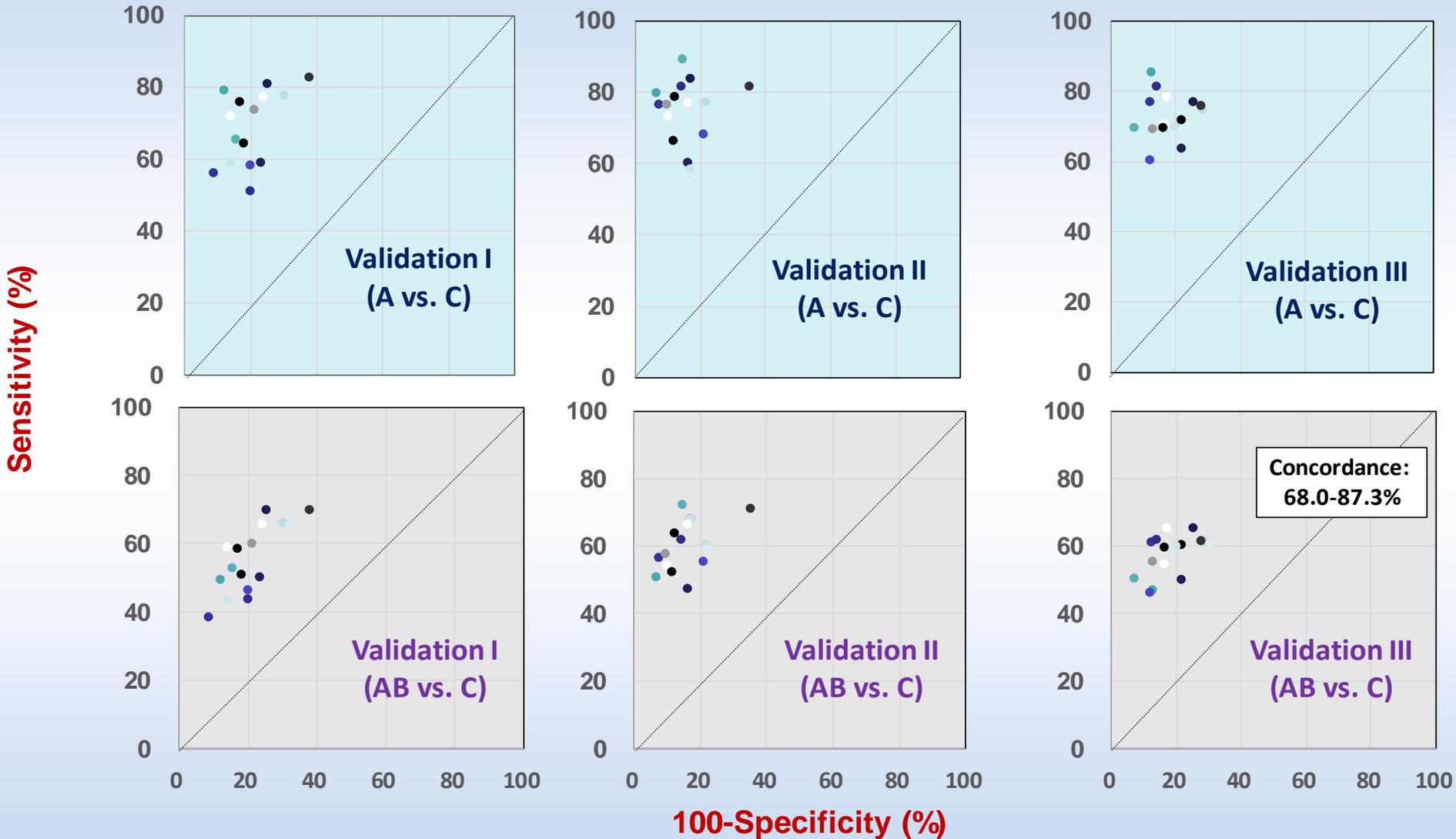


# Ames/QSAR Project (Phase I-III) における 対象物質(12140物質)のクラス分類

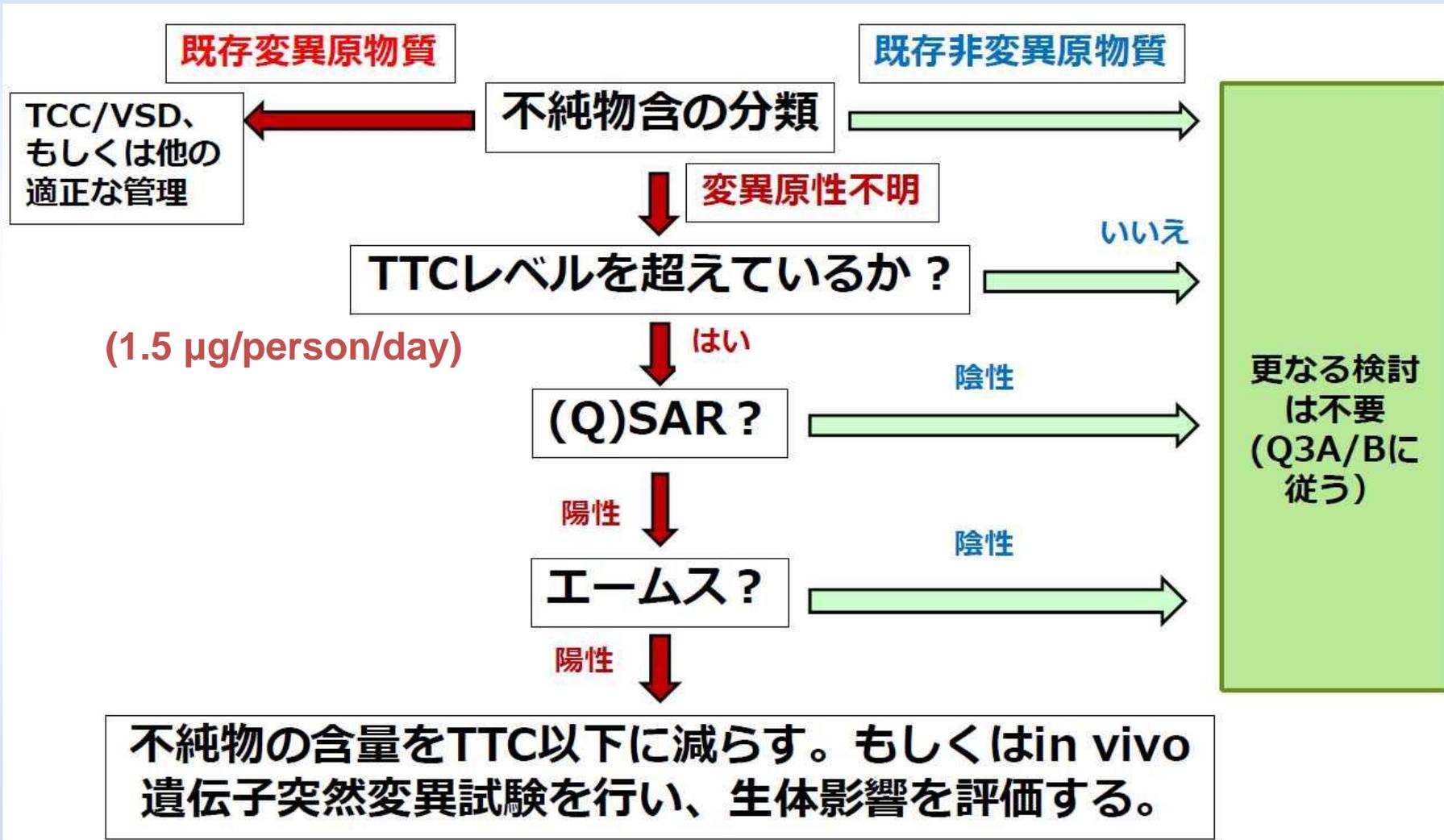
Category	Phase I (2014-2015)	Phase II (2015-2016)	Phase III (2016-2017)	Total (2014-2017)
<b>Class A</b>	<b>183 (4.7%)</b>	<b>253 (6.6%)</b>	<b>236 (5.4%)</b>	<b>672 (5.5%)</b>
<b>Class B</b>	<b>383 (9.8%)</b>	<b>309 (8.1%)</b>	<b>393(8.9%)</b>	<b>1,085 (8.9%)</b>
<b>Class C</b>	<b>3,336 (85.5%)</b>	<b>3,267 (85.3%)</b>	<b>3,780 (85.7%)</b>	<b>10,383 (85.6%)</b>
<b>Total</b>	<b>3,902</b>	<b>3,829</b>	<b>4,409</b>	<b>12,140</b>



# 検証したQSARツールのROCグラフ



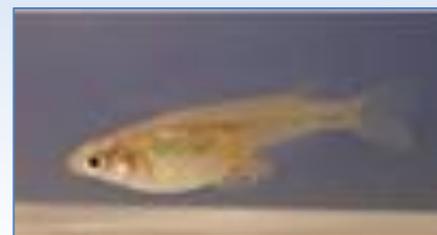
# DNA反応性不純物の安全性確認のためのフローチャート



# 規制安全性評価におけるAmes (Q)SARの使用

- ICH M7ガイドラインに基づく医薬品中のDNA反応性不純物の評価
- 情報の一部として、工業用化学物質、食品器具・容器包装材料などの評価

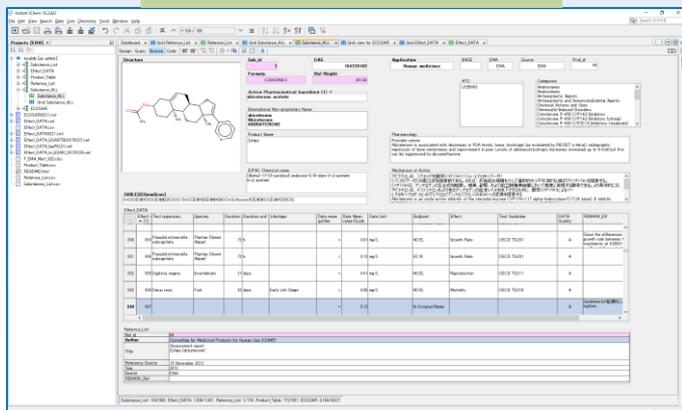
# 環境中医薬品の生態生物への影響



- 欧米では、新規医薬品の承認申請時に環境リスク評価書を提出することが要求されている。
- 日本では、2016年に厚生労働省が自主的ガイダンス「新医薬品開発における環境影響評価に関するガイダンス」を発行した。
- 環境影響評価をサポートするシステムは新規医薬品のみならず、既存医薬品についても重要

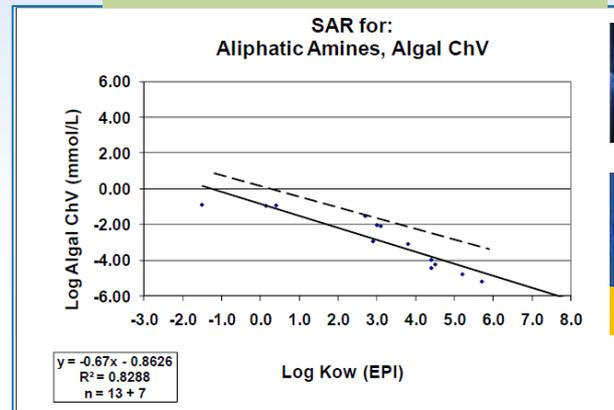
# 構造活性相関(QSAR)を用いた 医薬品の環境影響評価法の開発 (2016-2018)

## 生態毒性DB



新規医薬品  
評価書

## QSARモデルの評価



ECOSAR

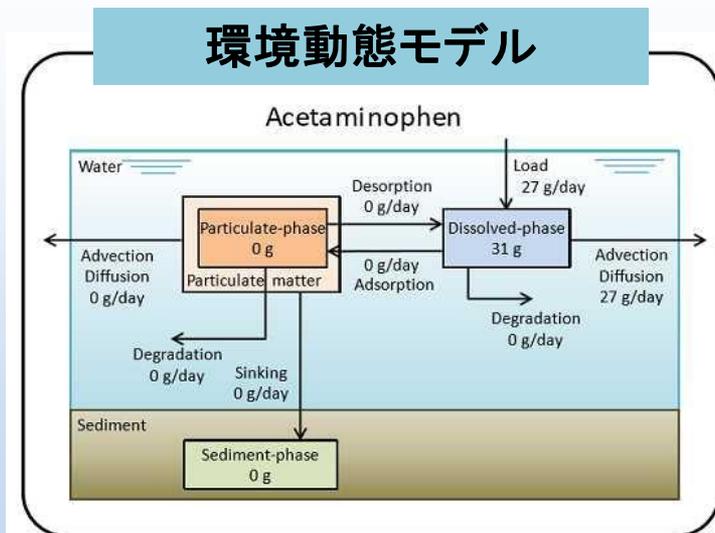
## 環境モニタリング



LC/MS/MS



## 環境動態モデル



# 医薬品の生態毒性データの収集

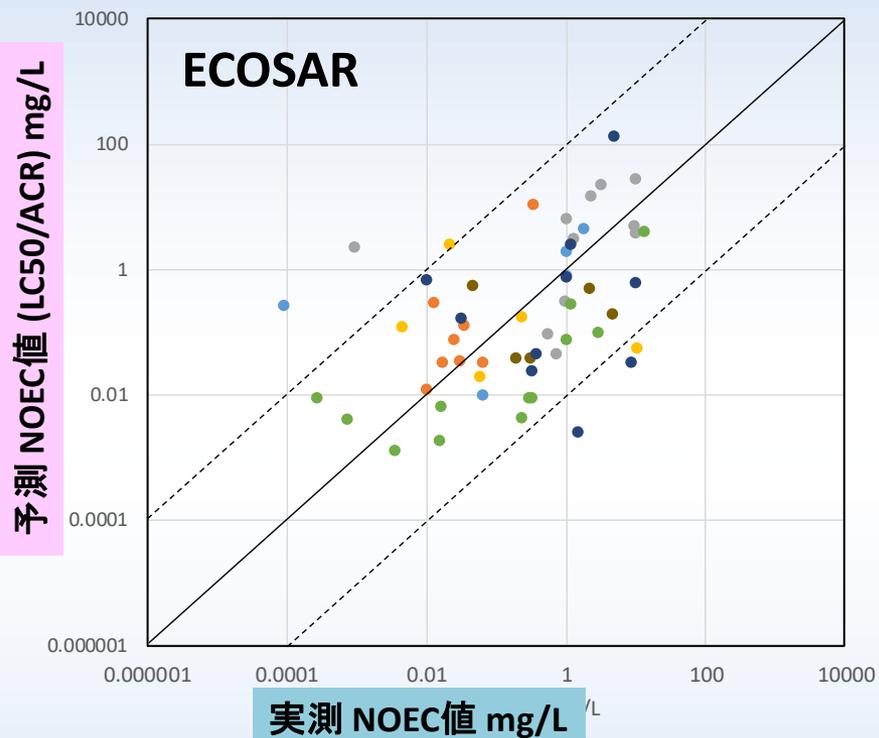
## 主要な情報源

- 欧州医薬品評価報告書 (欧州化学品庁)
- 認可医薬品評価情報 (米国食品医薬品局)
- WikiPharma データベース (スウェーデン戦略的環境研究財団)
- 国内外の製薬企業公開情報

## 生態毒性試験結果収集数 (OECD テストガイドライン準拠試験)

	急性(EC50/LC50)	慢性(NOEC)
藻類	193	201
ミジンコ類	227	189
魚類	144	141

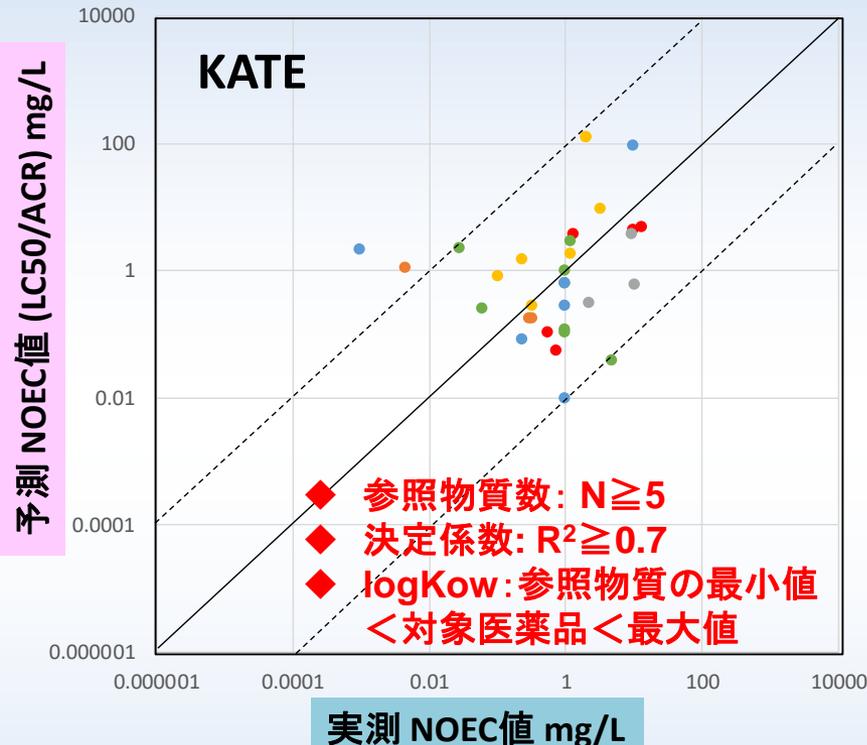
# 予測NOEC値と実測NOEC値 (魚類)



- Pyrazoles/Pyrrole (12)    ● Amide (11)    ● Aliphatic amine (8)
- Acrylamide (5)    ● Neutral organics (5)    ● Esters (5)
- Others (10)

**適用性**     $0.1 < \text{予}/\text{実} < 10$      $0.01 < \text{予}/\text{実} < 100$

70% (56/86)    61% (34/56)    89% (50/56)



- ◆ 参照物質数:  $N \geq 5$
- ◆ 決定係数:  $R^2 \geq 0.7$
- ◆  $\log Kow$ : 参照物質の最小値 < 対象医薬品 < 最大値

- Secondary or tertiary amine (8)    ● Unclassified (7)
- Amide or imide (5)    ● Primary amines aliphatic / aromatic (3)
- Amines aromatic or phenol 5 (3)    ● Others (10)

**適用性**     $0.1 < \text{予}/\text{実} < 10$      $0.01 < \text{予}/\text{実} < 100$

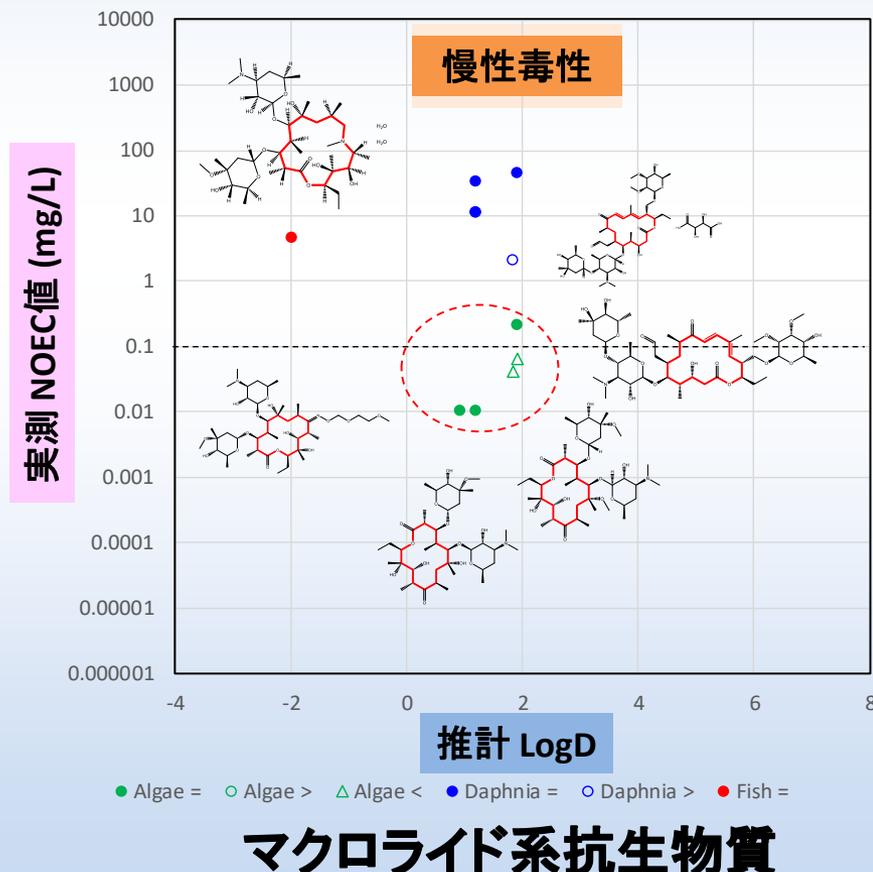
38% (33/86)    73% (24/33)    91% (30/33)

# 生態毒性カテゴリー

**カテゴリー**：構造的な類似性から物理化学的及び(生態)毒性学的性質が類似又は規則的なパターンに従う可能性が高い化学物質のグループ

カテゴリー	作用機構	脆弱な種
マクロライド系	タンパク質合成阻害	藻類
スルホンアミド系	葉酸合成阻害	藻類
非ステロイド系 抗炎症薬	シクロオキシゲナーゼ阻害	ミジンコ類, 魚類
(抗悪性腫瘍薬)	チロシンキナーゼ阻害	魚類

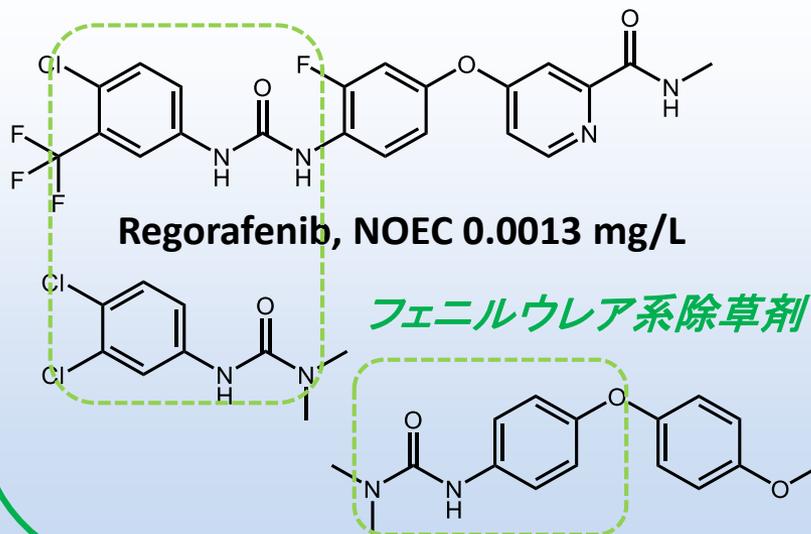
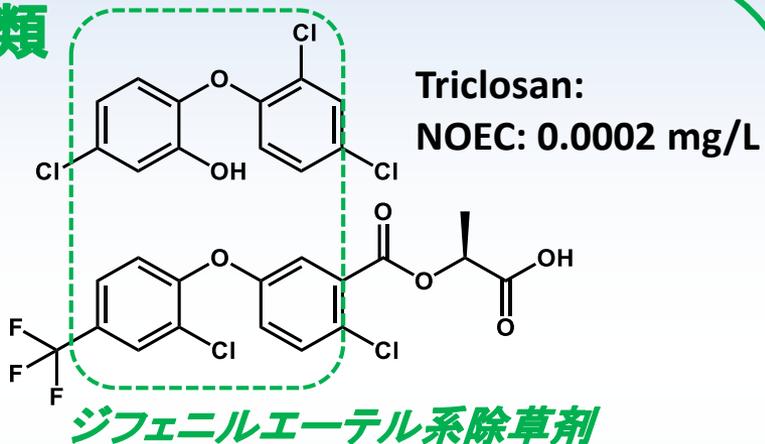
カテゴリーの物質数:  
5若しくはそれ以上



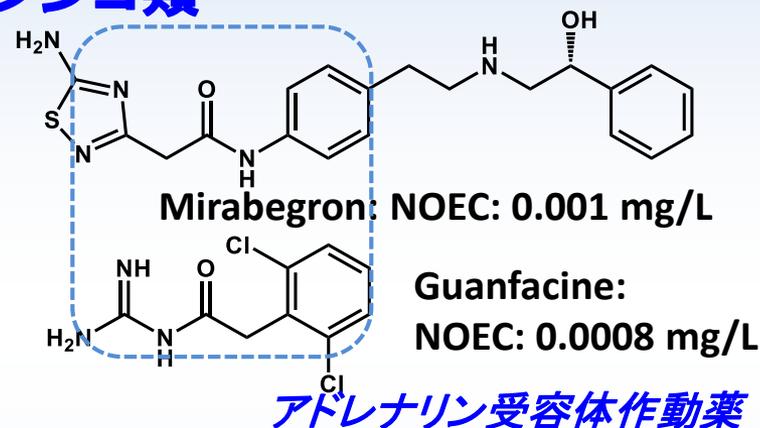
# 新しい構造アラートの探索

NOEC値が5パーセント以下またはQSARモデルへの適用が困難な医薬品

## 藻類

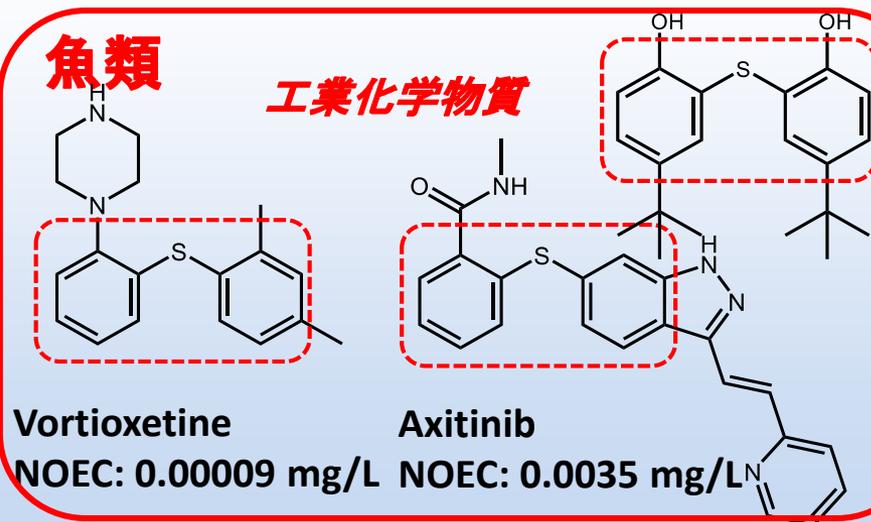


## ミジコ類



## 魚類

### 工業化学物質



## 生態毒性データベース

CAS, Smiles, Endpoint, Test organisms, Duration, Data mean, Data unit, Effects, Test guideline, ...

2019年5月公開

## カテゴリー

- ◆ Common structure
- ◆ Structural boundary
- ◆ Phys-chem properties
- ◆ Possible MoA
- ◆ Endpoint
- ◆ ...



インポート

### Database

- Aquatic ECETOC
- Aquatic Japan MoE
- ECHA CHEM

Custom

- API EcoTox AMED

### Profiler

- Aquatic (Verharr)
- Aquatic (OASIS)

Custom

- API Ecotox category

## フリーソフトウェア

Grouping chemicals into category  
Support read-across/trend analysis for data gap filling

Documents

- Document 1
  - Search chemical
  - Organic functional groups (US EPA)
  - Subcategorized: Structure similarity
- Document 2
  - Search chemical
  - Organic functional groups (US EPA)
  - Subcategorized: Structure similarity

Organic functional groups (US EPA)

Options

- Select All
- Unselect All
- Invert

Protein binding alerts for Chromosomal ab

Protein binding alerts for skin sensitization

Protein Binding Potency h-CLAT

Respiratory sensitization

Retinoic Acid Receptor Binding

rTER Expert System - USEPA

Skin Irritation/corrosion Exclusion rules by

Skin Irritation/corrosion Inclusion rules by

Empiric

Chemical elements

Acute aquatic toxicity classification by Verhaar

Acute aquatic toxicity MOA by OASIS

Aquatic toxicity classification by ECOSAR

Empiric

- Organic functional groups
- Organic functional groups (nested)
- Organic functional groups (US EPA)
- Organic functional groups, Norbert Haider [...]
- Structure similarity

Reactive unspecified	Reactive unspecified	Reactive unspecified	Reactive unspecified	Reactive unspecified
Amides	Amides	Amides	Aliphatic Amines	Amides
Aryl	Aryl	Aryl	Aliphatic amine, prin	Alkane, branched wi
Aryl	Aryl	Aliphatic Carbon [C	Aliphatic amine, prin	Alkane, branched wi
Aromatic Carbon [C	Aliphatic Carbon [C	Aliphatic Carbon [C	Aliphatic Carbon [C	Aliphatic Carbon [C
Aromatic compound	Aromatic compound	Aromatic compound	Amine	Aromatic compound
[90%,100%]	[60%,70%]	[60%,70%]	[60%,70%]	[60%,70%]

ECOSAR

リンク

# 日本の河川で検出された医薬品の生態毒性試験データの可用性

NAME	慢性			急性			
	Algae	Daphnia	Fish	Algae	Daphnia	Fish	
Diethyltoluamide							
Crotamiton							
Sulpiride							
diphenhydramine							
Acetaminophen							X
Clarithromycin							●
Sucralose							
Amantadine							
Irbesartan							△
Sulfamethoxazole							●
Carbamazepine							
Memantine							
Trimethoprim							●
Diltiazem							△
Epinastine							
Roxithromycin							●
lincomycin hydrochloride							●
losartan potassium							△
bezafibrate							
Valsartan							△
azithromycin dihydrate							●
Doxycycline							●
diphenylhydantoin(Phenytoin)							
Lorazepam							
Olmesartan							△
Piperacillin sodium							●
rosuvastatin calcium							
Ketoprofen							X
Diclofenac							X
Levofloxacin							●
Erythromycin							●
Tylosin							●
Ibuprofen							X
Terbinafine hydrochloride							
Mefenamic acid							X
Cefmetazole sodium							●
Sulfamonomethoxine							●
amlodipine besylate							△
Candesartan							△
Cefditoren pivoxil							●
Clofibric acid							
Sulbactam sodium							●
Olmesartan medoxomil							△
Cefcapene pivoxil hydrochloride							●
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	

## 抗生物質 ●

16

タンパク質合成阻害

7

細胞壁合成阻害

5

葉酸合成阻害

3

DNA合成阻害

1

## 降圧剤 △

8

## 鎮痛剤 X

5

藻類, ミジンコ類, 魚類の慢性  
毒性試験結果がある医薬品数

5

藻類, ミジンコ類, 魚類の慢性  
毒性若しくは急性毒性試験結果がある医薬品数

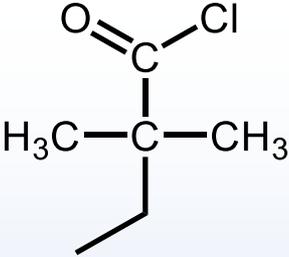
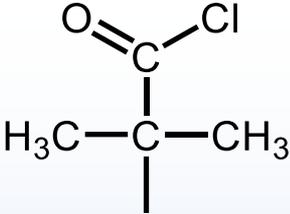
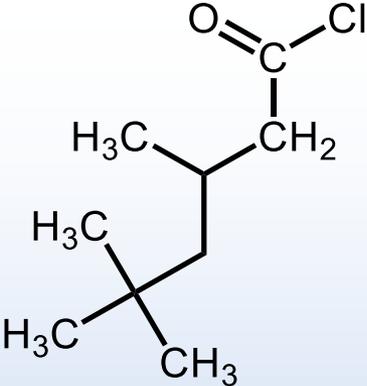
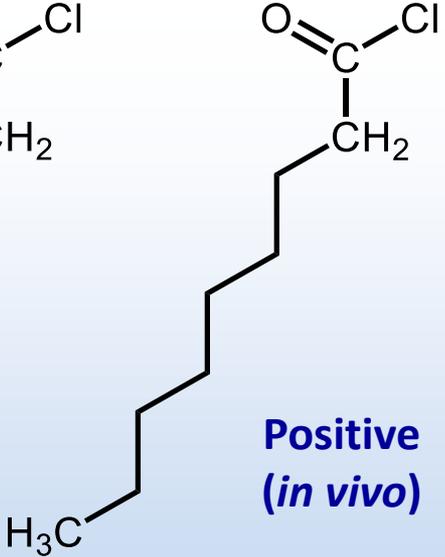
5

毒性試験結果が全くない医薬品数

23

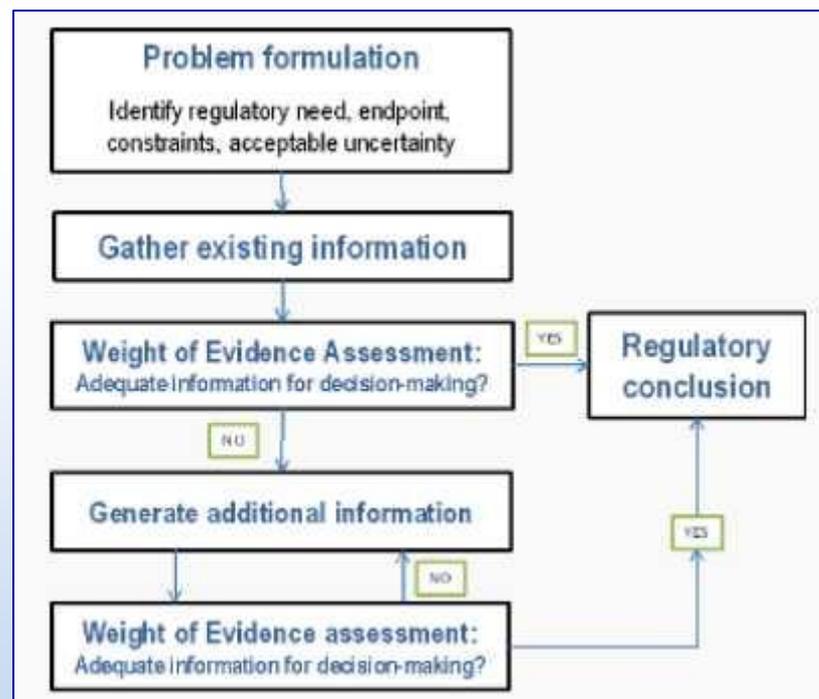
# リードアクロス

リードアクロスは対象物質(**target substance**)のエンドポイント情報を試験済みの類似物質(**source substance**)の同じエンドポイントの試験データより類推する方法

	Target substance		Source substances	
Structure				
Endpoint (Skin Sensitization)	<b>Positive</b> (read-across)	<b>Positive</b> (in vivo)	<b>Positive</b> (in vivo)	<b>Positive</b> (in vivo)

# OECD IATA Case Studies Project (2015-)

- IATA (Integrated Approaches to Testing and Assessment: 試験と評価のための統合的アプローチ)
- 対象物質の*in vivo*試験データが利用できないとき、類似物質の*in vivo*データ並びに*in silico*, *in chemico*, *in vitro* アプローチ等を組み合わせて評価
- IATAの行政利用の経験を共有するフォーラム
- 国際的ガイダンスの作成
- プロジェクトチーム: Australia, Canada, Denmark, Japan, Netherlands, Sweden, United States, EU (EC), EU (JRC), EU (ECHA), BIAC and ICAPO



# ケーススタディ (2015-2018)

- 全部で15のケーススタディが提案された
- 臓器毒性/反復投与毒性 : 8/15
- 日本が提案したケーススタディ
  1. アリルエステルの肝毒性[CS-1, 2015]
  2. フェノールベンゾトリアゾールの反復投与毒性 [CS-2, 2016]
  3. エチレングリコールメチルエステル(EGME)関連物質の生殖毒性 [CS-3, 2018]

ENVIRONMENT, HEALTH  
& SAFETY NEWS



October, 2016

Just released!

## First Four Case Studies from the Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) Case Studies Project

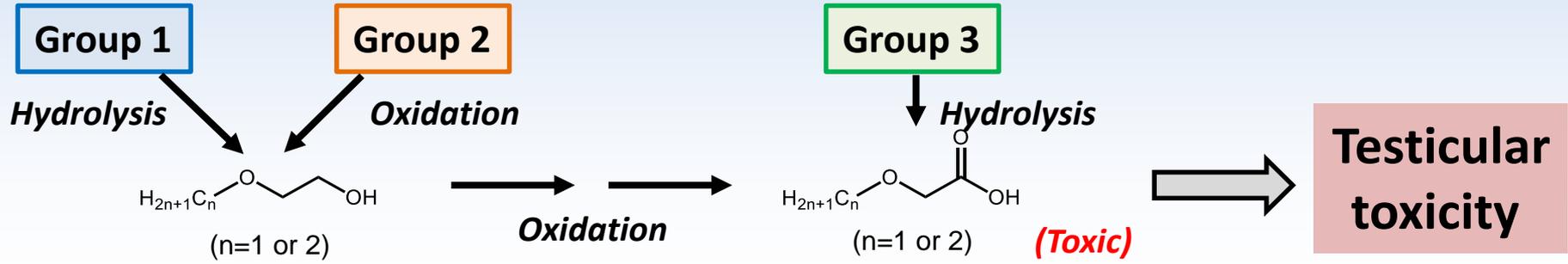
The first four case studies from the IATA Case Studies Project were published along with a reporting template and considerations document highlighting the learnings from the first review cycle.

The IATA Case Studies Project was launched in 2015 to increase experience with the use of IATA by developing case studies, which constitute examples of predictions that are fit for regulatory use.

# Case Study-3 (2018)

## エチレングリコールメチルエステル(EGME)関連物質の生殖毒性

### 類似性の仮説

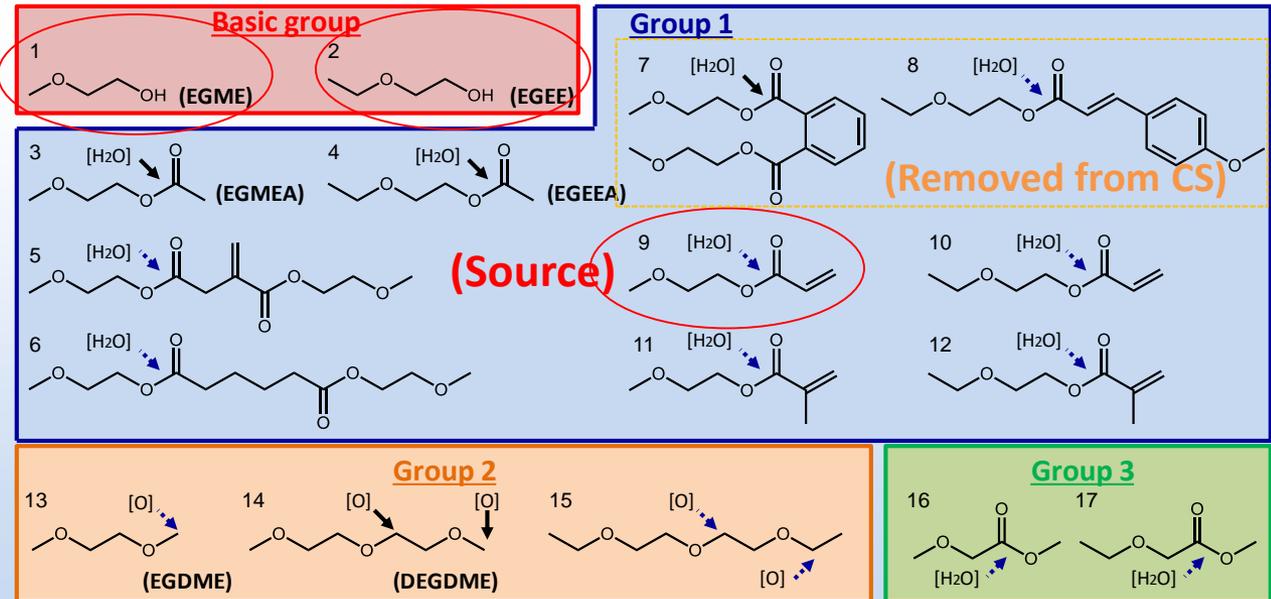


### データがないまたは少ない物質のリードアクロス

Japanese MITI inventory (16,000 substances)



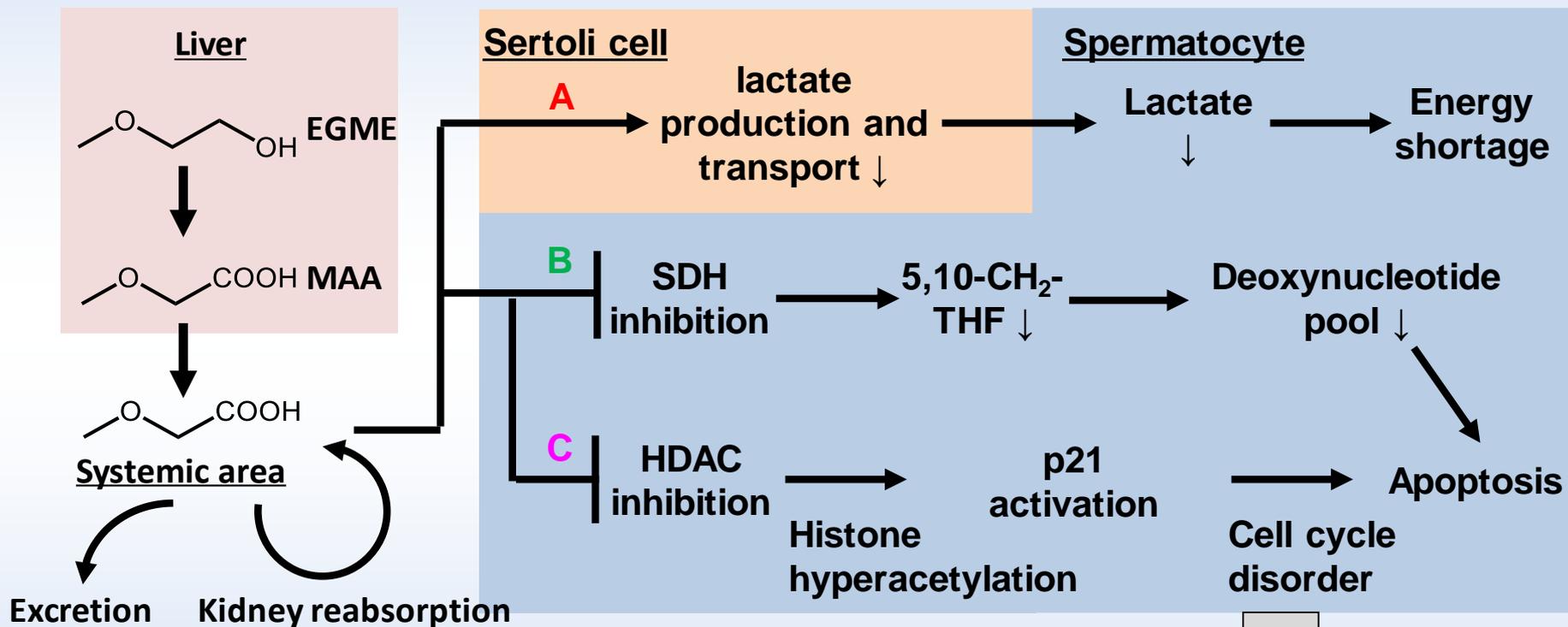
Rat Cellular Metabolism Simulator in HESS platform



# 想定される毒性メカニズム

## Possible MoA/AOP

Yamazoe et al., 2015



- この場合、カテゴリーの形成には重要ではない
- しかし、この物質の重篤な精巣毒性を理解するために役立つ
- **Pathway C**: OECD AOPプログラムの外部レビュー

精巣  
精母細胞の枯渇  
萎縮  
重量低下

# レビューにおける指摘

- 類似性の仮説、選択した類似物質は適切か？ (CS-1, CS-2)
- (試験済みの類似物質との)構造の違いにより、他の臓器の毒性を引き起こさないか？ (CS-1, CS-2)
- トキシコゲノミクス: 選抜したマーカー遺伝子の転写誘導と*in vivo*の毒性の関連性は？ (CS-2)
- 試験済み物質と未試験物質を橋渡しする機序的情報 (CS-2)
- バイオアベイラビリティに関する情報 (CS-2)
- 類推に用いる試験データの信頼性 (CS-2, CS-3)
- 類推の妥当性。毒性を低く見積もっていないか？ (CS-2)
- ヒトへの外挿性に関する追加情報 (CS-1, CS-3)

# プロジェクト全体から得られた リードアクロスの議論

- リードアクロスの結果の受入れ性は、基本的に次の側面によって推進される。
  - 透明性・再現性
    - ✓ 予測がどのように導出されたか・再現できるか
  - 類似性の仮説に関連する信頼性・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
  - Weight of Evidence (WoE)
    - ✓ *In vitro*および代替アプローチ等のサポートデータ
    - ✓ Many to oneの予測 > one to oneの予測

# リードアクロスのための*in silico*ツールの使用

**HESS platform for repeated dose toxicity  
OECD QSAR Toolbox**

■ 関連物質のデータソースとして用いる。

➤ *In vivo, in vitro* 代謝データ

➤ *In vivo* 毒性データ

■ カテゴリーやアナログを見つけるために用いる。

■ 意思決定ではなく意思決定支援のために用いる。

現在のリードアクロスは、類似性の仮説を立て、カテゴリを正当化するための情報を収集するのに多くの時間を要する。

# ヒト安全性評価の*in silico*アプローチを改良するための データベースの構築・更新



## ■ 反復投与毒性

### ✓ 規制の枠組みを超えたデータベース

- 化審法化学物質、食品器具・容器包装物質、農薬、医薬品、医薬品添加剤...

### ✓ 機序に基づいた毒性カテゴリーの構築

## ■ 生殖発生毒性

### ✓ 化審法既存点検プログラム試験データ (OECD TG421/422)

- JECDB (国衛研) で公開 → OECD QSAR Toolbox

### ✓ 強い毒性物質、想定される生体分子ターゲットの探索

## ■ 生理学的薬物速度論(PBPK)モデル

### ✓ パラメータに関するデータ集積・データベース化

### ✓ ケミカルクラスごとの特徴解析

# 海外におけるリードアクロス手法の 開発・課題の抽出・今後へ向けた検討事例

## ■ ICCVAM Read-across WG (USA, 2017-)



- リードアクロスの経験・ニーズのカタログ化
- データソース、ツール、ガイダンスのカタログ化
- 専門家主導から体系的・客観的アプローチへの移行の検討

## ■ EU TOXRISK/CAAT expert group (EU, 2018-)

- NAM (New Approach Methodology)の活用
- リードアクロス活用促進のロードマップ



# まとめ

- *In silico*アプローチは、研究レベルからリスク評価への実装レベルに至るまで、開発のさまざまな段階にある。
- 国際協力を進めることは、作業の重複を避け革新的なアイデアを膨らませ、技術的能力を強化するために多くの価値がある。
- *In silico*アプローチの十分な信頼性を示していく必要がある。そのためにはいくつかのケーススタディを実施し、これらの手法について学ぶ機会を提供することが必要である。
- 加えて、ベネフィットと不確実性および限界について、深く議論をするべきである。