

図1 AMES試験判定フローチャート

## 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。

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。

## 2.6 倫理面への配慮

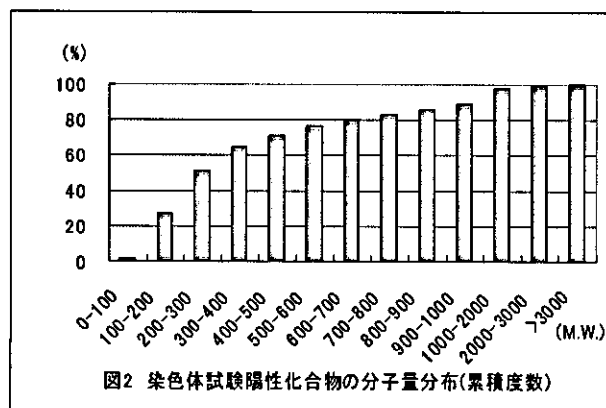
本年度の研究においては、*in vivo* およびヒト材料を扱う試験は実施していないことから、動物愛護およびヒトに対する倫理的な問題が生ずる可能性はない。

## C. 結果

### 1. 分子量と染色体試験結果との関係

染色体試験結果陽性の657化合物の分子量を累積度数を図2に示す。

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。



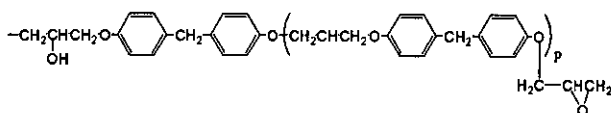
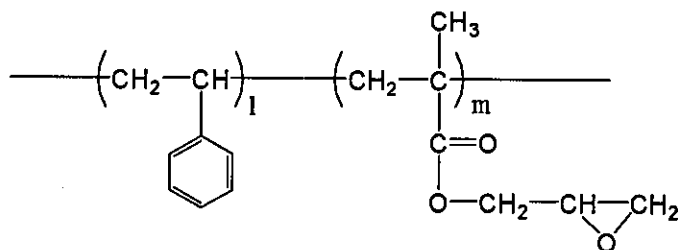
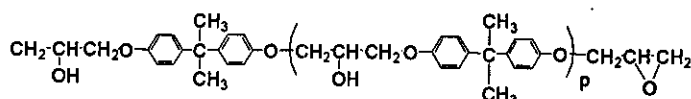
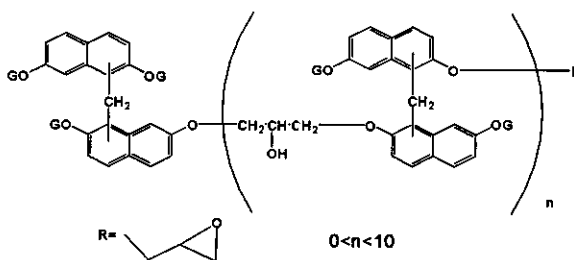
分子量3,000以上で陽性を示したのは657物質中5化合物であった。

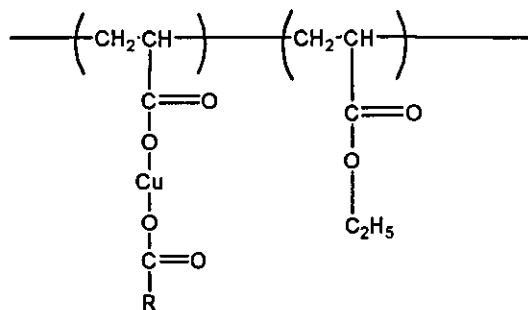
以上のことから分子量のみで染色体試験結果を予測することは出来ないが、分子量3000以上であれば概ね「陰性」と考えることが出来る。

分子量3000以上で陽性を示した5物質の内4物質の構造式に、エポキシサイドが末端に含まれていたことから、分子量3000であっても末端にエポキシ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。

この結果は昨年度のAMES試験の場合と同様である。

下記に分子量3000以上で染色体試験陽性結果を示した化合物を示す。





## 2. 既存の SAR モデルの比較

### 2.1 DEREK のバージョンアップにおける精度変化

Kirkland らのデータをもとに Ver.7、Ver.8.0.1 及び NIHS 版について精度を検証した結果、表 1～3 のようになった。

表1 Ver.7

	+	-	80.5% (Concordance)
試験結果 +	289	62	82.3% (Sensitivity)
試験結果 -	72	263	78.5% (Specificity)
Total	361	325	686

表2 Ver. 8.0.1

	+	-	80.7% (Concordance)
試験結果 +	288	64	81.8% (Sensitivity)
試験結果 -	69	267	79.5% (Specificity)
Total	357	331	688

表3 Ver. NIHS

	+	-	81.4% (Concordance)
試験結果 +	288	64	81.8% (Sensitivity)
試験結果 -	64	271	80.9% (Specificity)
Total	352	335	687

表に示すように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である一致率 (Concordances) については、その精度に上昇が見られた。

### 2.2 AMES 試験における各モデル間の精度比較

3つの SAR モデルに Kirkland らの構造式を INPUT したところ、MultiCase では、Sensitivity は 88.0%、Specificity は 97.6%、Concordance は 92.7% であった (表 4)。

表4 MultiCase

	+	-	92.7% (Concordance)
試験結果 +	235	32	88.0% (Sensitivity)
試験結果 -	6	249	97.6% (Specificity)
Total	241	281	522

AdmeWorks では、Sensitivity は 75.0%、Specificity は 55.7%、Concordance は 65.6% であった (表 5)。

表5 AdmeWorks

	+	-	65.6% (Concordance)
試験結果 +	267	89	75.0% (Sensitivity)
試験結果 -	149	187	55.7% (Specificity)
Total	416	276	692

DEREK については、表 3 に示すように Sensitivity は 81.8%、Specificity は 80.9%、Concordance は 81.4% であった。

以上の結果から、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。

### 2.3 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のためのフローチャート (AMES 試験) に基づいて Kirkland のデータを INPUT し、その信頼性を検証した結果、2つ以上陽性又は陰性を示した場合の信頼性 (表 6) は 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。

表6 AMES 試験結果の信頼性[2モデル以上同じ結果]

		SAR Models			
		++以上	--以上	86.7% (Concordance)	
試験結果	+	319	280	39	87.8% (Sensitivity)
	-	291	42	249	85.6% (Specificity)
Total		610	322	288	

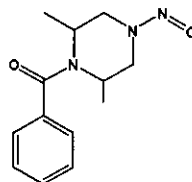
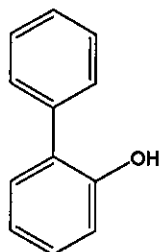


表7 AMES 試験結果の信頼性[全モデルとも同じ結果]

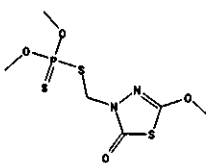
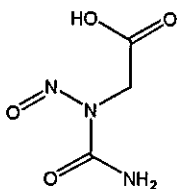
		SAR Models			
		+++	---	98.7% (Concordance)	
試験結果	+	167	166	1	99.4% (Sensitivity)
	-	130	3	127	97.7% (Specificity)
Total		297	169	128	

表7で偽陰性及び偽陽性を示した化合物の構造式を下記に示す。

試験結果「陽性」に係わらず3つとも「陰性」を示した化合物



試験結果「陰性」に係わらず3つとも「陽性」を示した化合物



### 2.3 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場合の各モデルの計算結果を表8に示す。

表8 染色体試験結果の比較

		DEREK		
		+	-	62.7% (Concordance)
試験結果	+	36	69	34.3% (Sensitivity)
	-	21	115	84.6% (Specificity)
Total		57	184	241

		MultiCase		
		+	-	61.1% (Concordance)
試験結果	+	30	59	33.7% (Sensitivity)
	-	16	88	84.6% (Specificity)
Total		46	147	193

		AdmeWorks		
		+	-	58.4% (Concordance)
試験結果	+	78	35	69.0% (Sensitivity)
	-	61	57	48.3% (Specificity)
Total		139	92	231

3つのモデルのうち、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。

しかし、Sensitivityだけを見るとAdmeWorksが69.0%と他のモデルの約2倍の値を示した。

染色体試験結果を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。

既存点検化学物質選択用AMES試験判定フローチャートと同様に、染色体試験結果について、3つのSARモデルを組み合わせた場合の信頼性を



## 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、その安全性情報がえ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 等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、昨年度は AMES 試験について作成し、今年度は染色体試験について検討した。

まず、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と推測された。

本研究では、(Q)SAR の精度向上の為に、モデル開発元と情報交換や資料の提供を行っている。

DEREK は他の毒性予測プログラムの様に、統計解析的な手法を用いた定量的毒性予測ではなく、多くの既知知見から得られた部分構造毒性相関の経験則を定義した知識ベースにより、定性的毒性予測を行うシステムであり、最新 Ver. である Ver.8.0.1 には予測結果の根拠である毒性 Alert が 317 種収録されている。Ver. NIHS 版では、本研究班の助言により Ver.8.0.1 の Alert の改善と新しい Alert の追加が行われた(資料 2)。

Ver.7 と Ver.8.0.1 及び Ver.NIHS 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システム(AMES 試験)のためのフローチャート(図 1)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、予測す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。

AMES 試験を除く遺伝子毒性試験に関する(Q)SAR 関係の文献を収集したので、今後のモデル改良の資料とした。

<こうじ菌>Parry ら(1996)は、構造的に関連した一連のハロゲン化炭化水素による偽巢性こうじ菌染色体分離異常の分析を行い、定量的構造活性相関モデルを発展させた。

<酵母菌>Liu ら(1997)は、酵母菌で染色体異常を誘発する 93 化学物質を MultiCASE で分析した。

染色体分離異常といくつかの毒性現象（細胞毒性、*in vitro*での姉妹染色分体交換の誘導、齧歯目の発達毒性など）で構造的類似がみられ、また、全身毒性、*in vivo*での小核の誘導、ヒトの発達毒性との類似もみられた。SARモデルの予測精度は比較的低い、それは現在のデータベースに由来すると考えられた。

<細胞毒性>Erikssonら(1994)は、定量的構造活性相関を用いて、ヒトのヒーラ細胞におけるハロゲン化脂肪族炭化水素の細胞毒性IC50（50%細胞生存度を低下させる抑制濃度）を評価した。

<細胞毒性>Remers(1996)は、乳ガンや他の治療抵抗性腫瘍に対して活性のある、心毒性の低い新しい成分を発見するため、類似化合物の設計と合成には広範なデータベースを用い、量的構造活性相関、分子モデリング等を使用して調査を行った。

<細胞毒性>Mazerskaら(1996)は、抗腫瘍性の5-alkylaminoimidazoacridinone誘導体の生物活性と物理化学的特性の定量的関係を研究した。定量的構造活性相関による研究では、8ヒドロキシ類似体の場合のみimidazoacridinonesの親油性が細胞毒性に有意に影響を与えたが、その他の誘導体の活性はとても低く、親油性に依存しないことを示した。

<細胞毒性>Yang(1998)は、機構的毒性学、変異原性と発がん性に関連のある分子・細胞生物学などの概念を取り込んで定量的構造活性相関のモデリングを発展させた。

<細胞毒性・小核試験>Tafazoliら(1998)は、小核試験とアルカリ単細胞ゲル電気泳動分析を用い、5つの塩素化炭化水素（四塩化炭素、六塩化エタン、1,2-ジクロロエタン、1-クロロヘキサン、2,3-ジクロロブタン）の変異原性（小核構造）、遺伝毒性（DNA切断量）と細胞毒性（細胞増殖減少）の可能性をヒト・リンパ球で評価し、それらのデータを定量的構造活性相関のモデリングに取り入れた。

<細胞毒性>Kamanoら(1998)は、ヒキガエルの毒であるブファジェノリドの原発性肝癌細胞PLC/PRF/5への細胞毒性について Comparative

Molecular Field Analysis (CoMFA)を行い、3D構造活性相関に取り込み、ブファジェノリド類似体の新薬デザインのために使用される可能性をもたらした。

<細胞毒性>Sergedieneら(1999)は、ヒト前骨髄球白血病細胞HL-60に対するポリフェノール抗酸化剤の酸化促進剤の毒性について、定量的構造活性相関を用いて記述をおこなった。

<細胞毒性>Hanschら(2000)は、石炭酸と14のフェノール類のWBラット肝細胞の上皮細胞膜への障害力を試験し、QSARのための回帰式を開発した。疎水性とフェノキシ遊離基の形成による非特異的毒性とフェノール類の細胞毒性の機構を分けて考えることが重要であることを示した。

<細胞毒性>Breierら(2000)は、L1210/VCR-1 L1210/VCR-2抵抗性細胞系において、15の細胞毒性作用物質（薬）の構造とそれらの細胞毒性の関係を調査した。

<細胞毒性>Etzenhouserら(2001)は、近年合成されたカフェイン酸とジヒドロカフェイン酸の10種類のエステルのL1210白血病細胞と培養MCF-7乳癌細胞に対する細胞毒性評価し、定量的構造活性相関に取り入れて比較検討を行った。

<細胞毒性>Dallavalleら(2001)は、*in vitro*および*in vivo*で抗腫瘍活性のあるカンプトテシンの7-oxyiminomethyl誘導体において、親油性が細胞毒性との相関の主要要素であることを定量的構造活性相関解析により明らかにした。

<細胞毒性>Skiboら(2001)は、多数のaziridinylnキノンのDT-ジアホラーゼ基質活性、DNA還元的アルキル化、細胞分裂阻止活性/細胞毒性活性と*in vivo*での活性を調査し、定量的構造活性相関においてはDT-ジアホラーゼと細胞毒性の相関について考察を行った。

<細胞毒性>Chacon-GarciaとMartinez(2001)は、N,N'-diarylalkanediamidesの細胞毒性活性についてQSARを用いて考察を行った。

<細胞毒性>Samuelら(2002)は、Dibenzyltin(IV)dichlorideとdibenzyltin(IV)diisothiocyanate誘導剤がヒトがん細胞

胞系に対する細胞毒性活性を示ることを明らかにし、それらを類似の dialkyltin (IV)誘導体と比較した。また、有機スズ誘導体のための CoMFA モデルを細胞毒性活性を用いて初めて構築した。

<細胞毒性>Moridani ら(2002)は、分離したラット肝細胞の 2 時間後の 50%細胞生存量の濃度 (logLD50) とオクタノール/水分配 (logP) と酸化還元電 (E (p/2) ) を用いて、22 のポリフェノールの細胞毒性に関する定量的構造活性相関のための等式を求めた。ヒーラ細胞でも 13 のポリフェノールの腫瘍増殖抑制効果に関する定量的構造活性相関のための等式が得た。ポリフェノールの細胞毒性を決定している主要特性として、親油性と E (p/2) が重要な役割を果たすことを明らかにした。

<細胞毒性>Verma ら(2003)は、急成長中のマウス白血病細胞に対する一連の X-thiophenols の細胞毒性を決定し、ID(50)を量的構造活性相関の数式化のために使用した。

#### E. 参考文献

- Breier A, Drobna Z, Docolomansky P, Barancik M (2000) Cytotoxic activity of several unrelated drugs on L1210 mouse leukemic cell sublines with P-glycoprotein (PGP) mediated multidrug resistance (MDR) phenotype. A QSAR study. *Neoplasma*, 47, ISS 2, 100-6
- Chacon-Garcia L and Martinez R (2001) Cytotoxic activity and QSAR of N,N'-diarylalkanediamides. *Eur J Med Chem*, 36, ISS 9, 731-6
- Dallavalle S, Ferrari A, Biasotti B, Merlini L, Penco S, Gallo G, Marzi M, Tinti MO, Martinelli R, Pisano C, Carminati P, Carenini N, Beretta G, Perego P, De Cesare M, Pratesi G, Zunino F (2001) Novel 7-oxyiminomethyl derivatives of camptothecin with potent in vitro and in vivo antitumor activity. *J Med Chem*, 44, ISS 20, 3264-74
- Eriksson L, Sandstroem BE, Sjoestroem M, Tysklind M, Wold S (1994) Modelling the Cytotoxicity of Halogenated Aliphatic Hydrocarbons. Quantitative Structure-Activity Relationships for the IC50 to Human HeLa Cells. Govt Reports Announcements & Index (GRA&I), Issue 05, 1994
- Etzenhouser B, Hansch C, Kapur S, Selassie CD (2001) Mechanism of toxicity of esters of caffeic and dihydrocaffeic acids. *Bioorg Med Chem*, 9, ISS 1, 199-209
- Hansch C, McKarns SC, Smith CJ, Doolittle DJ (2000) Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem Biol Interact*, 127, ISS 1, 61-72
- Kamano Y, Kotake A, Hashima H, Inoue M, Morita H, Takeya K, Itokawa H, Nandachi N, Segawa T, Yukita A, Saitou K, Katsuyama M, Pettit GR (1998) Structure-cytotoxic activity relationship for the toad poison bufadienolides. *Bioorg Med Chem*; VOL 6, ISS 7, 1103-15
- Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L. and Müller, L.: Evaluation of the ability of a battery of 3 in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I. Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutat. Res.* (in press)
- Liu M, Grant SG, Macina OT, Klopman G, Rosenkranz HS (1997) Structural and mechanistic bases for the induction of mitotic chromosomal loss and duplication ('malsegregation') in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: relevance to human carcinogenesis and developmental toxicology. *Mutat Res* 21, 374(2):209-31
- Mazarska Z, Augustin E, Dziegielewski J, Cholody MW, Konopa J (1996) QSAR of acridines, III. Structure-activity relationship for antitumour

- imidazoacridinones and intercorrelations between in vivo and in vitro tests. *Anticancer Drug Des*, 11, ISS 1, 73-88
- Moridani MY, Galati G, O'Brien PJ (2002) Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. *Chem Biol Interact*, 139, ISS 3, 251-64
- Parry JM, Parry EM, Bourner R, Doherty A, Ellard S, O'Donovan J, Hoebee B, de Stoppelaar JM, Mohn GR, Onfelt A, Renglin A, Schultz N, Soderpalm-Berndes C, Jensen KG, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Van Hummelen P, Degrassi F, Antoccia A, Cimini D, Izzo M, Tanzarella C, Adler ID, Kliesch U, Hess P, et al. (1996) The detection and evaluation of aneugenic chemicals. *Mutat Res* 12, 353(1-2):11-46
- Remers WA (1996) Design of DNA binding agents for breast cancer. *Crisp Data Base National Institutes of Health*
- Samuel PM, de Vos D, Raveendra D, Sarma JA, Roy S (2002) 3-D QSAR studies on new dibenzyltin(IV) anticancer agents by comparative molecular field analysis (CoMFA). *Bioorg Med Chem Lett*, 12, ISS 1, 61-4
- Sergediene E, Jansson K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Rietjens IM, Cenas N (1999) Prooxidant toxicity of polyphenolic antioxidants to HL-60 cells: description of quantitative structure-activity relationships. *FEBS Lett*, 462, ISS 3, 392-6
- Skibo EB, Xing C, Dorr RT (2001) Aziridinyl quinone antitumor agents based on indoles and cyclopent[b]indoles: structure-activity relationships for cytotoxicity and antitumor activity. *J Med Chem*, 44, ISS 22, 3545-62
- Tafazoli M, Baeten A, Geerlings P, Kirsch-Volders M (1998) In vitro mutagenicity and genotoxicity study of a number of short-chain chlorinated hydrocarbons using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (Comet assay) in human lymphocytes: a structure-activity relationship (QSAR) analysis of the genotoxic and cytotoxic potential. *Mutagenesis*, 13(2):115-26
- Verma RP, Kapur S, Barberena O, Shusterman A, Hansch CH, Selassie CD (2003) Synthesis, cytotoxicity, and QSAR analysis of X-thiophenols in rapidly dividing cells. *Chem Res Toxicol*, 16, ISS 3, 276-84
- Yang RS (1998) Developing a predictive strategy for chemical mixtures. *Crisp Data Base National Institutes of Health*

#### F. 結 論

分子量と染色体試験結果との関係についての検討からは、末端にエポキサイドを有していない分子量 3000 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システム(AMES 試験用)のためのフロー(図 2)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、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)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として使用できることが判明した。

染色体試験に関して、現在、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。



G. 健康危険情報

特になし

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

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

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

研究要旨： 化学物質の毒性予測手法開発のモデル化合物としてフッ素化合物を用い、構造活性相関の解明を進めた。本研究は2部より構成される。第1に、肝毒性が明らかな、あるいは疑われる化合物についてPPAR (Peroxisome Proliferator-activated Receptor)結合活性を特異的な遺伝子発現を指標としてレポーターアッセイ等を活用して解析した。試験化合物の多くにPPAR  $\alpha$ リガンド活性のあることが確認できた。今回解析した代表的な肝毒性を発現する化合物について、構造からの解析と毒性データ、リガンド活性など、さらに詳細に検討することが重要である。第2に、フッ素化合物の毒性発現に関係する構造情報を抽出するために、毒性試験の結果の情報が得られた化合物について、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が、本年度はその結果に基づき、ニューラルネットワークに準拠した定量的構造活性相関の解析を行った。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。

① 高フッ素化合物等のPPAR 結合活性解析

(明治薬科大学本島清人教授との共同研究)

A. 研究目的

肝毒性を示す少なからぬ化合物が、その毒性発現の機構を肝臓での脂質代謝を攪乱することによっていることが予想される。そのため、肝臓における脂質代謝の中心的な調節因子であるペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 (PPAR, Peroxisome Proliferator-activated Receptor) のリガンド活性 (アゴニストあるいはアンタゴニストとしての活性) を指標に、試験化合物の毒性を評価する系の検討を進めている。昨年度は、モデル化合物を用いて、直接あるいは間接的な PPAR リガンド活性測定方法を確立した。今年度は、主として培養細胞を用いた測定法によって、試験フッ素化合物のリガンド活性を測定した。また、リガンド活性と肝毒性との対応を構造活性相関の観点から考察するための基礎データを得るために、肝毒性が明らかとなっている代表的な化合物について、PPAR リガンド活性を測定した。

B. 研究方法

試験化合物の PPAR のリガンド活性を測定する方法として、昨年度検討した4つの方法、すなわち、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、1. マウス個体を用いた解析、2. 培養細胞を用いた解析、3. レポーター遺伝子を用いた PPAR transactivation 解析、4. PPAR リガンド結合部位への結合活性解析、のうち、3のレポーターアッセイによる測定を中心に解析を進めた。概略は以下のとおりである。

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。

### C. 研究結果

#### 1. フッ素化合物

5 種類 の 化 合 物 、 PFHA-C6, PFOA-C8, PFNA-C10, PFDA-C12, PFOS について測定した。まとめを図表 1-a に、測定例を図表 1-b に示す。図表中の Wy は PPAR $\alpha$  のリガンドでポジティブコントロール、Troglitazone は PPAR $\gamma$  のリガンド GW は  $\delta$  のリガンドで、ともにネガティブコントロールを示し、この測定が PPAR $\alpha$  特異的な測定系であることを示す。

#### 2. 肝毒性が明らかとなっている代表的な化合物

毒性が疑われる物質も含め、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-Ethyl 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

図表 1-c と 1-d に示すように、9 種類の化合物の PPAR $\alpha$  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る。

1. まったくない：3、8
2. 弱い活性がある：7
3. 強い活性がある：2
4. 強そうだが細胞毒性がある：1、4、5、6、9

なお、ここでの細胞毒性は、高濃度暴露によって細胞がディッシュから剥がれたことを指すが、その

形態は化合物によって異なっていた。PPAR $\alpha$  以外の作用点も関与しているものと思われる。

### D. 考察

レポーターアッセイによって、試験化合物の多くに PPAR $\alpha$  リガンド活性のあることが確認できた。比較的簡便に定量的な値を得ることができるアッセイであるが、すべての化合物についてこの活性がそのまま肝毒性の指標になることは考えられない。PPAR $\alpha$  が毒性発現に関わっている化合物と、そうでない化合物を区別することが必要である。化合物の構造からリガンドとなり得るか否かの判断をできるようにする必要がある。また、その予想の妥当性については、PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスを用いて、明確にしておくことが必要である。今回解析した代表的な肝毒性を発現する化合物について、構造からの解析と毒性データ、リガンド活性など、さらに詳細に検討することが重要である。

#### ② 毒性既知のフッ素化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) (研究協力者； 国立環境研究所・小松英司 NIES フェロー)

##### A. 研究目的

前年度行ったフッ素化化合物の毒性発現について、毒性値を予測する QSAR のアルゴリズムの改良を行った。すでに 28 日間反復投与試験の結果の情報が得られている化学物質について、電子的因子、立体因子を説明するパラメータを用いて化合物を自己組織化マップによってクラスター分類した。各々の分類した化合物群について、ニューラルネットワーク法を用いて定量的構造活性相関の解析を行った。

##### B. 研究方法と研究結果

###### i) フッ素化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（前年度報告書図表 2-1 参照）。

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 *Kow*、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。

クラスター解析をした結果は前年度報告書図表 2-1 に示した通りであるが、SOM マップを図表 2-a に示す。34 個のフッ素化化合物は 10 クラスターに分類された。

クラスター 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クラスターが分離して存在している。クラスター 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、クラスター 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、どのクラスター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) ニューラルネットワークによる QSAR

前年度では、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化合物の NOEL の定量的構造活性相関について検討を行った。

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（図表 2-b）。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 に対する寄与率を図表 2-b に示す。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。

予測結果を図表 2-c に示す。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<sub>3</sub> 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。

### C. 結論

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。

### D. 課題

今後、QSAR 式を作ることが出来ないクラスについて類縁体の化合物の例数を増やし、どのような因子が影響しているか検証し、そのクラスターの作用機序を推定する必要がある。さらに、*in vitro* アッセイの結果等の対比により、生体内での化合物—受容体相互作用を明らかにすることが重要である。QSAR 式にその相互作用による反応の遷移状態を説明できる記述子を見出せることが可能であれば、クラスター分類せずにすべての化合物に適合できるグローバルな QSAR 式を構築することが出来ると考えられる。また、それらの情報を基に毒性メカニズムを推定することにつながると考えられる。

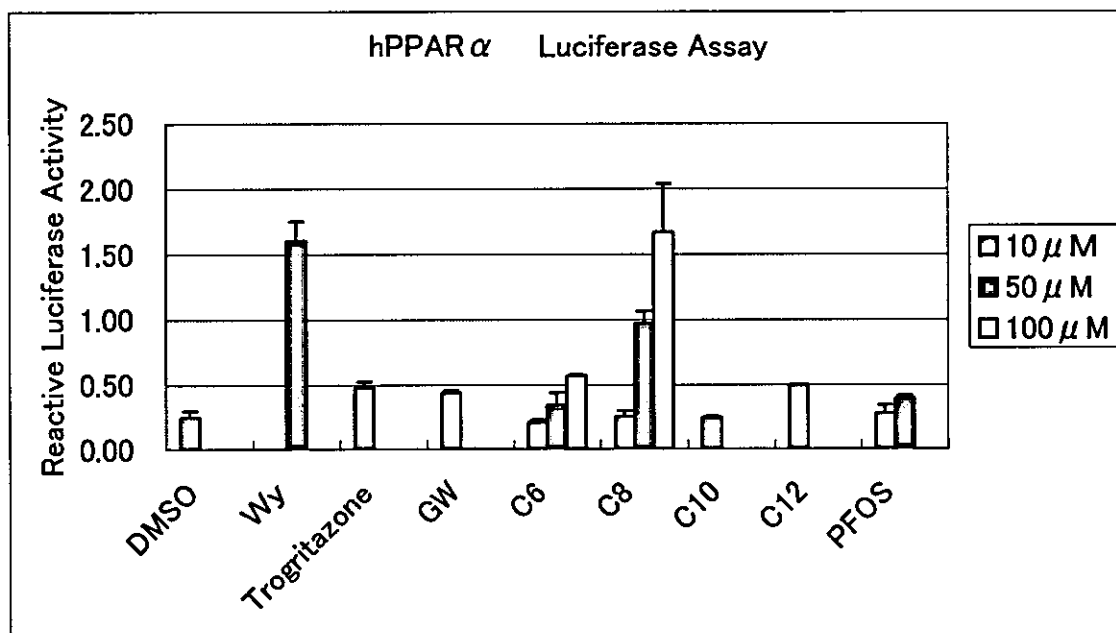
### E. 健康危険情報

特になし

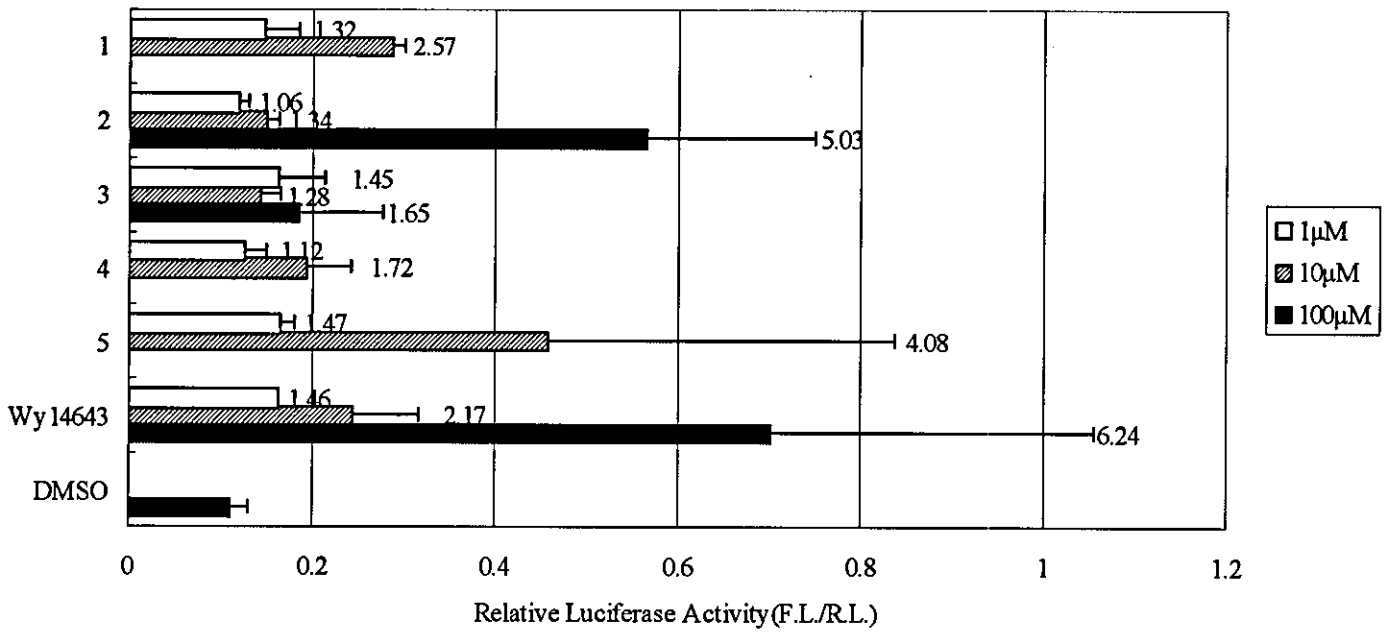
図表 1-a フッ素化合物のヒト PPAR リガンド活性

リガンド薬物	C6			C8			C10			C12			PFOS		
$\mu\text{M}$	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100	10	50	100
$\alpha$	-	-	-	-	+	+++	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性	-	-	毒性
$\delta$	-	-	-	-	-	-	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性
$\gamma$	-	-	-	-	-	+	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性	-	毒性	毒性

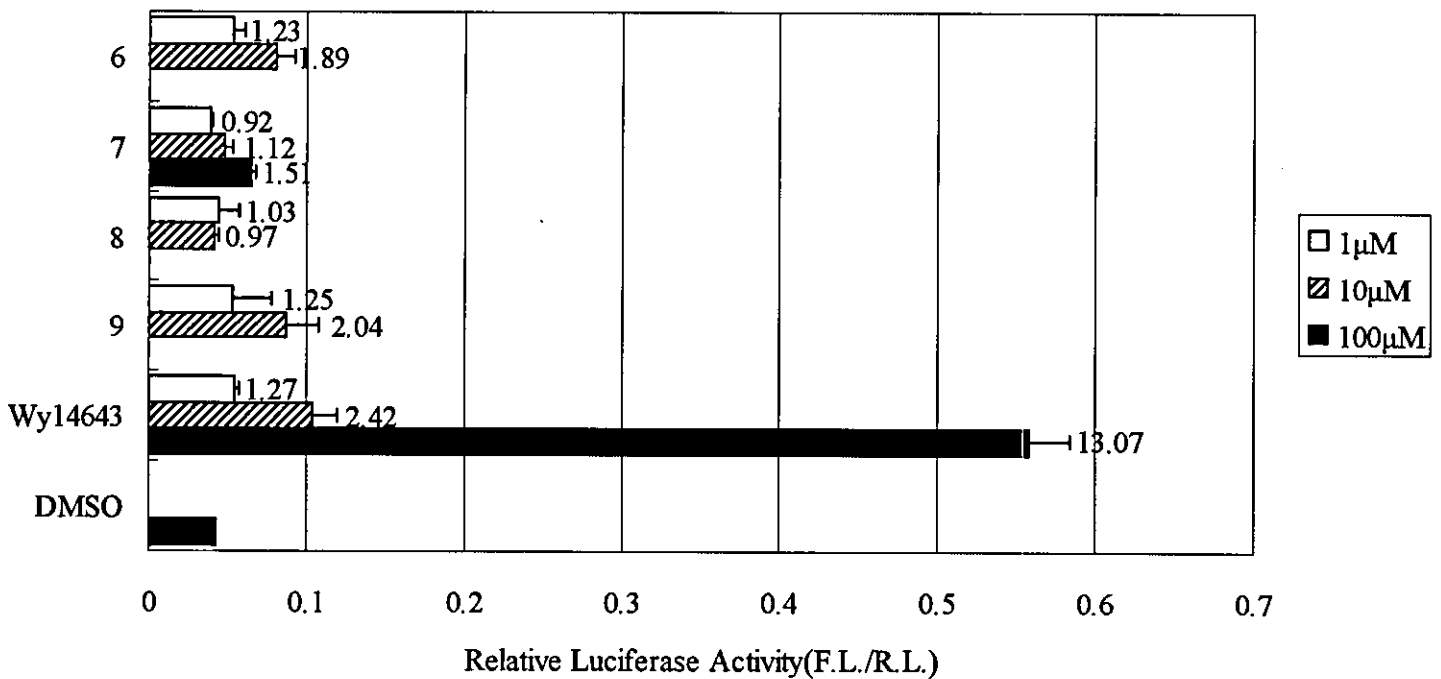
図表 1-b



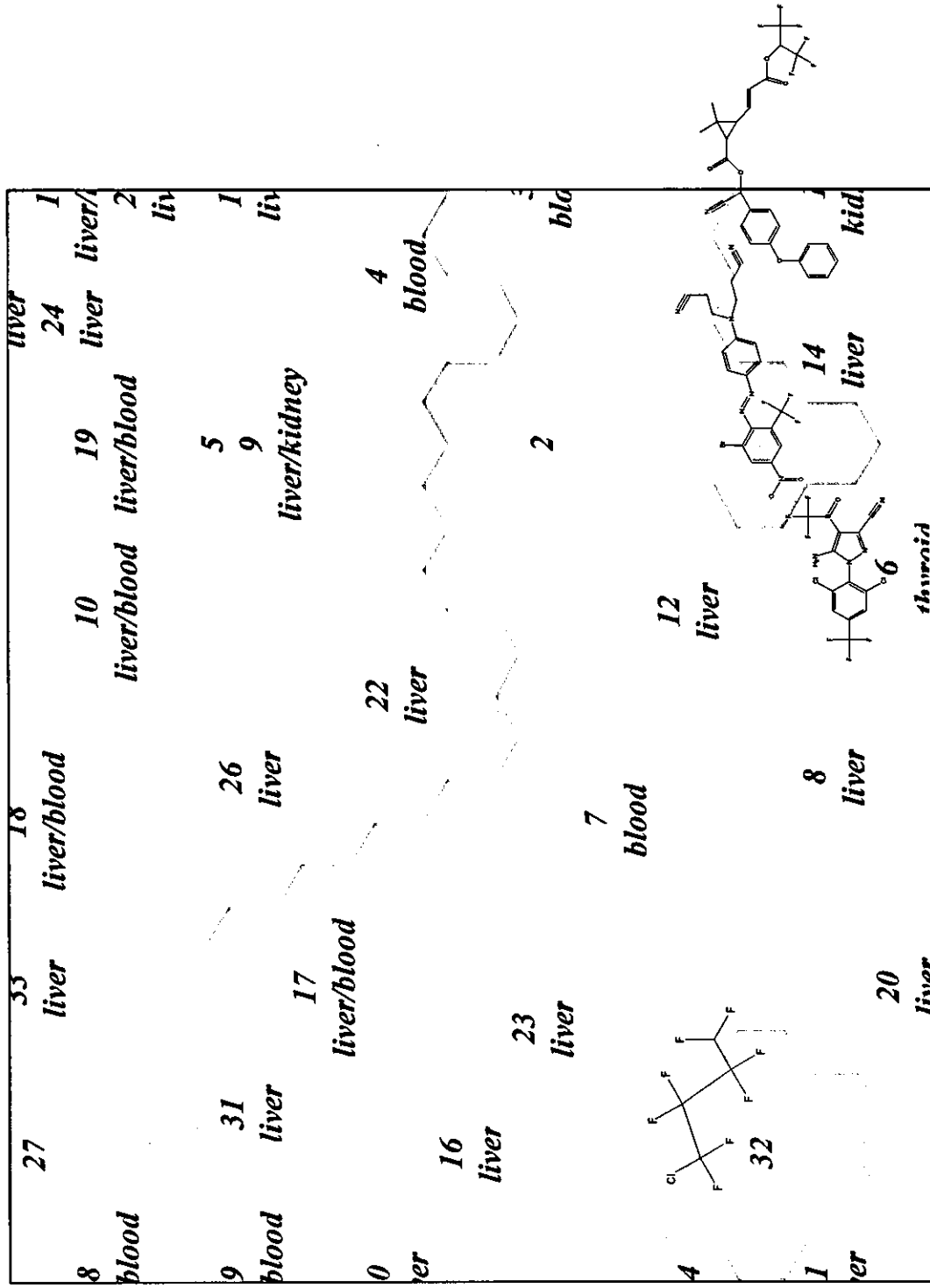
图表 1-c



图表 1-d



図表 2-a フッ素化合物の分類結果

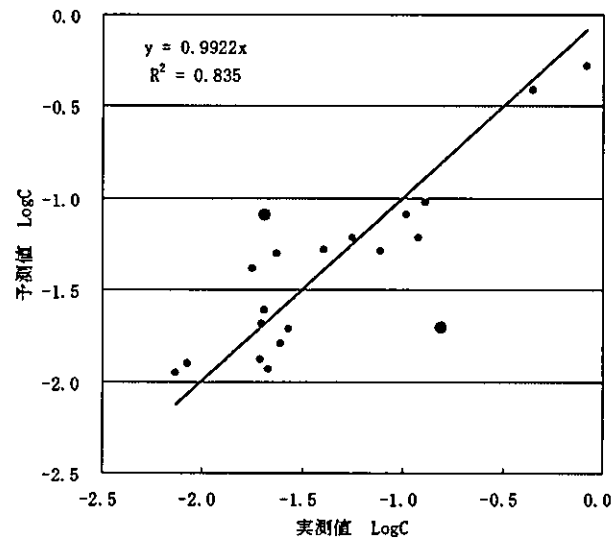




図表2-b 重回帰の各係数の寄与度の比較

記述子	クラスター1	クラスター2
LUMO	1.67	1.20
HOMO	0.81	3.14
Dipole	0.57	1.31
VDW	0.64	0.48
MolWeight	0.35	4.51
Kow	0.59	2.45
母数	12	9
相関係数	0.78	0.80

図表 2-c ニューラルネットワークによる予測結果



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

毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究

分担研究者 広野 修一 北里大学・薬学部・教授

研究要旨

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) のサブタイプである PPAR $\alpha$ は、肝臓における脂肪酸の代謝や中性脂質の代謝に関連する遺伝子の発現を制御している。PPAR $\alpha$ を強く活性化する化合物は高脂血症の治療薬となり得るが、一方プラスチック可塑剤、農薬などが齧歯類の実験において、PPAR $\alpha$ を介して酵素誘導、肝臓 DNA 合成、肝臓肥大、肝臓ガンの誘発などの影響を及ぼすことが知られている。従って PPAR $\alpha$ とリガンドの結合に関する情報は抗高脂血症薬の開発にとっても、化学物質の毒性予測にとっても有用である。そこで、新規リガンドの活性予測を行うための 3D-QSAR モデルを作成する事を目的としてヒト PPAR $\alpha$ 結合活性が既知のリガンドを用いて、ヒト PPAR $\alpha$ への結合に関する三次元定量的構造活性相関解析を行った。昨年度は、12 個の PPAR $\alpha$ リガンドを用いて解析したが、今年度は、より良い QSAR モデルを得るために化合物を追加し、手法を変えて解析を行った。

A. 研究目的

ヒト PPAR $\alpha$ のリガンド結合ドメイン(LBD)と PPAR $\alpha$ アゴニストである GW409544 の複合体の立体構造情報と PPAR $\alpha$ 結合活性が既知のリガンドを使って、新規リガンドの活性予測に用いるための 3D-QSAR モデルを作成する事を目的とした。

B. 研究方法

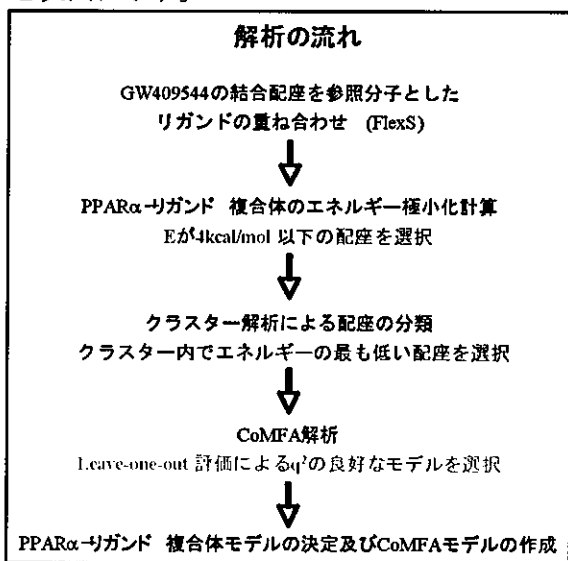
PPAR $\alpha$ の LBD と GW409544 の複合体の X 線結晶解析実験による立体構造 (PDB code:1K7L) から得られる GW409544 の結合コンフォメーションを基に、リガンド重ね合わせプログラム、FlexS(SYBYL)を用いて、PPAR $\alpha$ 活性が既知の 19 個の化合物 (次表参照) の結合配座候補を抽出した。

これらの配座から PPAR $\alpha$  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。そして、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

化合物	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	-log(EC <sub>50</sub> )	ClogP
GW409544	0.002	8.70	5.63
compound(3)	0.004	8.40	8.59
LY-510929	0.009	8.05	5.96
compound(2)	0.013	7.89	4.93
GW9578	0.050	7.30	7.04
LY-465608	0.150	6.82	6.25
GW2433	0.170	6.77	7.57
Muraglitazar	0.240	6.62	4.85
compound(1)	0.360	6.44	5.69
GI262570	0.450	6.35	6.42
tesaglitazar	1.700	5.77	3.21
JTT-501 metabolite	1.900	5.72	2.48
ragaglitazar	3.200	5.49	6.10
GW7845	3.500	5.46	5.85
Wy-14643	5.000	5.30	3.24
L-165041	10.000	5.00	5.05
fenofibrate metabolite	30.000	4.52	4.50
bezafibrate	50.000	4.30	4.14
clofibrate metabolite	55.000	4.26	3.26

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。



(倫理面への配慮)

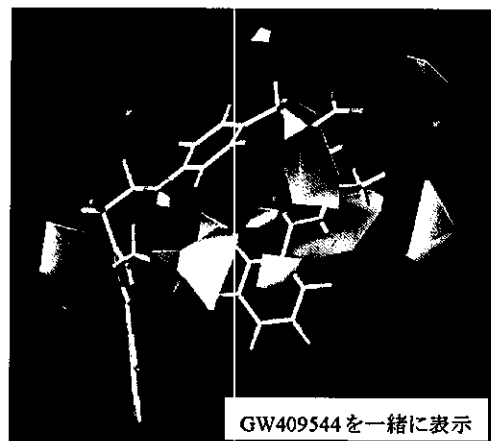
既存の X 線結晶解析データを用い、コンピュータによる解析を行うため、倫理的に問題となるようなことはない。

### C. 研究結果

PPAR $\alpha$ 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 $\alpha$  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)。

Cross-validated			Conventional					
$q^2$	Sp <sub>press</sub>	最適成分数	$r^2$	F	s	寄与率(%)		
						ST	EL	ClogP
0.54	1.05	4	0.99	301.0	0.2	54.5	27.7	17.9

CoMFA 解析の結果 ST : 立体相互作用 EL : 静電相互作用



緑: 立体的に嵩高い置換基があると結合親和性が上がる領域  
黄: 立体的に嵩高い置換基があると結合親和性が下がる領域  
青: 正の電荷を持つ置換基があると結合親和性が上がる領域  
赤: 負の電荷を持つ置換基があると結合親和性が上がる領域



### D. 考察

PPAR $\alpha$ リガンドと PPAR $\alpha$ の LBD との複合体モデルから得られた、PPAR $\alpha$ との結合に関する 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

PPAR $\alpha$  活性既知の19個の化合物に対して PPAR $\alpha$  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。

#### F. 健康危機情報

特になし