

平成16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 16 年度 総括研究報告書

主任研究者 林 真

平成 17 年 (2005 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 _____	15
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 _____	35
広野 修一	
4. 化学物質の代謝活性化の予測モデルに関する研究 _____	39
山添 康	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____	47
IV. 研究成果の刊行物・別冊 _____	51

平成16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)

I. 総括研究報告書

平成 16 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

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 1,000 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。

既存の構造活性相関モデルの比較に関しては、分子量と染色体試験結果との関係について検討し、末端にエポキサイドを有していない分子量 3000 以上の化合物は概ね染色体試験結果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) の比較を、AMES 試験について、Kirkland らのデータを元に検証した結果、昨年度と同様に MultiCase、DEREK、AdmeWorks の順で高い精度が見られた。

昨年度、作成した既存点検化学物質選択（AMES 試験）のためのフローチャートについて、Kirkland らのデータを用いて、その信頼性を検証したところ、86.7%の正答率が得られ、今後、既存化学物質点検品目選定の為のフローチャートとして使用できることが判明した。染色体試験に関しては、各モデルとも開発中のシステムであることから AMES 試験と比較して低い信頼性しか得られなかった。今後、開発元と綿密な連携を取りながら、早急に、精度の向上を測る必要があると考えられた。

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、ニューラルネットワークにより、物理化学的特性のトポロジー的距離の近いクラスター 1 およびクラスター 2 を併せて

NOELを予測した。その結果、重回帰解析より予測性の高いQSARモデルを構築することが出来た。また、ニューラルネットワークで解析することにより、毒性を説明する因子を解析することができ、その情報から作用機序を推定することも出来た。また、記述子および構造に特異性のある物質については、予測値と実測値が乖離してしまうことから、一連の置換基を持つ化合物群と違う作用機序を持っていると推定が出来る。

毒性予測に関する種々のCoMFAモデルの構築に関しては、PPAR・活性既知の19個の化合物に対してPPAR α LBDとの複合体モデルと統計的に有意で、かつ、昨年度よりも良い三次元定量的構造活性相関モデル(QSARモデル)を得ることができた。

化学物質の代謝活性化の予測モデルに関しては、pyrene則の適用性比較からtrigger部位の興行き等の確度を向上させる必要があるが、予測が可能なが明らかとなった。

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
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
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
広野 修一 北里大学 薬学部 教授
山添 康 東北大学大学院薬学研究科
薬物動態学分野 教授

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
本島 清人 明治薬科大学 教授

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モデルの適用性や化学物質

の代謝活性化の予測モデルについて検討した。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、構造活性相関コンピュータ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. 分子量と染色体試験結果との関係

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。染色体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、染色体試験陽性結果を示した 657 物質について、その分子量分布の検討を行った。

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。AdmeWorks 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。

2.2) DEREK のバージョンアップにおける精度変化

モデルの検証には、NTP やその他の文献情報から、AMES 試験結果と化学構造の一覧を Kirkland らが公表したので、その結果を用いた。

2.3) AMES 試験における各モデル間の精度の比較

3 モデルの検証には、上記で用いた Kirkland の AMES 試験結果を用いた。

2.4) 既存点検化学物質選択のためのフローチャート (AMES 試験) の信頼性

昨年度作成した AMES 試験判定フローチャートに基づいて Kirkland のデータを INPUT し、その信頼性を検証した。

2.5) 染色体試験における各モデル間の精度比較

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 254 物質の染色体試験結果を用いた。

●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

試験化合物の PPAR のリガンド活性を測定する方法としてレポーター遺伝子を用いた PPAR transactivation 解析を行った。

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 α 、 β 、 γ 3 種類のサブタイプのリガンド結合部位を、GAL4 タンパク質に融合させたキメラ受容体を用意した。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、PPAR 各サブタイプの代表的リガンドをコントロールとし、試験化合物を濃度を変えて添加し、48 時間後のレポーター活性を Dual luciferase 法で測定した。

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)

2.1 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。これら化合物の置換基の種類および活性を説明する疎水性 *K_{ow}*、立体因子(分子量、VDW半径)、電子的因子 (*Dipole*、*HOMO*、*LUMO*) で化合物の特徴を自己組織化マップ (SOM) によって分類した。

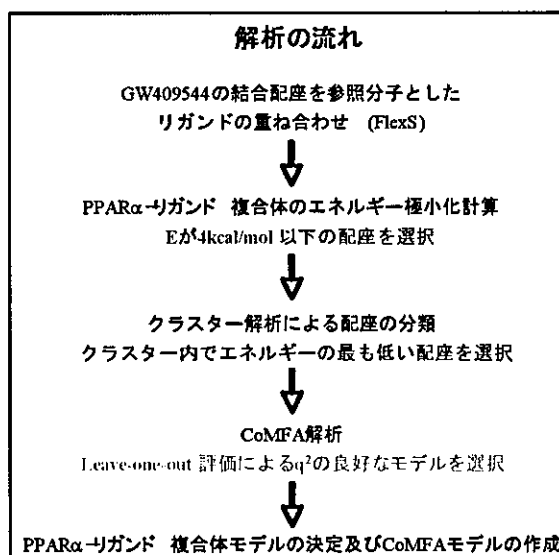
2.2 ニューラルネットワークによる QSAR

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 について定量的構造活性相関の検討を行った。

●毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究

PPAR α の LBD と GW409544 の複合体の X 線結晶解析実験による立体構造 (PDB code: 1K7L) から得られる GW409544 の結合コンフォメーションを基に、リガンド重ね合わせプログラム、FlexS (SYBYL) を用いて、PPAR α 活性が既知の 19 個の化合物の結合配座候補を抽出した。これらの配座から PPAR α LBD-リガンド複合体構造を作成し、エネルギー極小化計算を行って構造を最適化した。エネルギー極小化後の複合体のエネルギーによって複合体モデルを評価し選択した。選択したモデルから各リガンドの結合配座を抽出し、これらの結合配座とそのアライメントを用い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。



●化学物質の代謝活性化の予測モデルに関する研究

ヒト CYP1A2 の発現系試料を用いて測定された代謝データを収集した。ヒト CYP1A2 の発現系には酵母細胞、昆虫細胞など宿主には違いがあり、補酵素からの電子伝達する NADPH-cyt.P450 還元酵素の発現レベルにも差がみられる。しかしながら今回のデータ収集ではこれらを区別せず、基質特性情報として得られたものをリストした。

化学物質の代謝についての情報精度にもかなりの違いが見られる。主代謝物のみを測定対象としたデータと副生成物を含めた定量データを含む論文もあったが、今回は必要事項の抜き出しに必要な項目のみを採用した。

データの収集は Medline を用い、PubMed 検索で該当する文献を選択した。

検索項目は、基本的に CYP1A, human liver としたが、化合物によっては該当する論文が選択されないため、阻害薬物等の情報を付加して収集した。

●倫理面への配慮

本年度の研究においては、in vivo およびヒト材料を扱う試験は実施していないことから、動物愛護およびヒトに対する倫理的な問題が生ずる可能性はない。

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. 分子量と染色体試験結果との関係

分子量 1000 までの化合物は全体の 89.1%で、分子量 3000 まで考慮すると 98.9%が分布していた。

分子量 3,000 以上で陽性を示したのは 657 物質中 5 化合物のみで、その内 4 物質の末端にはエポキシ基が存在していた。

2. DEREK のバージョンアップにおける精度変化

バージョンが上がるにつれ、試験結果陽性化合物で計算結果が陽性を示す割合 (Sensitivity) は、若干減少が見られたが、試験結果陰性化合物で計算結果が陰性を示す割合 (Specificity) および試験結果と同じ結果を示す割合 (Concordances) については、その精度に上昇が見られた。

3. AMES 試験における各モデル間の精度比較

陽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、陰性結果の場合も同様な順位が見られた。

4. 既存点検化学物質選択のためのフローチャート (AMES 試験) の信頼性

昨年度作成した既存点検化学物質選択 (AMES 試験) 用の判定フローチャートに基づいて Kirkland のデータを INPUT し、その信頼性を検証したところ、86.7%あった。更に、3つのモデルとも同じ結果の場合について検討した結果、信頼性(表7)は 98.7%であった。しかし、3つとも同じ結果が得られた場合の化合物数は 297 であり、2つ以上の場合には 610 であり、判定化合物数の減少が見られた。

5. 染色体試験における各モデル間の精度比較

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 254 物質の染色体試験結果を用いた結果、Concordance で一番良い値を示したのは DEREK

(62.7%)で次いで、MultiCase (61.1%)、AdmeWorks (58.4%)の順であった。染色体試験の精度を AMES 試験結果と比較すると約半分以下の信頼性しか得られなかった。

●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

5種類の化合物、PFHA-C6, PFOA-C8, PFNA-C10, PFDA-C12, PFOS について測定し、更に、肝毒性が疑われる以下の 9 化合物について検討した。

1. N-(1,3-Dimethyl butyl)-N-phenyl-p-phenylenediamine
2. 1H, 1H, -perfluoro octanol
3. 1H, 1H, 2H, 2H-perfluor octan-1-ol
4. 2-Etyl hexyl Diphenyl Phosphate
5. P-(1, 1, 3, 3-Tetramethyl butyl)-phenol
6. Nonylphenol
7. Dibutyl Adipate
8. 2, 4-Di-t-butylphenol
9. Diheptyl Phtgalate

PPAR α リガンド活性は、ポジティブコントロールの Wy 化合物と、溶媒のみのコントロール DMSO との比較から、次のように分類することができた。

まったくない：3、8

弱い活性がある：7

強い活性がある：2

強そうだが細胞毒性がある：1、4、5、6、9

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)

2.1 フッ素化合物系のクラスタリング

SOM マップによって分類した結果、34 個のフッ素化合物は 10 クラスタに分類された。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が示された。

2.2 ニューラルネットワークによる QSAR

分類したクラスターごとに重相関解析を行った結果、クラスター1では予測値と実測値の R^2 値が 0.78 で、クラスター2では、 R^2 値が 0.8 であった。しかしながら、クラスター1の化合物数は12であり、クラスター2の化合物数は8である。使用した構造活性相関式は、

$NOEL = \alpha_1 \cdot Kow + \alpha_2 \cdot \text{分子量} + \alpha_3 \cdot VDW\text{半径} + \alpha_4 \cdot Dipole + \alpha_5 \cdot HOMO + \alpha_6 \cdot LUMO + \beta$ (1)を使用した。各係数の NOEL に対する寄与率は、クラスター1では、*LUMO* が最も大きく *HOMO* が、クラスター2では、*Kow*、*HOMO* および分子量が *NOEL* に効いていることがわかった。両クラスターでは、*HOMO*、*LUMO* が活性のパラメータとして大きく寄与している。このことから、活性には電子的因子が強く影響していると判断される。しかしながら、重相関解析では、パラメータ数に対し化合物数が少なく、予測信頼性がないと考えられる。

そこで、標的臓器が同じであり、記述子群のトポロジー的距離が似ているクラスター1、クラスター2を併せてニューラルネットワークにより *NOEL* を予測した。なお、予測に使用した記述子は、重相関で求めた寄与率の高い *Kow*、*LUMO*、*HOMO*、そして、*Dipole* を使った。

予測値と実測値の相関係数 R^2 値は、*LOO* で求めたときが 0.835 であり、クラスター1およびクラスター2を一緒に解析しながらも重回帰解析より高い精度となっており、予測性に優れているといえる。ネットワークを構築した時の記述子の *EffectRatio* は、*LUMO* がもっとも高く 0.6、次に *Dipole* が 0.5、*Kow*、*HOMO* が 0.1 となっている。*LUMO*、*Dipole* が大きい影響度を示しているということは、これらが反応性を有している物質群と考えられる。なお、*Dipole* が大きい *LUMO* が最も小さい H15-55、一つのベンゼン環に $-CF_3$ が2つ置換しており *Dipole* が大きい 3-4511 は、実測値と予測値が乖離していた。これらの物質は、構造や記述子からその他とは異なる作用機序による活性を有すると考えられる。したがっ

て、同じクラスターとして予測することは出来ないと推測される。これらの物質については、クロスバリデーションからは除外している。

この構築したネットワークでその他のクラスターの物質を予測しても、実測値を予測することはほとんど出来なかった。また、全物質を用いてネットワークの構築しようとした場合、記述子のダイバーシティが大きく、毒性を説明する良好なネットワークが構築することは出来なかった。このことから、クラスター間には異なる作用機序を有すると考えられる。

●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・活性が既知の19個のリガンドの結合配座とアラインメントを使って CoMFA 解析を行った結果、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 : 0.54 (4成分)) を得ることができた (下表)。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 の LBD のリガンド結合部位周辺の立体構造特性と一致した (次図参照)。

●化学物質の代謝活性化の予測モデルに関する研究

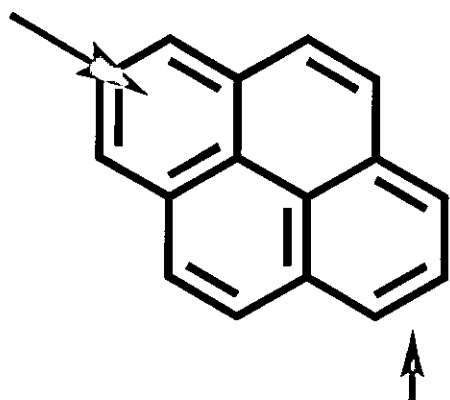
チトクローム P450 の酸化反応は、基質の一部が酵素の特定部位に接触して捕捉されることではじまる。ついで、ヘム近傍の環境に合うコンフォメーションを採ったときに酵素内に固定され酸化を受ける。

最初に接触する部位を *trigger site* と呼ぶ。他の P450 分子種では基質構造内に基質の構造を酸化部位とオープン空間にはいる部位に分ける *pinching point* と呼ぶ箇所がある。CYP1A2 では *trigger site* が平板状でその直線上に *pinching point* があると予測されるため、*pinching point* の決定は不必要となる。代表的な約10種の物質についてこの原則を適用して酸化部位と *trigger site* の関係を調べた結

果、酸化部位は特定範囲の距離を中心に分布することが明らかとなった。この距離はベンゼン環3個分に相当する。

この段階で、trigger pinching oxidizing 各部位の同一平面性が必要な要素であることが判明したので、これらを統一的に扱うルールとして pyrene rule を考案した。

pyrene は4環性の平面分子である。ここで CYP1A2 に基質は赤字矢印の部位が trigger site に捕捉されると考える。平面性が重要な要素である。空間上下左右の構造が一定の条件を満たすと、緑矢印の酸化部位がへム近傍に向かって配位して固定されると考える。これら2部位の間をさらに固定する必要があり、上下環いずれかの炭素が pinching point を兼ねる。



このように考えると、被検化合物を pyrene と重ねることによって適合性を調べることが可能となる。

基本的には3環にわたって重なる部位の多い物質ほど、適合性があると考える。

へムは緑の矢印下方から接近するので側鎖がこの下方2炭素までの範囲にあれば基質となる。

酸化部位はベンゼン環1個分の余裕があり、下方の naphthalene は anthracene になっても収容可能である。左下に pyrene 下端を超えて伸張はできない。

また酸化部位の上も naphthalene 環の高さまで可能である。

Trigger 部位の上は比較的余裕がある。

D. 考察

●既存の構造活性相関モデルの比較に関する研究

分子量と染色体試験結果との関係について検討したところ、AMES 試験の場合と同様の結果が得られた。分子量 3000 以上になると 5/657 物質 (0.76%) のみが陽性結果を示し、その5物質のうち4物質の末端にエポキサイドを有していることから、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染色体試験陰性と判断が出来るかと推測された。

DEREK の Ver. 7 と Ver. 8.0.1 及び Ver. NIHS 版を比較すると、Sensitivity に若干の減少が見られたが、Specificity および Concordances においては、Ver. 8.0.1 さらに Ver. NIHS では、精度の上昇が見られた。

Kirkland らの AMES 試験結果を用いて、3つのモデルについて検証を行ったところ、Concordance において MultiCase、DEREK、AdmeWorks の順で高い精度が見られ、昨年度の結果と同様であった。昨年度、作成した既存点検化学物質選択 (AMES 試験) のためのフローチャートについて、Kirkland らのデータを用いて、その信頼性を検証したところ、86.7%の正答率が得られ、既存化学物質点検品目選定の為の AMES 試験用に3つの (Q) SAR モデルを組み合わせさせたフローチャートの使用が望ましいことが判明したが、全モデルに同じ結果が得られる条件での精度は 98.7%になり、予測しうる化合物数の減少が見られることから、より精度の向上には、(Q) SAR モデルの使用前に構造分類のアプリケーションによって分類を行い、その分類された構造に特化した (Q) SAR モデルを開発することや、偽陰性や偽陽性となった化合物の類似物質等の文献情報を入手し、(Q) SAR モデルの改良を行うことが必要であると考えられた。

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 254 物質の染色体試験結果を用いた場合の各モデルの計算結果において、AMES 試験と比較して低い信頼性しか得られなかった。この原因とし

ては、各モデルとも AMES 試験については以前から開発を行っていたが、染色体試験については、最近になってアラートやモデル式の開発を進めている現状があることから、染色体試験に対しては開発途上のモデルであることから、染色体試験に関しては、開発元と綿密な連携を取りながら、より精度の向上を測る必要があると考えられた。

変異遺伝性試験に関する (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 α 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 μ 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 β と γ に対しては、PFOS の β に対する活性と、C10 の γ に対する弱い活性が見られる程度で、一連の化合物は PPAR α に選択性がありそうである。PPAR α 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 α リガンドと PPAR α の LBD との複合体モデルから得られた、PPAR α との結合に関与する PPAR α 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。

●化学物質の代謝活性化の予測モデルに関する研究

CYP1A2 の基質となる化学物質はいずれも平面平板状の配置が可能な物質であることが明らかとなった。多くの場合平面構造から予想が可能であるが、ねじれ等の要因を知るため 3 次元構造として評価する必要性が明らかとなった。

E. 結論

既存の構造活性相関モデルの比較に関しては、分子量と染色体試験結果との関係について検討し、末端にエポキサイドを有していない分子量 3000 以上の化合物は概ね染色体試験結果陰性と判断が出来るかと推測された。3 つの SAR モデル (MultiCase, DEREK, AdomeWorks) の比較を、AMES 試験について、Kirkland らのデータを元に検証した結果、昨年度と同様に MultiCase、DEREK、AdmeWorks の順で高い精度が見られた。

昨年度、作成した既存点検化学物質選択 (AMES 試験) のためのフローチャートについて、Kirklandらのデータを用いて、その信頼性を検証したところ、86.7%の正答率が得られ、今後、既存化学物質点検品目選定の為のフローチャートとして使用できることが判明した。染色体試験用のシステムは、現在、開発中のモデルであることから、AMES 試験と比較して低い信頼性しか得られなかった。今後、開発元と綿密な連携を取りながら、早急に、精度の向上を測る必要があると考えられた。

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、ニューラルネットワークにより、物理化学的特性のトポロジ的距離の近いクラスター1およびクラスター2を併せてNOELを予測した。その結果、重回帰解析より予測性の高いQSARモデルを構築することが出来た。また、ニューラルネットワークで解析することにより、毒性を説明する因子を解析することができ、その情報から作用機序を推定することも出来た。また、記述子および構造に特異性のある物質については、予測値と実測値が乖離してしまうことから、一連の置換基を持つ化合物群と違う作用機序を持っていると推定が出来る。

毒性予測に関する種々のCoMFAモデルの構築に関しては、PPAR・活性既知の19個の化合物に対してPPAR α LBDとの複合体モデルと統計的に有意で、かつ、昨年度よりも良い三次元定量的構造活性相関モデル (QSARモデル) を得ることができた。

化学物質の代謝活性化の予測モデルに関しては、pyrene 則の適用性比較から trigger 部位の奥行き等の確度を向上させる必要があるが、予測が可能ながことが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Homa, M., Izumi M., Sakurada Y., Tadokoro S., Sakamoto H., Wang W., Yatgai F. and Hayashi M. (2003): Deletion, rearrangement, and gene conversion; genetic consequences of chromosomal double-strand breaks in human cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, **42**, 288-298.
- Itoh, T., Kuwahara T., Suzuki T., Hayashi M. and Ohnishi Y. (2003): Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in *lambda/lacZ* transgenic mice. *Mutat. Res.*, **539**, 99-108.
- Yamada, K., Suzuki T., Kohara A., Hayashi M., Mizutani T. and Saeki K. (2004): In vivo mutagenicity of benzo[*f*]quinoline, benzo[*h*]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the *lacZ* transgenic mice. *Mutat. Res.*, **559**, 83-95.
- Zang, Li, Sakamoto H., Sakuraba M., D-S Wu, L-S Zhang, Suzuki T., Hayashi M. and Honma M. (2004): Genotoxicity of microcystin-LR in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, **557**, 1-6.
- Suzuki, H., Shirotori T., and Hayashi M. (2004): A liver micronucleus assay using; young rats exposed to diethylnitrosamine: methodological establishment and evaluation. *Cytogenet. Genome. Res.*, **104**, 299-303.
- 林真, 長尾美奈子, 祖父尼俊雄, 森田健, 能美健彦, 本間正充, 宇野芳文, 葛西宏, 佐々木有, 太田敏博, 田中憲穂, 中嶋圓, 布柴達夫 (2004): 食品および食品添加物に関する遺伝毒性の検出・評価・解釈に関する臨時委員会の活動中間報告. *Eviron. Mutagen Res.*, **26**, 275-283.
- Ema M, Harazono A, Hirose A and Kamata E: (2003): Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. *Toxicol Lett.*, **143**, 233-238.
- Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S,

- Kamata E, Ema M and Hasegawa R (2003): Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. *J Toxicol Sci.*, **28**, 59-70.
- Ema M, Miyawaki E, Hirose A and Kamata E. (2003): Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol.*, **17**, 407-412.
- 広瀬明彦、江馬 眞、鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一 (2003): ビスフェノール A の内分泌かく乱作用のヒトへの影響評価、*日本食品化学会誌*, **10**, 1-12.
- Fukuda, N., Ito, Y., Yamaguchi, M., Mitsumori, K., Koizumi, M., Hasegawa, R., Kamata, E. and Ema, M., (2004): Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats. *Toxicol. Lett.*, **150**, 145-150.
- Takahashi M., Ogata H., Izumi H., Yamashita K., Takechi M., Hirata-Koizumi M., Kamata E., Hasegawa R. and Ema M., (2004): Comparative toxicity study of 2,4,6-trinitrophenol (picric acid) in newborn and young rats. *Cong Anom.*, **44**, 204-214.
- Hirose A., Hasegawa R., Nishikawa A., Takahashi M. and Ema M., (2004): Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride-Differences from the latest WHO guideline drafts- *J Toxicol Sci.*, **29**, 535-539.
- 高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞 (2004): OECD 化学物質対策の動向(第5報)、*衛研報告*, **122**, 37-42.
- 広瀬明彦、江馬 眞 (2004) 生殖発生毒性を指標としたダイオキシンの耐容1日摂取量(TDI)算定の考え方について、*衛研報告*, **122**, 56-61.
- Hashimoto A., Amanuma K., Hiyoshi K., Takano H., Masumura K., Nohmi T. and Aoki Y (2005) :In Vivo Mutagenesis Induced by Benzo[a]pyrene Instilled Into the Lung of gpt Delta transgenic Mice. *Environ. Mol. Mutagen.*, **45** (in press).
- 松本理, 丸山若重, 広野靖史郎, 青木康展, 松本幸雄, 中杉修身(2004):大気中の化学物質の複合曝露による発がんリスクの評価. *日本リスク研究学会誌*, **15**, 55-67.
- Maruyama W., Yoshida K. and Aoki T. (2004): Dioxin Health Risk to Infants Using Simulated Tissue Concentrations. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **18**, 21-37.
- 青木康展 (2005): これからの環境モニタリングとバイオアッセイ, *環境と測定技術*. **32**, 26-32.
- Takahashi YK., Kurosaki M., Hirono S. and Mori K. (2004): Topographic representation of odorant molecular features in the rat olfactory bulb. *J. Neurophysiol.*, **92**, 2413-2427.
- Tsuchida K., Hisaaki C., Takakura T., Yokotani J., Aikawa Y., Shiozawa S., Gouda H. and Hirono S. (2004): Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Cyclic Disulfide Decapeptides That Inhibit the Binding of AP-1 to DNA. *J. Med. Chem.*, **47**(17), 4239-4246.
- Takashi N., Motoyama T., Hirono S. and Yamaguchi I. (2004): Identification, characterization, and site directed mutagenesis of recombinant pentachlorophenol 4-monooxygenase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1700**(2), 151-159.
- Oda A., Yamaotsu N. and Hirono (2004): Studies of Binding Modes of (S)-Mephenytoin to Wild Types and Mutants of Cytochrome P450 2C19 and 2C9 using Homology Modeling and Computational Docking. *Pharm. Res.*, **21**(12), 2270-2278.
- Nagata Y., Kusuhara H., Hirono S., Endou H. and Sugiyama Y. (2004): CARRIER-MEDIATED UPTAKE OF H2-RECEPTOR ANTAGONISTS BY THE RAT CHOROID PLEXUS: INVOLVEMENT OF RAT ORGANIC ANION TRANSPORTER 3. *Drug Metab. Dispos.*, **32**(9), 1040-1047.
- Hirono S., Nakagome I., Imai R., Maeda K., Kusuhara H. and Sugiyama Y., (2005): Estimation of the

Three-Dimensional Pharmacophore of Ligands for Rat Multidrug-Resistance-Associated Protein 2 using Ligand-Based Drug Design Techniques. *Pharm. Res.*, **22**(2) 260-269.

Matsubara T., Kim H. J., Miyata M., Shimada M., Nagata K. and Yamazoe Y., (2004): Isolation and characterization of a new major intestinal CYP3A form, CYP3A62, in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 1282-1290

Miyata M., Tozawa A., Otsuka H., Nakamura T., Nagata K., Gonzalez F. J and Yamazoe Y. (2005): Role of farnesoid X receptor in the enhancement of canalicular bile acid output and excretion of unconjugated bile acids: a mechanism for protection against cholic acid-induced liver toxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**(2), 759-766.

2. 学会発表

Hirose A, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hayashi Y., (2004): "Development of genotoxicity predicting QSAR system for registered and existing industrial chemicals in Japan" 11th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland, July, 11-15.

高橋美加、鎌田栄一、広瀬明彦、林真, (2005):

“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” 14th International Collaborative Group Meeting, Tokyo, Feb. 25

Hayashi M. (2004): "Newly development of in vivo micronucleus assay". ASIATOX III, Chiang Mai, .

Hayashi M. (2004): "Strategy for safety assessment of food and related chemicals based on genotoxicity assay data" International Symposium on Risk Assessment Strategy in Genotoxicity of Food and Related Substances, Tokyo.

Hayashi M. (2004): "Regulatory perspective on data gaps in Japan". HESI Workshop on DNA Adducts: Biological Consequences and Application to Risk Assessment, Washington DC.

林 真 (2004): "げっ歯類を用いる小核試験の基礎研究ならびにその行政面への応用". 第33回日本環境変異原学会, 長崎.

鈴木孝昌, パラニサミー・ラジャグル, 小原有弘, 本間正充, 林 真, 高木篤也, 菅野純, 山口照英 (2004): GeneChipによる遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か. 第63回日本癌学会総会.

小山直己, 坂本浩子, 桜庭真弓, 小泉朋子, 桜庭真弓, 高島良生, 林真, 松藤寛, 山形一雄, 本間正充 (2004): ヒトリンパ球芽細胞株 TK6 を用いたアクリルアミドの in vitro 遺伝毒性誘発機構の解析. 日本環境変異原学会第33回大会.

欒 洋, パラニサミー・ラジャグル, 本間正充, 林真, 鈴木孝昌 (2004): ヒト細胞における遺伝毒性物質による遺伝子発現変化の解析. 日本環境変異原学会第33回大会.

本間正充, 桜庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真 (2004): ヒトゲノム中に生じた DNA2 本鎖切断の運命. 第47回日本放射線影響学会. 高島良生, 桜庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充 (2004): ヒト細胞における DNA2 本鎖切断修復の細胞周期依存性. 第47回日本放射線影響学会.

桜庭真弓, 本間正充, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真 (2004): ヒトゲノム中に生じた DNA2 本鎖切断の運命. 第27回日本分子生物学会.

Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T. and Hayashi, M. (2004): The fate of chromosomal double strand break in human cells. *Environmental*

Mutagen Society 35th Annual Meeting.

中込 泉、広野修一 (2004): PPAR α -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.

中込 泉、山乙教之、広野修一 (2004): PPAR α -リガンド複合体の構造構築と三次元定量的構造活性相関解析. 構造活性相関シンポジウム.

中込 泉、山乙教之、広野修一 (2005): PPAR α LBD 結合リガンドに対する三次元構造活性相関解析. 日本薬学会第125年会.

Hirono S., Nakagome I. and Murakami S., (2004): Estimation of the Three-Dimensional Pharmacophore of Ligand to Rat Organic Anion Transporter 3 (OAT3) by Ligand-Based Drug Design Techniques. 健康と環境科学の定量的構造活性相関に関する第11回国際ワークショップ.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

平成16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16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2000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ではない。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チャートを作成することを目的としている。

本年度は、昨年度に引き続きAMES試験について検討し、更に、ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験についても検討した。

分子量と染色体試験結果との関係に関する検討からは、末端にエポキシドを有していない分子量3000以上の化合物については概ね染色体試験結果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)の比較を、AMES試験において、Kirklandらのデータを元に検証した結果、昨年度と同様にMultiCase、DEREK、AdmeWorksの順で高い精度が見られた。

昨年度、作成した既存点検化学物質選択システム(AMES試験用)のためのフロー(図2)を、Kirklandらのデータを用いて信頼性を検証したところ、86.7%の正答率が得られ、今後、既存化学物質点検品目選定の為のフローとして使用できることが判明した。染色体試験に関しては、現在まだ開発中のシステムであり、AMES試験と比較して低い信頼性しか得られなかった。今後、開発元と綿密な連携を取りながら、早急に、精度の向上を測る必要があると考えられた。

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、平成15年に化審法改正が行われた。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、時間的にも半年以上を必要とする。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期待出来る。少なくとも、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優先物質の選定が可能となる。

本研究は、既存の SAR モデルの比較を行うと共に、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チャートを作成する。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、昨年度に引き続き AMES 試験について検討し、新たに染色体試験について検討を加えた。

B. 方法

1. 分子量と染色体試験結果との関係

染色体試験陽性結果を示した 657 化合物について、その分子量分布の検討を行った。

2. 既存の(Q)SAR モデルの比較

2.1 使用した(Q)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。

AdmeWorks 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。

2.2 DEREK のバージョンアップにおける精度変化

昨年度に用いた Ver.7 と Ver. 8.0.1 及び国立衛研が所有している AMES 試験結果からアラートを追加したモデル(Ver. NIHS)について比較検討した。

検証には、NTP やその他の文献情報から、AMES 試験結果と化学構造の一覧を Kirkland らが公表したので、その結果を用いた。

検証に用いた構造式は、Input できた 688 物質であった。

2.3 AMES 試験における各モデル間の精度比較

3 モデルの検証には、上記で用いた Kirkland の AMES 試験結果を用いた。

2.4 既存点検化学物質選択のためのフローチャート(AMES 試験)の信頼性

昨年度作成した既存点検化学物質(AMES 試験)の選択のためのフローチャート(図 1)に基づいて Kirkland のデータを INPUT し、その信頼性を検証した。