

平成15年度

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究

主任研究者 林 真

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業  
化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究  
平成 15 年度 総括研究報告書  
主任研究者 林 真  
平成 16 年 (2004 年) 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究 \_\_\_\_\_ 1  
林 真

II. 分担研究報告書

1. 既存構造活性相関モデルの比較に関する研究 \_\_\_\_\_ 9  
林 真、鎌田 栄一、広瀬 明彦

2. 反復投与毒性試験を指標にした3次元構造活性相関モデルに関する研究 \_\_\_\_\_ 27  
青木 康展

3. 毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究 \_\_\_\_\_ 36  
広野 修一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 39

IV. 研究成果の刊行物・別冊 \_\_\_\_\_ 41

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究

主任研究者 林 真 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長  
分担研究者 鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官  
分担研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官  
分担研究者 広野 修一 北里大学 薬学部 教授  
分担研究者 青木 康展 独立行政法人国立環境研究所 化学物質環境リスク研究センター 室長  
協力研究者 高橋 美加 国立医薬品食品衛生研究所 リサーチレジデント  
協力研究者 本島 清人 明治薬科大学 教授  
協力研究者 小松 英司 独立行政法人国立環境研究所 NIES フェロー

研究要旨： 現在、化学物質は、日本国内で年間 10 万種、5 億トンの生産がなされていると言われているものの、その毒性学的性状が明らかになっているものは数%にも満たない状況である。これら個々の化学物質の特性を効率的に把握かつ評価し、必要に応じた管理を進めることは、国民の健康維持増進に必要不可欠となっている。しかし、変異原性をはじめ毒性学的性状が明らかになっている化学物質は少ない。更に、全ての化学物質について一律の試験を行い、データを収集することは経済的にも動物愛護の観点からも適切なことではない。そこで、既存の知見をもとに毒性学的影響を高精度で予測する方法を開発することは、化学物質の安全性評価の向上に大きく貢献するものである。

本研究費では、化学物質のリスク評価を実施する上で必要とされる毒性を予測するにあたり、評価上必要な試験項目についての定量的構造活性相関に関して、国際的に使用されているいくつかの構造活性相関コンピュータープログラムの検証を行い、予測精度を上げるためのアルゴリズムの改良を行っている。また、標的分子との結合能を指標にした 3D-QSAR の方法開発、およびその効率的な促進に寄与するデータベースに関する研究を行うとともに、毒性予測における CoMFA モデルの適用性について検討する。さらに、国際間のデータの相互受入を促進と海外の専門家との連携を目標に、上記構造活性相関コンピュータープログラム制作会社の研究者と共同開発を行っている。

本年度は、AMES 試験に対して、3 つの SAR モデル (DEREK, MULTICASE, AdomeWorks) を適用し解析した結果、3 つのモデルを組み合わせることによって、偽陰性を 10%以下に抑えることが示された。また、DEREK および AdomeWorks のさらなる予測精度向上のためのプログラムの改良を行っている。高フッ素化合物の PPAR 結合活性解析においては、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の系、細胞系、個体レベル、いずれも定量的解析をする見通しが立つとともに、毒性既知のフッ素化合物の自己組織化マップクラスタリングと重相関解析において、28 日間反復投与試験の NOEL と良好な相関をもつ 2 つのクラスターを得ることができた。

毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究においては、PPAR $\alpha$  活性の既知の 12 個の化合物と PPAR $\alpha$  の LBD の複合体モデルから、統計的に有意な三次元定量的構造活性相関モデル (CoMFA モデル) を得ることができた。

## A. 研究目的

現在、化学物質は、日本国内で年間 10 万種、5 億トンの生産がなされていると言われているものの、その毒性学的性状が明らかになっているものは数%にも満たない状況である。化学物質はそれぞれ各種の用途で広範に用いられるとともに、国民の日常生活にも入り込んでいるものであることから、個々の化学物質の特性を効率的に把握かつ評価し、必要に応じた管理を進めることは、国民の健康維持増進に必要不可欠となっている。

しかし、変異原性をはじめ毒性学的性状が明らかになっている化学物質は少ない。更に、個々の化学物質について、動物を用いて試験を行いデータを収集することは、試験実施機関での処理能力の観点から短期間に実施することは不可能であり、また全ての化学物質について一律の試験を行いデータを収集することは経済的にも動物愛護の観点からも適切なことではない。既に存在する化学物質の知見をもとに毒性学的影響を高精度で予測する方法が開発され、その予測に基づき評価作業を進めることは、より安全性の向上に資するのみならず、リスク評価段階におけるデータギャップを埋める方法にも利用が可能であり、その結果、より安全性評価の向上に資することが可能である。

本研究費では、化学物質のリスク評価を実施する上で必要とされる毒性を予測するにあたり、評価に必要な不可欠である試験項目について、定量的構造活性相関に関する研究や定量的構造活性相関に関する国際比較を実施し、まず、国際的に使用されているいくつかの構造活性相関コンピュータープログラムの検証を行い問題点の洗い出しを行うと共に、予測精度を上げるためのアルゴリズムの改良を行っている。また、標的分子との結合能を指標にした

3D-QSARの方法開発、これらの研究を効率的に促進させるために求められるデータベースに関する研究を行い、CoMFAモデルの適用性について検討した。さらに、国際間のデータの相互受入を促進させるため、海外の専門家とも連携をとるため、上記構造活性相関コンピュータープログラム制作会社の研究者と共同開発を行っている。

## B. 研究方法

### ●既存の構造活性相関モデルの比較に関する研究

#### 1. 分子量と AMES 試験結果との関係

化学物質の生体内へ吸収されるためにはまず細胞膜を通過しなければならない。

AMES 試験においても化学物質が細胞膜を通過することは必要条件であるので、改正前の化審法で届けられた新規化学物質のうち AMES 試験陽性結果を示した 194 物質について、その分子量分布について検討した。

#### 2. 既存の SAR モデルの比較

##### 2.1) 使用した SAR モデル

OECD の QSAR 専門家会議 (36th Joint Meeting, 4th-6th February 2004) において検討対象としている SAR モデル (DEREK, MULTICASE) と、日本で開発しているモデル (AdomeWorks) の計 3 モデルについて検証を行った。

DEREK は、LHASA UK 社によって開発されたモデルで、世界の 80 数機関で使用されており、独自のルールベースを作成することでその信頼性を向上することが出来る。

MULTICASE は米国 Multicase 社が開発したモデルで、実験済みのデータからコンピュータが統計的・化学的に最適化された高度なデータベースを作成し、そこから活性値を判断するシステムであり、

米国 FDA もこのモデルを使用している。

AdomeWorks は富士通九州が開発しているモデルで、多変量解析／パターン認識による毒性予測モデルである。

モデルの検証には、厚生労働省の既存化学物質安全性点検事業で実施された 221 物質の AMES 試験結果を用いた。

各々の化合物の構造式は、Chemdraw で作図後 MOL ファイルに変換し、3つのモデルに投入した。

### ● 反復投与毒性試験を指標にした 3次元構造活性相関モデルに関する研究

#### ①高フッ素化合物の PPAR 結合活性解析

生体高分子と化学物質の結合能に関する文献調査試験化合物の PPAR のリガンド活性と脂質代謝攪乱による毒性との結びつきを検討する解析方法として、以下の 4 方法を選んだ。

##### 1. マウス個体を用いた解析

試験化合物を 0.05 % (wt/wt) の混餌で与え、PPAR の標的遺伝子の発現変動を、肝臓から抽出精製した全 RNA を用いて、ノーザンプロット法で解析した。

##### 2. 培養細胞を用いた解析

試験化合物が生体個体レベルに及ぼす影響を、培養細胞レベルで再現するため、本年度は、ヒトとラット肝細胞と、マウスの脂肪細胞と骨格筋細胞の PPAR リガンド応答能について、リガンド処理後に全 RNA を抽出し、PPAR 標的遺伝子の発現変動をノーザンプロットによって解析した。

##### 3. レポーター遺伝子を用いた PPAR transactivation 解析

レポータープラスミドには、ホタルルシフェラーゼをレポーター遺伝子とし、転写調節シス因子として GAL4 結合部位をもつプラスミドを用いた。PPAR としては、ヒトの  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 種類のサブタイプのリガンド結合部位(LBD)を、GAL4 タンパク質に融合させたキメラ受容体を用意した。本年度はマウスについては full length の発現ベクターで解析を開始した。これら、レポータープラスミドとキメラ PPAR 発現プラスミドを CV1 細胞に共導入し、

レポーター活性を Dual luciferase 法で測定した。

#### 4. PPAR リガンド結合部位への結合活性解析

試験化合物の PPAR への結合を直接的に解析するために、ヒト PPAR 各タイプのリガンド結合部位を、GST 融合タンパク質として大腸菌で発現させたリコンビナント PPAR を用意することとした。試験化合物の結合は、放射能標識した代表的な PPAR リガンドとの競合実験を予定している。

#### ②毒性既知のフッ素化合物のクラスタリングと重相関解析による定量的構造活性相関 (QSAR)

フッ素化合物の毒性発現に関する構造情報を抽出するため、28 日間反復投与試験の結果の情報が得られる化合物について、化合物の特徴を自己組織化マップによってクラスター分類した。さらに、各々のクラスターについて、重相関解析による定量的構造活性相関の解析を行った。

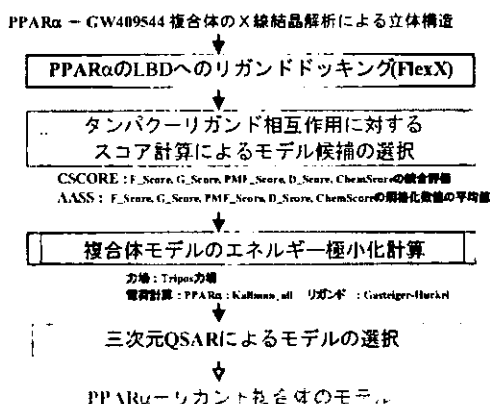
### ●毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究

新規化学物質の PPAR $\alpha$  活性を予測するためにまず、ヒト PPAR $\alpha$  のリガンド結合ドメイン(LBD) の立体構造情報と PPAR $\alpha$  結合活性が既知のリガンドを使って複合体モデルを作成し、三次元定量的構造活性相関解析を行うことを目的とし、PPAR $\alpha$  の LBD の X 線結晶解析実験による立体構造 (1K7L) を基に、SYBYL FlexX を用いて、PPAR $\alpha$  活性が既知の 12 個の化合物 (次表参照) と PPAR $\alpha$  の LBD との複合体モデルを作成した。

得られたモデルをスコア関数によって評価した後、選択したモデルを使って三次元定量的構造活性相関解析 (Comparative Molecular Field Analysis : CoMFA) を行った。

解析の流れを次図に示す。

## 解析の流れ



## C. 研究結果

### ●既存の構造活性相関モデルの比較に関する研究

#### 1. 分子量と AMES 試験結果との関係

AMES 試験陽性化合物の分子量累積度数からは分子量 1000 までの化合物は全体の 87.1%で、分子量 3000 まで考慮すると 96.4%が分布していた。分子量 3000 以上であれば概ね「陰性」と考えることが出来るが、7 化合物が陽性を示した。これらの構造式中に末端にエポキサイドをもった化合物が 7 物質中 4 物質あったことから、分子量 3000 であっても末端にエポキサイドを有している場合には「陽性」と判断した方が良くと考えられた。

#### 2. 既存の SAR モデルの比較

3 つの SAR モデルに構造式を INPUT したところ、MULTICASE では、試験結果が陰性、計算結果は陽性を示した物質(偽陽性 : False Positive)は 13/146 で検出感度は 91.12%、試験結果が陽性で計算結果は陰性の場合(偽陰性 : False Negative)は 7/20 物質であり検出精度は 65.0%であった。DEREK の偽陽性は 21/180 で感度は 88.3%、偽陰性は 7/26 で検出精度は 73.1%であった。AdomeWorks の偽陽性は 54/178 で感度は 69.7%、偽陰性は 7/26 で精度は 73.1%であった。以上の結果から、陰性結果をより正しく示すモデルは、MULTICASE 次いで DEREK, AdomeWorks の順となった。また、陽性結果の場合は、3 モデルとも

ほぼ同様な検出精度を示した。

次に既存点検物質選択の際の順位付けや改正化審法の下での低生産量化学物質の毒性予測等に、これらのモデルの利用を前提とした時、本来なら「陽性」なのに「陰性」と予測した場合が安全性評価において特に問題となるので、どのような化学構造をもった化合物が「陰性」と予測されたかを検討した。MULTICASE と DEREK で、「陰性」と判断された 7 化合物のうち、6 化合物は共通して「陰性」と判断した。AdomeWorks では、陰性を示したのは 6 化合物だが、DEREK と共通して「陰性」を示したのは 3-メキベンゼナミンのみで、MULTICASE と共通性は認められなかった。各々のモデル単独での陽性物質の「陽性」判定の信頼性は 70%前後で、今後、類似物質の文献情報等を入手し、各モデルのデータベース(DB)に追加し、精度向上が必要であるが、3 モデルとも「陰性」の結果を示した化合物は、2-アミノ-1-ナフトルスルホン酸と 2-ビニルピリジンの 2 化合物だけであり、現状のモデルの使用を前提とした順位付けや安全性予測を前提とした判断システムとしては、上記 3 つの SAR モデルを組み合わせる計算を実施する事が望ましいことが判明した。

3 つの SAR モデルを組み合わせその信頼性を検討したところ、実験結果「陽性」の化合物で 3SAR モデル中 1 つに「陽性」結果を示した場合の信頼性は 92.9%となった。また、実験結果「陰性」で SAR モデルでは「陰性」を示した場合において、全ての SAR モデルで「陰性」の信頼性は 64.4%であるが、2 つ以上の SAR モデルに「陰性」を示した場合における信頼性は 91.8%であった。

### ● 反復投与毒性試験を指標にした 3 次元構造活性相関モデルに関する研究

#### ①高フッ素化合物の PPAR 結合活性解析

##### 1. マウス個体を用いた解析

試験化合物を 0.05 %(wt/wt)の混餌で与えたが、摂取量に顕著な差は見られなかった。PPAR $\alpha$  標的遺伝子 HD の発現は各試験化合物で誘導され、代表

的な PPAR  $\alpha$  リガンドである Wy14,643 や Bezafibrate と比較しても劣らないほどの活性をもつ化合物 (C8) もあった。

## 2. 培養細胞を用いた解析

PPAR リガンドによって、標的遺伝子の発現変動がもっとも顕著に観察されたのは、Fao 細胞であったが、個体肝臓のレベルと比較すると、10 分の 1 程度であった。つづいて、分化させた 3T3L1 細胞と 2C12 細胞で、ごく限られた応答が見られた。ヒト肝細胞として期待される HepG2 は、ほとんど応答が観察されなかった。

## 3. レポーター遺伝子を用いた PPAR transactivation 解析

PFDA-C12 以外の 3 種類の試験化合物には、PPAR transactivation 活性が見られた。とくに PPAR  $\alpha$  に対して顕著であった。

## 4. PPAR リガンド結合部位への結合活性解析

現在までに、リコンビナント用プラスミドを構築した段階で、今後塩基配列の確認し、大腸菌での発現を試みる。

## ②毒性既知のフッ素化合物のクラスタリングと重相関解析による定量的構造活性相関 (QSAR)

### i) フッ素化合物系のクラスタリング

毒性データがある 34 個のフッ素化合物について、標的臓器を 28 日間反復投与試験の病理学・生化学試験の結果から推定した。また、各化合物の NOEL は 28 日間反復投与試験の結果をそのまま採用した。これら化合物の置換基の種類および物理化学的パラメータ (Kow、分子量、VDW 力、双極子モーメント、HOMO、LUMO、HOMO-LUMO) で化合物の特徴を自己組織化マップ (SOM) によってクラスタ分類した。クラスタ解析をした結果、図表 2-1 に示す通り、フッ素化合物は 10 クラスタに分類された。クラスタ 6 から 10 は、物理化学的パラメータおよび置換基パラメータの特有性から単体で存在している。クラスタ 7 に属している化合物 5-6414 は、甲状腺に症状が現れている。また、クラスタ 8 に属している 4-1687 は、腎臓で毒性が現れている。構造に特徴がある 2-3839、

H15-99 等は、どのクラスタにも属さず高毒性を有していることが示される。本解析で行った分類法により、エンドポイントの違いや特異的な毒性を物理化学的パラメータおよび置換基パラメータで分類することが出来ることを示した。

### ii) 重相関解析による QSAR

上記によって分類された化学物質群を重回帰モデルによってフッ素化合物の NOEL の定量的構造活性相関について検討を行う。クラスタ分類で使用した記述子を説明変数とする重回帰式は以下のようなになる。

$$\text{NOEL} = \alpha_1 \cdot \text{Kow} + \alpha_2 \cdot \text{分子量} + \alpha_3 \cdot \text{VDW 力} + \alpha_4 \cdot \text{Dipole} + \alpha_5 \cdot \text{HOMO} + \alpha_6 \cdot \text{LUMO} + \alpha_7 \cdot \text{HOMO-LUMO} + \beta \quad (1)$$

但し、 $\alpha_i$ 、 $\beta$  は回帰係数であり、 $\alpha_i$  はそれぞれの説明変数にかかる重み (回帰係数) である。これらの係数は、各変数と NOEL の実測値を用いて最小二乗法によって決定した。対象としたすべてのフッ素化合物の重相関解析を行った結果、すべての化合物で解析すると  $R^2$  値が 0.2394 であり、重回帰で NOEL を説明することが不可能である。

次に、物理化学的パラメータと置換基パラメータで分類したクラスタごとに重相関解析を行った。クラスタ 1 の重回帰解析では、12 物質属しており、予測値と実測値の  $R^2$  値が 0.78 であった。クラスタ 2 では、9 物質属しており、 $R^2$  値が 0.8 であった。そのほかのクラスタについては、サンプル数が説明変数の数より少なく重相関解析を行うことが出来なかった。

## ●毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究

PPAR $\alpha$  活性の既知の 12 個の化合物の複合体モデルから得られたリガンドの結合配座とアラインメントを使って三次元定量的構造活性相関解析 (CoMFA) を行い、静電相互作用、立体相互作用、ClogP から統計的に有意なモデル (予測的相関係数  $q^2$ :0.59(2 成分)) を得ることができた。



## CoMFA の結果

Cross-validated			Conventional					
q <sup>2</sup>	S <sub>DRESS</sub> 成分数	r <sup>2</sup>	F	s	ST	EL	ClogP	寄与率 (%)
0.66	0.87	3	0.99	451.2	0.11	68.7	31.3	-
0.59	0.90	2	0.90	38.5	0.45	38.5	28.7	32.7

ST : 立体相互作用 EL : 静電相互作用

また、得られた等高線情報 (静電相互作用、立体相互作用) はPPAR $\alpha$ のLBDのリガンド結合部位周辺のアミノ酸とその立体構造とが一致した

## D. 考察

### ● 既存の構造活性相関モデルの比較に関する研究

分子量と AMES 試験結果との関係について検討した。化学物質の生体内へ吸収されるためにはまず細胞膜を通過しなければ成らない。生体膜透過機構の一つに受動輸送があり、分子の大きさが膜の小孔より小さく、水に溶けやすい物質は膜の小孔中を単純拡散によって吸収される。脂溶性の高い場合には膜の脂質中を単純拡散により通過する。魚を用いた濃縮性試験において、「えら」からの化学物質の吸収を分子と濃縮性で比較したところ、分子の断面の最大幅が 9.5 Å 以上の分子(分子量で約 1000)では「えら」からの吸収がほとんど認められないことが報告されている。「えら」からの吸収は概ね分子量 1000 が目安となるが、AMES 試験に使用した菌株に対して、化合物の吸収は単純拡散だけでなく他の能動移送も考えられことから、1000 以上の物質でも陽性結果が見られている。しかし、分子量 3000 以上になると 7/194 物質(3.6%)のみが陽性結果を示し、その 7 物質のうち 4 物質の末端にエポキシサイドを有していることから、末端にエポキシサイドを有していない分子量 3000 の化合物については概ね AMES 試験陰性と判断が出来ると推測された。上記の結果から、既存化学物質安全性点検作業の品目選定用の選択システムのフローを下図に示す。

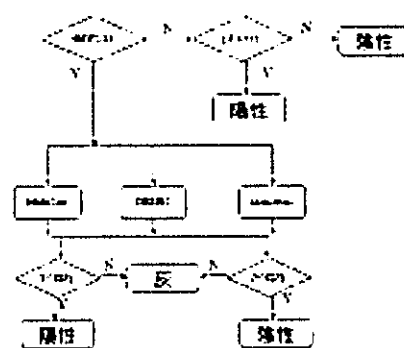


図2 AMES試験判定フローチャート

第一段階として、分子量 3000 か否かで分け、3000 以上の場合で末端にエポキシサイドを有していない場合は「陰性」と判断し、それ以外の化合物については、SAR モデルで安全性を判断する事とする。

次に 3 つの SAR モデル(MultiCase, DEREK, AdomeWorks)の比較において、実験結果「陰性」を計算結果「陰性」と示す場合では、MultiCase, DEREK, AdomeWorks の順で信頼性が高かった。また、実験結果「陽性」を計算結果「陽性」と示す場合では差は見られなかった。安全性評価において、本来は AMES 試験結果「陽性」を示しているが、SAR モデルでは「陰性」を示す場合が問題となることから、モデル間での「陰性」を示した化合物について検討したが共通性は見られなかったことから、今後、類似物質の AMES 試験結果を収集し、各モデルの DB にその情報を追加して、より精度の向上を測る必要があると考えられた。

選択システムのフローの第二段階として、3 つの SAR モデルに分子構造を INPUT し、3 つのうち 1 つでも「陽性」結果がみられた場合は「陽性」と判断し、2 つ以上に「陰性」結果がみられた場合には「陰性」と判断する事で、80% 近くの信頼性ある SAR 判断システムとなる。

今回の検討で AdomeWorks が「陰性」での信頼性が悪かったことから、3 次元構造活性相関モデル式を考慮した予測エンジンの改良を検討する必要性が示唆され、現在、その改良中である。

また、AMES 試験に関する(Q)SAR 式の文献を収集

したので、今後のモデル改良の資料とした。

### ● 反復投与毒性試験を指標にした3次元構造活性 相関モデルに関する研究

一連の化合物には、PPARの標的遺伝子の発現レベルを変化させる活性がありそうである。その強度は、化合物によって、さらに解析の方法によって差がみられる。まず、ヒトLBDを用いたレポーターアッセイでの化合物ごとの比較では、いずれにもPPAR $\alpha$ サブタイプに対する活性が見られ、C数(分子の長さ)との関連がありそうである。C8とC12の間に顕著な差が見られたことから、新たにC10化合物についても検討しているが、現在までのところ、C12化合物に似た活性であると考えられる。また、C10、C12化合物は、10 $\mu$ M程度から非選択的な細胞毒性が見られ、細胞を用いたリガンド活性が正確には測定できていない。PPAR $\beta$ と $\gamma$ に対しては、PFOSの $\beta$ に対する活性と、C10の $\gamma$ に対する弱い活性が見られる程度で、一連の化合物はPPAR $\alpha$ に選択性がありそうである。PPAR $\alpha$ のLBDの構造と、各化合物の結合様式の構造解析の結果と合わせ考察することが重要である。

一方、解析方法による相違としては、C6化合物の場合に見られる、同じマウスの系で細胞を用いたレポーターアッセイとマウス個体を用いた肝臓での応答の差が顕著である。細胞を用いたリガンド活性でも単純には生物活性に結びつかないことを示しており、リコンビナントタンパク質を用いたin vitroアッセイでは、さらにその乖離は著しいものと予想される。

PPARリガンド活性と毒性の観点からは、強い肝がん誘発活性を持つことが知られ、対照として用いたWy14,643に近いリガンド活性を細胞系で示したC6とC8化合物の今後の解析が重要と思われる。個体レベルでの応答が同様なWy14,643とC8、これらとは顕著な差がみられるC6の発肝がん性や応答遺伝子の網羅的比較により、PPARリガンド活性と毒性との関連に関する手がかりが得られることが期待される。

### ● 毒性予測に関する種々のCoMFAモデルの構築に関する研究

PPAR $\alpha$ リガンドとPPAR $\alpha$ のリガンド結合部位ドメインとの複合体モデルから得られた、PPAR $\alpha$ との結合に関与するPPAR $\alpha$ リガンドの官能基の三次元空間配置(三次元ファーマコフォア)とCoMFAモデルを用いることにより、コンピュータ上での活性分子のデータベース探索(in silico screening)や新規化合物の分子設計/活性予測を、比較的容易に行うことができるようになるものと思われる。

### E. 結論

分子量とAMES試験結果との関係について検討からは、末端にエポキサイドを有していない分子量3000の化合物については概ねAMES試験陰性と判断が出来ると推測された。3つのSARモデル(MultiCase, DEREK, AdomeWorks)の比較において、実験結果「陰性」を計算結果「陰性」と示す場合では、信頼性が高い順にMultiCase, DEREK, AdomeWorksとなった。また、実験結果「陽性」を計算結果「陽性」と示す場合では約70%前後で大きな差は認められなかった。今後、類似物質のAMES試験結果を収集し、各モデルのDBにその情報を追加して、より精度の向上を測る必要があると考えられたが、陽性物質のうち3つのSARモデル中少なくとも1つに「陽性」結果を示した場合の信頼性は92.9%となり、陰性物質において2つ以上のSARモデルに「陰性」を示した場合における信頼性は91.8%であったことより、3つのSARモデルを組み合わせて使用することは有用であることが示された。

反復投与毒性試験を指標にした3次元構造活性相関モデルに関しては、各種化合物のPPARリガンド活性はその毒性と結びつけられる可能性があるが、どのような系で何を指標にリガンド活性を測定するかを検討が重要である。リコンビナントタンパク質を用いたin vitroの系、細胞系、個体レベル、いずれも定量的解析をする見通しが立った。今後は、

これらの解析結果と、毒性に関するデータや構造解析の結果と合わせ、PPARのリガンド活性を各種化合物の毒性の指標にする基礎条件を確立していくことが可能であると思われる。

毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関しては、PPAR $\alpha$ 活性の既知の12個の化合物と PPAR $\alpha$ の LBD の複合体モデルから、統計的に有意な三次元定量的構造活性相関モデル (CoMFA モデル) を得ることができた。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 健康危機情報

##### 1. 論文発表

Müller, L., D. Blakey, K.L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. MacGregor, J.M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka, D. Tweats, and H. Yamasaki, Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat. Res.* 2003, 540, 177-181.

Koizumi,-M; Noda,-A; Ito,-Y; Furukawa,-M; Fujii,-S; Kamata,-E; Ema,-M; Hasegawa,-R (2003) Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. *J. Toxicol. Sci.* 28: 59-70.

##### 2. 学会発表

中込 泉、広野修一 PPAR $\alpha$ -リガンド複合体のモデル構築と相互作用解析 日本薬学会第124年会 (大阪) 2004.3.29 [第124年会日本薬学会講演要旨集 3 p.29 2004.3]

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金  
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究

主任研究者 林 真 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長  
分担研究者 鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官  
分担研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

研究要旨： 昭和 48 年の「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）制定までに日本国内で生産または輸入されていた化学物質（既存化学物質）のリストを国が作成し、このリストに記載されていない化学物質はこの化審法に基づいて新規化学物質となり、国の審査を受けなければならなくなった。しかし、既存化学物質リストには約 2 万以上の化学物質が登録されているが、そのほとんどの化学物質の安全性の情報は皆無に等しい。既存化学物質の安全性は国が実施することとなっているが、現在までに約 1000 物質が終了したに過ぎない。しかし、全ての化学物質について一律の試験を行い、データを収集することは経済的にも動物愛護の観点からも現実的なこととは言い難い。この問題の解決策の一案として構造活性相関（SAR）が有用であると考えられている。本研究は、既存の SAR モデルの比較を行い、更に遺伝毒性を指標にした 3 次元構造活性相関モデルに関する研究結果を加え、既存化学物質点検品目選定の為のフローを作成することを目的としている。

本年度はまず AMES 試験について検討した。分子量と AMES 試験結果との関係について検討からは、末端にエポキサイドを有していない分子量 3000 の化合物については概ね AMES 試験陰性と判断が出来るかと推測された。さらに、3 つの SAR モデル（MultiCase, DEREK, AdomeWorks）の各々において、陽性物質を「陽性」と示す場合の信頼性は約 70%前後で大きな差は認められず、今後、偽陰性類似物質の AMES 試験結果を収集し、各モデルの DB にその情報を追加して、より精度の向上を測る必要があると考えられた。しかし、陽性物質のうち 3 つの SAR モデル中少なくとも 1 つに「陽性」結果を示した場合の信頼性は 92.9%となり、陰性物質においても 2 つ以上の SAR モデルに「陰性」を示した場合における信頼性は 91.8%であったことより、3 つの SAR モデルを組み合わせて使用することの有用性が示された。

#### A. 目的

昭和 48 年 10 月 16 日に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）が制定された。

この時点までに日本国内で生産または輸入されていた化学物質（既存化学物質）の

リストを国が作成し、このリストに記載されていない化学物質はこの化審法に基づいて新規化学物質となり、国の審査を受けなければならなくなった。まず、分解性・蓄積性試験を実施し、難分解・低蓄積性で年間 1t 以上生産または輸入される新規化学物

質については、GLPによるAMES試験、染色体異常試験、ラットを用いた28日間反復投与試験のスクリーニング試験の実施が義務付けられており、新規化学物質の安全性情報については有る程度までは確保されている。しかし、既存化学物質リストには約2万以上の化学物質が登録されているが、その安全性の情報は皆無に等しい。化審法が施行されるにあたり、衆・参両議院の商工委員会の付帯決議により、既存化学物質の安全性は国が実施することとなったが、現在までに約1000物質が終了したに過ぎない。

平成15年に化審法改正が行われ、改正化審法は同年5月28日に公布され、それに関連して、衆参両議院の経済産業委員会は化審法改正に対する付帯決議で「既存化学物質の安全性点検については、・・・その有害性評価の計画的推進を図ること」と明文化された。しかし、1化合物のスクリーニング試験を実施するにあたり約1億8千～2億4千万円の費用が必要であり、時間的にも半年を必要としている。未点検の既存化学物質を国内の委託ラボの総力を挙げて安全性試験を実施したとしても年間約100物質が限度である。従って、既存化学物質の全てについて試験を行うと、単純計算で200年かかることになる。

OECDの高生産量化学物質安全性点検計画(HPV)においては、生産量が多く、安全性情報が少ない既存化学物質の安全性点検を加盟各国の協力で行うもので、1993年度から3年間で154物質について安全性評価に必要な試験を各国の分担で行うことで開始された。その後、ICCA(国際化学工業協会協議会)もこの取り組みに参画し、2002年11月の時点で350以上の化学物質の評価を行うことを表明している。この様に国際協力の下に既存化学物質の安全性評価済み物質を加算しても全ての物質の評価作業が

終了するまでにはほど遠い時間と費用がかかる。

この問題の解決策の一案として構造活性相関(SAR)が考慮されている。信頼されるSARモデルが開発されれば、多額の費用と時間がかかる安全性試験を行わなくても、その評価を行うことが出来る。また更に、これらのSARモデルを使用して大量の物質数から安全性試験を実施しなければいけない物質選定もできる。

本研究は、既存のSARモデルの比較を行い、更に遺伝毒性を指標にした3次元構造活性相関モデルに関する研究結果を加え、既存化学物質点検品目選定の為のフローを作成する。また、生体高分子と化学物質の結合能に関する文献調査を行う。

本年度はAMES試験結果について検討した。

## B. 方法

### 1. 分子量とAMES試験結果との関係

化学物質の生体内へ吸収されるためにはまず細胞膜を通過しなければならない。

AMES試験においても化学物質が細胞膜を通過することは必要条件であるので、AMES試験陽性結果を示した194物質について、その分子量分布について検討した。

### 2. 既存のSARモデルの比較

#### 2.1) 使用したSARモデル

OECDのQSAR専門家会議(36<sup>th</sup> Joint Meeting, 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> February 2004)において検討対象としているSARモデル(DEREK, MULTICASE)と、日本で開発しているモデル(AdomeWorks)の計3モデルについて検証を行った。

DEREKは、LHASA UK社によって開発されたモデルで、世界の80数機関で使用されており、独自のルールベースを作成する

平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究

主任研究者 林 真 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長  
分担研究者 鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官  
分担研究者 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

研究要旨： 昭和 48 年の「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）制定までに日本国内で生産または輸入されていた化学物質（既存化学物質）のリストを国が作成し、このリストに記載されていない化学物質はこの化審法に基づいて新規化学物質となり、国の審査を受けなければならなくなった。しかし、既存化学物質リストには約 2 万以上の化学物質が登録されているが、そのほとんどの化学物質の安全性の情報は皆無に等しい。既存化学物質の安全性は国が実施することとなっているが、現在までに約 1000 物質が終了したに過ぎない。しかし、全ての化学物質について一律の試験を行い、データを収集することは経済的にも動物愛護の観点からも現実的なこととは言い難い。この問題の解決策の一案として構造活性相関（SAR）が有用であると考えられている。本研究は、既存の SAR モデルの比較を行い、更に遺伝毒性を指標にした 3 次元構造活性相関モデルに関する研究結果を加え、既存化学物質点検品目選定の為のフローを作成することを目的としている。

本年度はまず AMES 試験について検討した。分子量と AMES 試験結果との関係について検討からは、末端にエポキサイドを有していない分子量 3000 の化合物については概ね AMES 試験陰性と判断が出来るかと推測された。さらに、3つの SAR モデル（MultiCase, DEREK, AdomeWorks）の各々において、陽性物質を「陽性」と示す場合の信頼性は約 70%前後で大きな差は認められず、今後、偽陰性類似物質の AMES 試験結果を収集し、各モデルの DB にその情報を追加して、より精度の向上を測る必要があると考えられた。しかし、陽性物質のうち 3つの SAR モデル中少なくとも 1つに「陽性」結果を示した場合の信頼性は 92.9%となり、陰性物質においても 2つ以上の SAR モデルに「陰性」を示した場合における信頼性は 91.8%であったことより、3つの SAR モデルを組み合わせて使用することの有用性が示された。

A. 目的

昭和 48 年 10 月 16 日に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（化審法）が制定された。

この時点までに日本国内で生産または輸入されていた化学物質（既存化学物質）の

リストを国が作成し、このリストに記載されていない化学物質はこの化審法に基づいて新規化学物質となり、国の審査を受けなければならなくなった。まず、分解性・蓄積性試験を実施し、難分解・低蓄積性で年間 1t 以上生産または輸入される新規化学物

これらの解析結果と、毒性に関するデータや構造解析の結果と合わせ、PPARのリガンド活性を各種化合物の毒性の指標にする基礎条件を確立していくことが可能であると思われる。

毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関しては、PPAR $\alpha$ 活性の既知の12個の化合物とPPAR $\alpha$ のLBDの複合体モデルから、統計的に有意な三次元定量的構造活性相関モデル (CoMFA モデル) を得ることができた。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 健康危機情報

##### 1. 論文発表

Müller, L., D. Blakey, K.L. Dearfield, S. Galloway, P. Guzzie, M. Hayashi, P. Kasper, D. Kirkland, J.T. MacGregor, J.M. Parry, L. Schechtman, A. Smith, N. Tanaka, D. Tweats, and H. Yamasaki, Strategy for genotoxicity testing and stratification of genotoxicity test results—report on initial activities of the IWGT Expert Group, *Mutat. Res.* 2003, 540, 177-181.

Koizumi, M; Noda, A; Ito, Y; Furukawa, M; Fujii, S; Kamata, E; Ema, M; Hasegawa, R (2003) Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. *J. Toxicol. Sci.* 28: 59-70.

##### 2. 学会発表

中込 泉、広野修一 PPAR $\alpha$ -リガンド複合体のモデル構築と相互作用解析 日本薬学会第124年会 (大阪) 2004.3.29 [第124年会日本薬学会講演要旨集 3 p.29 2004.3]

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし



ことでその信頼性を向上することが出来る。

MULTICASEは米国 Multicase 社が開発したモデルで、実験済みのデータからコンピュータが統計的・化学的に最適化された高度なデータベースを作成し、そこから活性値を判断するシステムであり、米国 FDA もこのモデルを使用している。

AdomeWorks は富士通九州が開発しているモデルで、多変量解析/パターン認識による毒性予測モデルである。

モデルの検証には、厚生労働省の既存化学物質安全性点検事業で実施された 221 物質の AMES 試験結果を用いた。

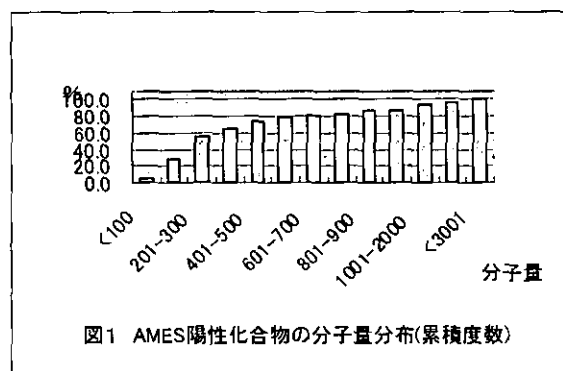
各々の化合物の構造式は、Chemdraw で作図後 MOL ファイルに変換し、3つのモデルに投入した。

## C. 結果

### 1. 分子量と AMES 試験結果との関係

AMES 試験陽性化合物の分子量を累積度数(図 1)に示す。

分子量 1000 までの化合物は全体の 87.1% で、分子量 3000 まで考慮すると 96.4% が分布していた。



分子量 3,000 以上で陽性を示したのは 7 化合物のみであった。

以上のことから分子量のみで AMES 試験結果を予測することは出来ないが、分子量 3000 以上であれば概ね「陰性」と考えることが出来る。上記の 7 物質中 4 物質の構造

式中に末端にエポキサイドをもった化合物があったことから、分子量 3000 であっても末端にエポキサイドを有している場合には「陽性」と判断した方が良いと考えられた。

### 2. 既存の SAR モデルの比較

SAR モデルの比較に使用した既存化学物質の構造と計算結果を表 1 に示す。

3つの SAR モデルに構造式を INPUT したところ、MULTICASE では、試験結果が陰性、計算結果は陽性を示した物質(偽陽性: False Positive)は 13/146 で検出感度は 91.1%、試験結果が陽性で計算結果は陰性の場合(偽陰性: False Negative)は 7/20 物質であり検出精度は 65.0%であった(表 2)。

表 2

	*MultiCase		Total	Accuracy
	-	+		
実験結果 -	133	13	146	91.1%
実験結果 +	7	13	20	65.0%
Total	140	26	166	

DEREK の偽陽性は 21/180 で感度は 88.3%、偽陰性は 7/26 で検出精度は 73.1%であった(表 3)。

表 3

	DEREK		Total	Accuracy
	-	+		
実験結果 -	159	21	180	88.3%
実験結果 +	7	19	26	73.1%
Total	166	40	206	

AdomeWorks の偽陽性は 54/178 で感度は 69.7%、偽陰性は 7/26 で検出精度は 73.1%であった(表 4)。

表 4

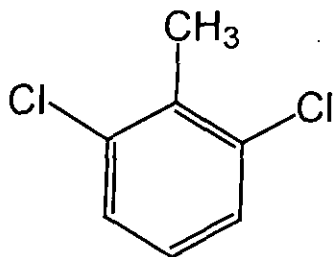
	AdomeWorks		Total	Accuracy
	-	+		
実験結果 -	124	54	178	69.7%
実験結果 +	7	19	26	73.1%
Total	131	73	204	

以上の結果から、陰性結果をより正しく示すモデルは、MULTICASE 次いで DEREK、AdomeWorks の順となった。また、陽性結果の場合は、3 モデルともほぼ同様な検出精度を示した。

次に既存点検物質選択の際の順位付けや改正化審査の下での低生産量化学物質の毒性予測等に、これらのモデルの利用を前提とした時、本来なら「陽性」なのに「陰性」と予測した場合が安全性評価において特に問題となるので、どのような化学構造をもった化合物が「陰性」と予測されたかを検討した。

MULTICASE では、

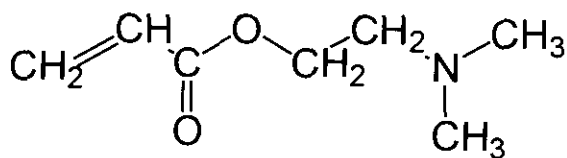
199399305A : 2,6-ジクロロトルエン



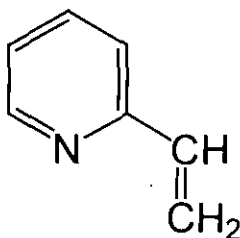
199399412A : 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸



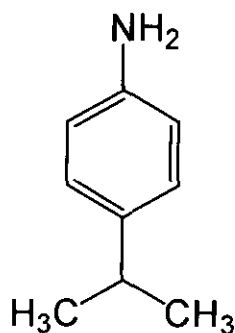
199599312A : アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル



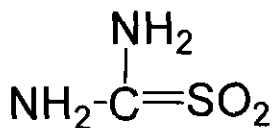
199599422A : 2-ビニルピリジン



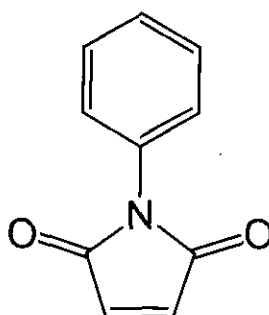
199799310A : 4-(1-メチルエチル)-アニリン



199799316A : チオウレア-S,S-ジオキソト



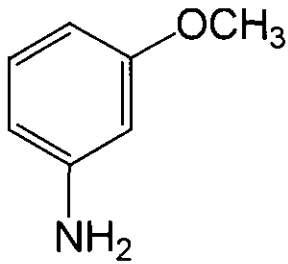
199899309A : 1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン



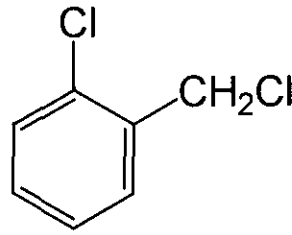
の以上7化合物であった。

DEREK では、

199199307A : 3-メキシベンゼナミン



199799315A : 1-クロロ-2-(クロメチル)ベンゼン



199399412A : 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸

199599312A : アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル

199599422A : 2-ビニルピリジン

199799310A : 4-(1-メチルエチル)-アニリン

199799316A : チオウレア-S,S-ジオキソド

199899309A : 1-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン

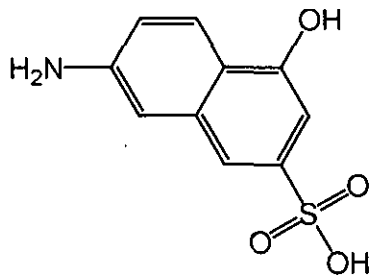
の7化合物で、MULTICASEと比較すると、3-メキシベンゼナミンのみが異なり、それ以外の6化合物は共通して「陰性」結果を示した。

AdomeWorks では、

199199307A : 3-メキシベンゼナミン

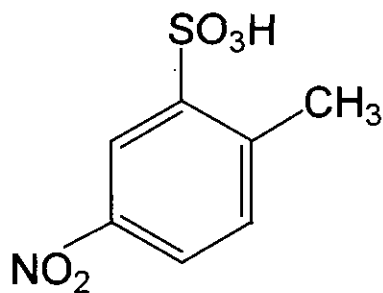
199399412A : 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸

199499432A : 7-アミノ-4-ヒドロキシ-2-ナフタレンスルホン酸

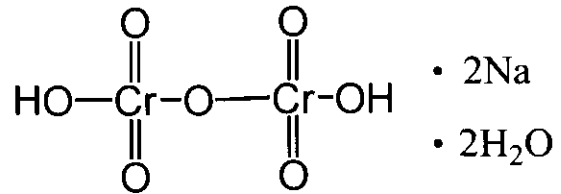


199599422A : 2-ビニルピリジン

199699310A : 2-メチル-5-ニトロベンゼンスルホン酸



200099307A : 二クロム酸ナトリウム、二水和物



の7化合物で、DEREKと比較すると、

199199307A : 3-メトキシベンゼナミン、

199399412A : 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸、

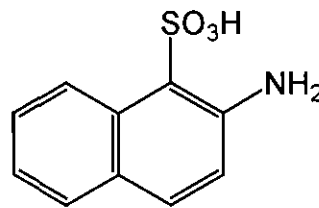
199599422A : 2-ビニルピリジンの3化合物が共通に「陰性」を示し、MULTICASEと比較すると

199399412A : 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸、

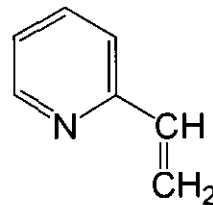
199599422A : 2-ビニルピリジンが共通していた。

つまり、3モデルとも「陰性」の結果を示した化合物は

199399412A : 2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸



と 199599422A : 2-ビニルピリジン



の2化合物であった。

以上の事から、実験結果が「陽性」なのに「陰性」を示した化合物については、共通性が乏しいことから、今後、類似物質の文献情報等入手し、各モデルのデータベース(DB)に追加し、精度向上が必要であるが、現状のモデルの使用を前提とした順位付けや安全性予測を前提とした判断システムとしては、上記3つの SAR モデルを組み合わせ計算を実施する事が望ましいことが判明した。

3つの SAR モデルを組み合わせその信頼性を検討したところ、実験結果「陽性」の化合物で 3SAR モデル中1つに「陽性」結果を示した場合の信頼性は 92.9%であった(表 5)。

表 5

		SAR モデル		Total	Accuracy
		-	+		
実験結果	+	2	26	28	92.9%
	-	94	52	146	64.4%
Total		96	78	174	

注: 実験結果陽性では、SAR で陽性が一つ有れば陽性と判断

注: 実験結果陰性では、SAR が全て陰性の場合陰性と判断

また、実験結果「陰性」で SAR モデルでは「陰性」を示した場合において、全ての SAR モデルで「陰性」の信頼性は 64.4%(表 5)であるが、2つ以上の SAR モデルに「陰性」を示した場合における信頼性は 91.8%であった(表 6)。

表 6

		SAR モデル		Total	Accuracy
		-	+		
実験結果	+	2	26	28	92.9%
	-	134	12	146	91.8%
Total		136	38	174	

注: 実験結果陽性では、SAR で陽性が一つ有れば陽性と判断

注: 実験結果陰性では、SAR が2つ陰性の場合陰性と判断

#### D. 考察

昭和 48 年に発刊された「既存化学物質リスト」には約 2 万以上の化学物質が掲載されているが、その安全性情報が獲られているのはその内の極一部に過ぎない。未点検の既存化学物質の安全性評価を迅速に終了するためには、(Q)SAR を利用してその毒性を予測し、点検順位の決定の資料とするか、(Q)SAR の結果がより信頼性が高くなればその結果だけで評価が出来る可能性が生まれる。

現在、市販されている(Q)SAR モデルのうち3つを選び、その信頼性を検討するとともに、それらのモデルを利用して既存点検化学物質選択システムに寄与するためのフローを作成した。今年度は AMES 試験について検討した。

まず、分子量と AMES 試験結果との関係について検討した。

化学物質の生体内へ吸収されるためにはまず細胞膜を通過しなければ成らない。生体膜透過機構の一つに受動輸送があり、分子の大きさが膜の小孔より小さく、水に溶けやすい物質は膜の小孔中を単純拡散によって吸収される。脂溶性の高い場合には膜の脂質中を単純拡散により通過する。魚を用いた濃縮性試験において、「えら」からの化学物質の吸収を分子と濃縮性で比較したところ、分子の断面の最大幅が 9.5 Å 以上の分子(分子量で約 1000)では「えら」からの吸収がほとんど認められないことが報告されている。

「えら」からの吸収は概ね分子量 1000 が目安となるが、AMES 試験に使用した菌株に対して、化合物の吸収は単純拡散だけでなく他の能動移送も考えられることから、1000 以上の物質でも陽性結果が見られている