

200501160A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 林 真

平成18(2006)年3月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

平成 18 年 4 月 7 日

厚生労働大臣 川崎 二郎 殿

住 所 〒243-0431 神奈川県海老名市
上今泉4-23-3-1

研究者 氏名 林 真 
(所属機関 国立医薬品食品衛生研究所)

平成 17 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)に係る研究事業を完了したので次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 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
(H15-化学-003)

国庫補助金精算所要額 : 金 50,000,000 円也(うち間接経費 0 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
なし
7. 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

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17年度 総括研究報告書

主任研究者 林 真

平成18（2006）年3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 _____	34
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 _____	67
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 _____	83
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 _____	89
山添 康	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表(別紙4) _____	101
--------------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別冊 _____	105
-----------------------	-----

平成 17 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17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。

本年度は、共同研究を行っているDEREKのバージョンアップに伴う精度の向上を、AMES試験モデルを用いて検証した結果、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、その精度の向上が見られた。染色体試験用モデルについては、昨年度に引き続き精度向上を行い、その精度を比較した結果、昨年度より向上が見られたことより、既存化学物質選択用フローチャート(染色体用)の信頼性を検討した。2つ以上同じ結果で判定するフローチャートを使用した場合でもConcordanceは76.6%を示していることから、通常の判定にはこのフローチャートの使用は可能であるが、更なる各モデルの精度向上は必須である。染色体試験の(Q)SARモデルの精度向上のために、化合物生物活性リーズニングソフト(ClassPharmer)を使用してToxicophoreの抽出を行い、全29個のToxicophoreが抽出された。また、反復投与試験における各種毒性指標におけるToxicophoreの抽出も行ったが、化合物数が少なかったため、活性分布形状から解析することやClass Model構築やSARルールの抽出が困難であった。AMES試験において文献上の結果と*in Silico*での結果で齟齬が見られた化学物質について、再実験を行った。試験結果と*in Silico*結果で齟齬が見られた

化合物については、今後、これらの化合物情報から新しい Alert 作製を行い、(Q)SAR モデルの精度向上の一助とした。

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しては、肝毒性が明らかな、あるいは疑われるフッ素化合物およびフタル酸エステル類について、Peroxisome Proliferator - activated Receptor (PPAR) 結合活性をレポーターアッセイ等の手法を活用して測定したところ、PPAR α リガンド活性のあることが確認でき、肝毒性による個体への影響と PPAR 活性とは相関が高いことが確かめられた。また、PPAR 依存的な肝毒性発現の分子的基盤を明らかにするための検討を行ったところ、各種化学物質の毒性発現の機構には、核内受容体の活性化に加えて、直接的あるいは間接的な阻害による場合がありうることを、核内受容体 PPAR α について示唆する結果を得た。

毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究では、ヒト PPAR α 結合活性が既知のリガンドを用いて 3D-QSAR モデルを作成し、このモデルを使って、肝毒性を示す化合物の PPAR α に対する活性予測を行った。さらにこれらの化合物が代謝されて生成される化合物に対しても PPAR α の活性予測を行った結果、PPAR α に対する活性実験と比較したところ、活性の大きさをほぼ正しく予測できることが判明し、新規リガンドの PPAR α 結合活性を予測することができる 3D-QSAR モデルが構築できたと考えられた。

化学物質の代謝活性化の予測モデルに関しては、環境物質、農薬、医薬品などの体内動態に係わる薬物代謝酵素の基質特異性について調べ、構造活性相関の観点から解析してヒト CYP1A2 の基質特異性と代謝反応部位を予測する手法を開発した。

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
森田 健 国立医薬品食品衛生研究所
安全情報部 主任研究官

秋山浩子 (株)シーティシー・ラボラトリー
ステムズ
中嶋 圓 (財)食品農医薬品安全性評価センター
益森 勝志 (財)食品農医薬品安全性評価センター

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。

B. 分担研究報告

●既存の構造活性相関モデルの比較に関する研究

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

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

森田 健 国立医薬品食品衛生研究所
安全情報部 主任研究官

秋山浩子 (株)シーティシー・ラボラトリー
システムズ

益森 勝志 (財)食品農医薬品安全性評価センター

中嶋 圓 (財)食品農医薬品安全性評価センター

1. DEREKのバージョンアップにおける信頼性の変化

1.1. 方法

既存(Q)SARモデルのDEREKに対しては、その開発元と共同研究を行っている。その成果を検討するために、昨年度に用いた Ver. 7 及び Ver. 8.01、Ver. 9.00 についてその精度を比較検討した。

1.2. 結果及び考察

結果を表1～3に示す。

表1 DEREK Ver.7.00 の信頼性

		Ver.7.00			
		+	-		
試験結果	+	32	21	11	65.6% (Sensitivity)
	-	200	22	178	89.0% (Specificity)
		232	43	189	85.8% (Concordance)

表2 DEREK Ver.8.01 の信頼性

		Ver.8.01			
		+	-		
試験結果	+	32	21	11	65.6% (Sensitivity)
	-	200	21	179	89.5% (Specificity)
		232	42	190	86.2% (Concordance)

表 3 DEREK Ver.9.00 の信頼性

		Ver.9.00			
		+	-		
試験結果	+	32	21	11	65.6% (Sensitivity)
	-	200	14	186	93.0% (Specificity)
		232	35	197	89.2% (Concordance)

Ver.7 の AMES に関する Alert 数は 74、Ver.8 は 75 であったが、Ver.9 は本研究班の提言による Alert が追加され 79 となった。表が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)には変化が見られなかったが、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、その精度の向上が見られた。今後は Sensitivity の向上のために、試験結果陽性で計算結果陰性 [偽陰性]の 11 化合物の Alert を特定し、開発元の LHASA 社と協同で DEREK の改良を行う事とした。

2. 染色体試験における(Q)SAR モデルの比較

2.1. 方法

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 (AdmeWorks) の計 3 モデルについて検証を行った。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 219 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。

2.2. 結果及び考察

既存化学物質安全性点検事業で実施された 219 物質について、DEREK、MultiCase (MCASE)、AdmeWorks (AWorks)の結果を表 4～6 に示す。

表 4 染色体試験結果(DEREK)の信頼性

		DEREK			
		+	-		
試験結果	+	94	60	34	63.8% (Sensitivity)
	-	115	29	86	74.8% (Specificity)
		209	89	120	69.9% (Concordance)

表 5 染色体試験結果(MCase)の信頼性

		Mcase			
		+	-		
試験結果	+	85	55	30	64.7% (Sensitivity)
	-	92	10	82	89.1% (Specificity)
		177	65	112	77.4% (Concordance)

表 6 染色体試験結果(AWorks)の信頼性

		Aworks			
		+	-		
試験結果	+	98	71	27	72.4% (Sensitivity)
	-	115	46	69	60.0% (Specificity)
		213	117	96	65.7% (Concordance)

DEREK については、陽性を陽性と評価する Sensitivity では 63.8%、陰性を陰性と評価する Specificity では 74.8%、全体的一致率 Concordance では 69.9%であった。MCASE では、Sensitivity が 64.7%、Specificity が 89.1%、Concordance が 77.4%であった。AWorks では、Sensitivity が 72.4%、Specificity が 60.0%、Concordance が 65.7%であった。以上の結果から陽性結果を正しく示すモデルは AWorks、MCASE、DEREK の順であるが、陰性を正しく示すモデルは MCASE、DEREK、AWorks の順であり、陰性陽性の両方の正解率を示すモデルの順も同様であった。

Concordance を昨年度と比較すると、DEREK では 62.7%が 69.9%に、MCASE は 61.1%が 77.4%に、AWorks では 58.4%が 65.7%に上昇し、精度の向上が見られたが、更なる改良が必要と思われる。

3. 既存点検化学物質選択のためのフローチャート (染色体試験)の信頼性

3.1. 方法

昨年度作成した染色体試験判定フローチャート(図1)に基づいて既存化学物質のデータをINPUTし、フローチャートの信頼性を検証した。

3.2. 結果及び考察

既存化学物質点検事業で得られた染色体試験結果を INPUT し、その信頼性を検証したところ、3つ以上陽性又は陰性を示した場合の結果を表7に、2つとも試験結果と同じ結果を示した場合の信頼性を表8に示す。

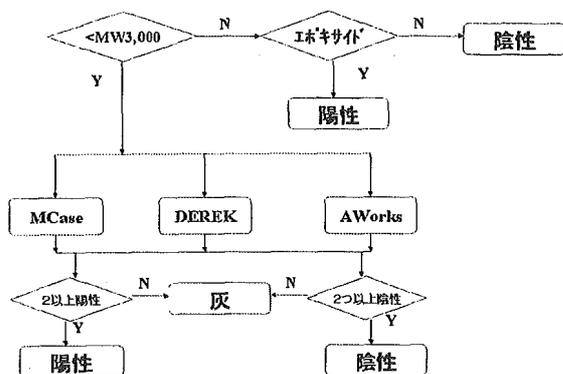


図1 AMES試験判定フローチャート

表7 全モデルが陽性又は陰性の場合

		+	-		
試験結果	+	35	31	4	88.6% (Sensitivity)
	-	44	3	41	93.2% (Specificity)
		79	34	45	91.1% (Concordance)
					36.1% (Applicability)

表8 2つ以上陽性又は陰性の場合

		+	-		
試験結果	+	89	63	26	70.8% (Sensitivity)
	-	99	18	81	81.8% (Specificity)
		188	81	107	76.6% (Concordance)
					85.8% (Applicability)

全モデルとも試験結果と同じ結果が得られた場合の信頼性(Concordance)は 91.1%で、2以上のモデルに陽性または陰性結果が見られた場合の Concordance は 76.6%であるが、評価適用率 (Applicability)では、全モデル同じ結果が得られた場合では 36.1%で、2つ以上の場合(85.8%)の約半以下であった。

以上のように全モデルが同じ結果を示す場合の Concordance は、90%以上と高い正解率が見られているが、評価適用率は 36%と低いことから、実際に染色体試験結果を予測する為のフローチャートに現段階では使用することが出来ない。しかし、2つ以上同じ結果で判定するフローチャートを使用した場合でも Concordance は 76.6%を示していることから、通常の判定にはこのフローチャートを用いても支障が無いことが分かった。しかし、今後の対応として各モデルの精度向上は必須である。

4. 染色体試験および反復投与毒性試験における Toxicophore の抽出

4.1. 方法

染色体試験の(Q)SAR モデルでは、AMES の試験のモデルと比較しその精度は劣っている。この精度向上のために、化合物生物活性リーズニングソフト (ClassPharmer) を使用して Toxicophore を抽出し、各(Q)SAR モデルにその情報をフィードバックすることで精度の向上が可能と考えられることから、既存化学物質および Kirkland らのデータ、染色体異常試験データ集-改訂 1998 年度版から染色体試験結果を収集し、その化合物から Toxicophore を抽出した。また、反復投与毒性試験の(Q)SAR モデルのための Toxicophore の抽出を試みた。

4.2. 結果及び考察

染色体試験を12の条件でクラス分類した結果から、更に目視による解析も行い、染色体異常活性の高い全123クラスまで絞りこむことができた。ここ

で特定された染色体異常活性の高いクラスを持つ123個が、既知の染色体異常活性と相関があるかどうか、評価用既存化学物質70化合物で評価した結果を表9と表10に示す。

表9 染色体異常陽性の33化合物

評価用化合物数	33
インポート化合物数	18
インポートされなかった化合物数	15
インポート率	0.545 (約 55%)

表10 染色体異常陰性の33化合物

評価用化合物数	37
インポート化合物数	12
インポートされなかった化合物数	25
インポート率	0.324 (約 32%)

陰性化合物インポート率よりも陽性化合物インポート率の方が高いことから、ここで特定された123クラスは染色体異常活性に相関があるため、潜在的な Toxicophore になると考えられることから、既知の染色体異常活性と相関があるかどうか、評価用既存化学物質 70 化合物で評価した。その結果、全 29 個の染色体異常活性に相関する Toxicophore が確定された。これらの Toxicophore は 3 つの(Q)SAR モデルを改良する上で有用な情報になると考えられた。

反復投与試験のToxicoPhore抽出については、予測モデルを構築する前提で、トレーニングデータセット748化合物のクラス分けを行ったが、1つの毒性徴候に対する化合物数が少ないことから、明確なToxicoPhoreの抽出は困難であった。今後は本研究で抽出したToxicoPhoreをもとに物理化学的性質や薬物代謝等の多くの要因も考慮し検討を行う必要が

ある事が推測された。

5. Ames 試験結果および3つの(Q)SAR モデル解析結果との相違に関する研究

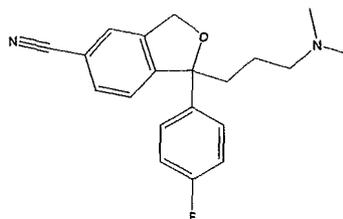
5.1. 方法

種々の化学物質の AMES 試験結果は文献として公表されていることから、その中の Synder ら(2004)、White ら(2003)と Kirkland ら(2005)の報告している化合物について3つの(Q)SAR モデルで検証し、結果に齟齬が見られた化合物のうち、Ames 試験陽性で上記3つの(Q)SAR モデル全てに陰性を示した10化合物と、Ames 試験陰性で(Q)SAR モデルで陽性を示した3化合物、計13化合物について、(Q)SAR モデルの信頼性向上の目的の為に、化審法ガイドラインに準じた AMES 試験を行った。

5.2. 結果及び考察

Ames 試験陽性で *in silico* システム陰性である10化合物の内、2化合物が復帰突然変異試験で陰性となった。その他の化合物については文献情報と試験結果は一致した。今後、復帰突然変異試験が陽性となった8化合物については、(Q)SAR モデルのデータベースに追加していくことで正解率の向上になると考えられる。試験に用いた化合物と試験結果を下記に示す。

- ① Citalopram (Citalopram Hydrobromide)、
 文献：陽性
 試験結果：陰性
 In Silico : 陰性

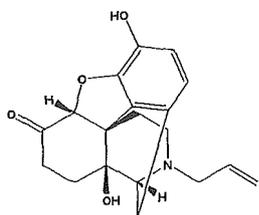


② Naloxone (Citalopram Hydrobromide),

文献：陽性

試験結果：陽性

In Silico : 陰性

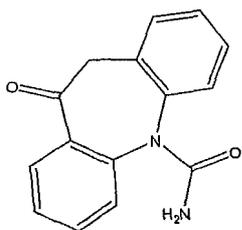


③ Oxcarbazepine (CAS No.: 28721-07-5,

文献：陽性

試験結果：陽性

In Silico : 陰性

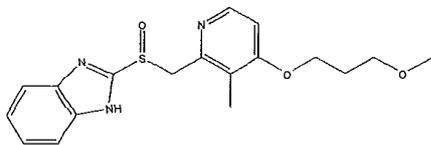


④ Rabeprazole

文献：陽性

試験結果：陽性

In Silico : 陰性

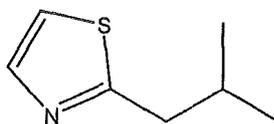


⑤ 2-(2-Methylpropyl) thiazole

文献：陽性

試験結果：陽性

In Silico : 陰性

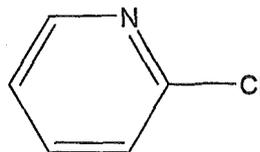


⑥ 2-Chloropyridine

文献：陽性

試験結果：陽性

In Silico : 陰性

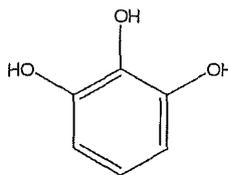


⑦ Pyrogallol

文献：陽性

試験結果：陽性

In Silico : 陰性

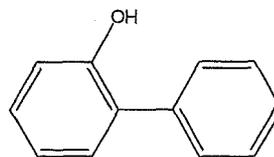


⑧ O-Phenylphenol (2-Phenylphenol)

文献：陽性

試験結果：陰性

In Silico : 陰性

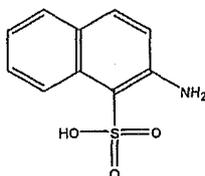


⑨ 2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid

文献：陽性

試験結果：陽性

In Silico：陰性

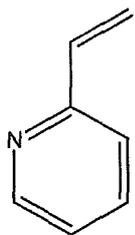


⑩ 2-Vinylpyridine

文献：陽性

試験結果：陽性

In Silico：陰性

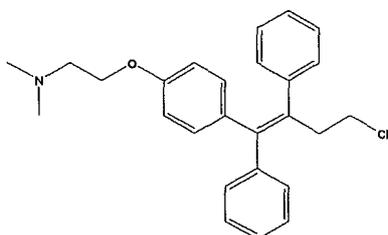


⑪ Tremifene

文献：陰性

試験結果：陰性

In Silico：陽性

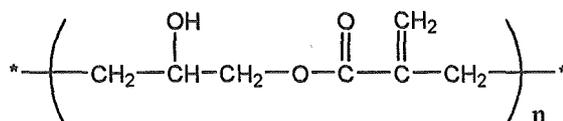


⑫ Poly (2-hydroxypropyl methacrylate)

文献：陰性

試験結果：陰性

In Silico：陽性

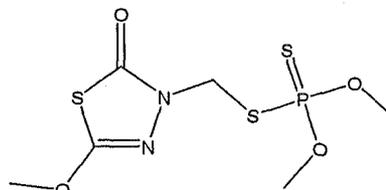


⑬ Methidathion

文献：陰性

試験結果：陰性

In Silico：陽性



6. 結論

DEREK のバージョンアップに伴う信頼性の変化について検証したところ、バージョンが上がるにつれ、Sensitivity には変化が見られなかったが、Specificity と Concordances については、その精度の向上が見られた。今後は Sensitivity の向上のために、試験結果陽性で計算結果陰性 [偽陰性] の 11 化合物の Alert を特定し、開発元の LHASA 社と協同で DEREK の改良を行う事とした。

染色体試験用の (Q)SAR モデルの最新バージョンの精度の検証を、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 219 物質の染色体試験結果を用いて実施したところ、3(Q)SAR モデルとも精度の向上が見られたが、更なる改良が必須である。また、これらの(Q)SAR モデルを使用した染色体試験判定フローチャートの信頼性の確認では、2つ以上同じ結果で判定する場合でも Concordance は 76.6% を示していることから、通常の判定にはこのフロー

チャートを用いても支障が無いことが分かった。しかし、今後の対応として各モデルの精度向上は必須である。

染色体試験の(Q)SAR モデルでは、AMES の試験のモデルと比較しその精度は劣っていることから、精度向上のために ClassPharmer を使用して Toxicophore を抽出した結果、全 29 個の染色体異常活性に相関する Toxicophore が抽出され、この情報を各モデルの開発元にフィードバックすることで精度の向上が可能と考えられる。

反復投与試験における(Q)SAR モデル開発の為に、Toxicophore 抽出を、ClassPharmer を用いて行ったが圧倒的に毒性徴候に該当する化合物数が少なかったため、活性分布形状から解析すること、Class Model 構築や SAR ルールの抽出が困難であった。今後は、抽出された Toxicophore を元に、物理化学的性質や薬物代謝等の多くの要因も考慮し、該当物質数を増やして検討する必要があると考えられた。

Synder ら(2004)、White ら(2003)と Kirkland ら(2005)の報告している AMES 試験の化合物について 3 つの(Q)SAR モデルで、AMES 試験について検証し、結果に齟齬が見られた化合物のうち、Ames 試験陽性で上記 3 つの(Q)SAR モデル全てに陰性を示した 10 化合物と、Ames 試験陰性で(Q)SAR モデルで陽性を示した 3 化合物、計 13 化合物について、(Q)SAR モデルの信頼性向上の目的の為に AMES 試験を行った。その結果、陽性結果である 10 物質のうち、2 物質が試験結果陰性を示し、*in silico* の結果と同一となった。その他の物質については、報告結果と同一であった。文献結果が陽性の化合物で齟齬が見られた 8 化合物の情報を(Q)SAR モデルのデータベースに追加することで、信頼性の向上が得られると考えられた。

●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

研究協力者

小松英司 国立環境研究所 NIES フェロー
本島清人 明治薬科大学 化学教室教授

1. 毒性既知のフッ素化合物等の定量的構造活性 相関

化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）の評価では、28日反復投与試験で得られる *NOEL* が使用されており、審査の迅速化のため、コンピューター上で毒性予測が可能な構造活性相関が望まれている。このようなことから、本研究では、毒性に係る作用機序を検討し、そのメカニズムに基づいた記述子の選定および予測法の検討を行ない、*NOEL* を予測できる構造活性相関についての研究を行った。

1.1. 方法

28日間反復投与試験の結果の情報が得られたフッ素化合物およびフタル酸エステル類化合物などについて解析を行なった（表 1-1）。これらの物質のうち、作用機序を表現している電子的因子、立体因子を説明する記述子を同定した。QSAR モデルの構築に当たっては、化合物の生体内、標的臓器での毒性の作用機序を反映する記述子について検討した。構造活性相関を構築する際は、生体内へ吸収され細胞膜へと移行するメカニズムのほかに、受容体とリガンドとの相互作用を表現することが重要となる。そこで、肝毒性が明らかな、あるいは疑われるフッ素化合物およびフタル酸エステル類が PPAR と結合活性があることが実験から確認できることから、PPAR とリガンドの相互作用を取り入れた構造活性相関を検討した。なお、PPAR とリガ

ンドとの活性を予測する手法は、北里大学広野教授の成果であり、その予測結果を活用した。

1.2. 結果

1.2.1. PPAR α 活性を入れた構造活性相関の構築

肝毒性が明らかな、あるいは疑われるフッ素化合物およびフタル酸エステル類について、PPAR (Peroxisome Proliferator-activated Receptor) 結合活性をレポーターアッセイ等で解析を行った結果、多くの物質で PPAR α リガンド活性のあることが確認できた。ペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 (PPAR) のリガンド活性をテスト化合物で解析した結果、疎水性の高い化合物では *NOEL* と PPAR の活性が相関していると考えられる。このことにより、テスト化合物については肝毒性による生体への影響は、PPAR 活性に起因していることが考えられる。そこで、詳細の毒性メカニズムに基づく QSAR を構築するために、生体内の輸送過程、生体内の活性 (PPAR の活性による脂肪代謝の攪乱) 等を考慮し、それらのメカニズムを反映していると考えられる記述子を選定し、重回帰モデルを構築した。QSAR の構築に使用した化合物は、表 1-1(a) に示す 14 物質である。

これら化合物の生体内での挙動および活性を説明できる可能性のある疎水性 *LogP*、立体因子（分子量、VDW半径）、電子的因子 (*Dipole*, *E_{HOMO}*, *E_{LUMO}*) や置換基パラメータを記述子として重相関解析を行った。この結果、疎水性パラメータ: *LogP*、立体パラメータ: *VDW* (van der Waals) 体積、エネルギーパラメータ: *E_{HOMO}*、そして化合物と PPAR との活性を示すパラメータ: *Log(1/EC50)* (*Cell-based Transactivation Assay*) の4つの記述子を使用した重回帰モデルが最も *NOEL* を的確に予測する QSAR モデルとなった。

このモデルでは、PFOS の毒性のみが表現できなかった。PFOS を除いた場合の予測精度は、*internal validation* で決定係数が 0.86、RMSE が 0.33 であり高精度を持つ QSAR 式となった。

PFOS については、テスト化合物と異なる作用機序を持つことが考えられる。

1.2.2. 構造活性相関の検証

QSAR 式(1)で、検証物質 (9 物質) を予測結果、毒性の傾向は示せるものの、予測値と実測値の相関係数 0.33 と定量的な予測が不可能であることがわかった (図 1-7)。

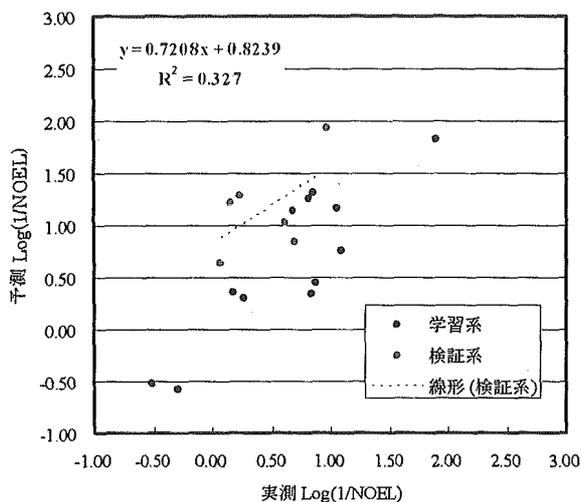


図 1-7 検証系化合物を用いた場合の予測結果

QSAR 式を構築した 13 物質と検証に使用した 9 物質では、NOEL の原因となる毒性メカニズムは異なることが考えられることから、検証系 9 物質を含めた QSAR 式(2)を導出した。

式(2)の決定係数は、学習系の化合物では 0.75、検証系の化合物では 0.82 となっている (図 1-10)。学習系から構築した場合、検証系に使用した物質は PPAR との活性を予測することが可能であるが、NOEL を予測することが出来なかった。

1.3. 考察

NOEL の予測については、化学物質の作用機序の把握およびその作用機序を反映する記述子の選定が重要であると示唆される。特に、肝毒性を示す化合物についての QSAR モデルでは、PPAR は大きい寄与率をもっており、構造活性相関では重要な記述子となっている。このことから、化合物の生体へ

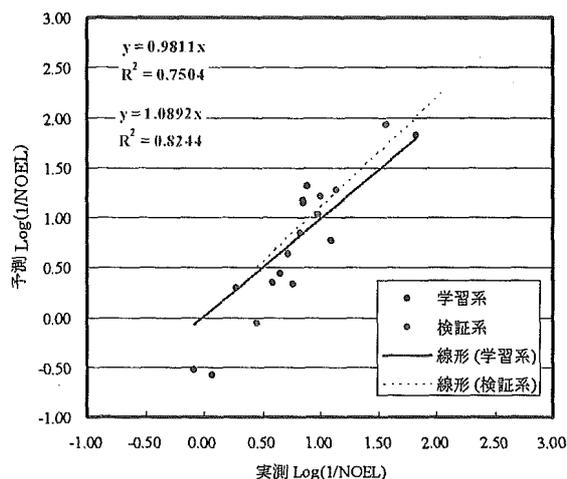


図 1-10 学習系、検証系の全化合物で QSAR を構築した場合の予測結果

の影響において PPAR の結合活性が重要な要因であると QSAR モデルからも示唆できる。

QSAR モデルの信頼性の向上には、作用機序のメカニズムを QSAR に反映されることが重要であり、例えば、PPAR とリガンドとの複合体モデルから得られる記述子の導入、検証化合物によるモデルの予測性および頑強性の評価、構造活性相関に必要な他の過程・反応系の検討、特異的な毒性作用メカニズムの把握 (PFOS) などの検討が重要であると考えられる。また、異なる作用機序を有する物質群をどのように同一の QSAR で表現するかがグローバルな QSAR を構築するために必要な課題である。

一方で、QSAR を適用する場合の適用ドメインの定義を明確にしておく必要がある。本研究の場合、学習系の化合物では、 $\text{Log}(1/EC50)$ の範囲が 5.63 から 8.18 であるのに対し、検証系では 3.76 から 5.41 と小さい。検証系の化合物が学習系の適合範囲を超えていることで、検証系の化合物の毒性が予測不可能になっている。実験系で検証を行わないと確実ではないが、QSAR の検討を通じ、検証系の化合物の肝毒性は、PPAR 活性以外の因子に大きく依存している可能性がある。

表 1-1(a) フッ素化合物及びフタル酸エステル類などの化合物(学習系)

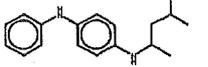
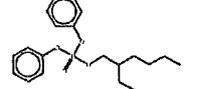
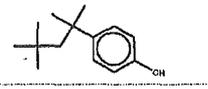
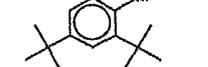
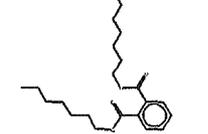
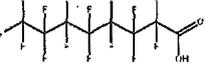
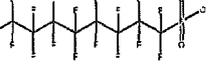
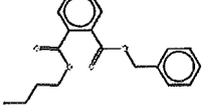
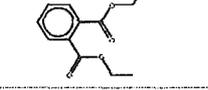
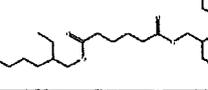
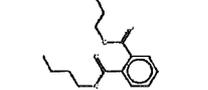
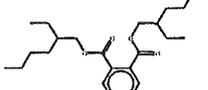
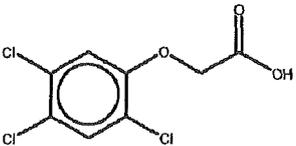
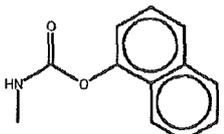
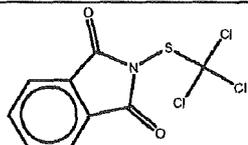
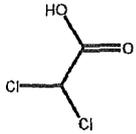
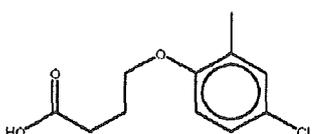
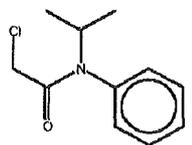
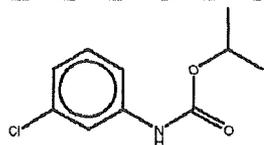
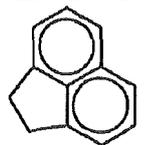
Mol. ID	系	STRUCTURE	Name	MolWt	NOEL	PPAR活性	Kow
1	S		N-(1,3-Dimethylbutyl)-N-phenyl-p-phenylenediamine	268.4	4	++	4.68
4	S		2-Ethyl hexyl diphenyl phosphate	362.4	20	-	6.30
5	S		p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenol	206.3	15	++	5.28
6	S		Nonylphenol	220.4	150	-	5.99
7	S		Dibutyl adipate	258.4	1000	+/-	4.33
8	S		2,4-Di-t-butylphenol	206.3	75	-	5.33
9	S		Diheptyl phthalate	362.5	62	-	7.56
10	S		PFOA	414.1	1.5	+++	5.68
11	S		PFOS	499.1	0.1	-	5.14
12	S		butyl benzyl phthalate	312.4	159	-	4.85
13	S		diethyl phthalate	222.2	750	-	2.65
14	S		di (2-ethyl hexyl) adipate	370.6	170	-	8.12
15	S		dibutyl phthalate	278.3	125	-	4.61
16	S		di (2-ethyl hexyl) phthalate	390.6	19	++	8.39

表 1-1 (b) 表 1-1 (a) フッ素化合物及びフタル酸エステル類などの化合物(検証系)

Mol_ID	系	STRUCTURE	Name	MolWt.	NOEL	Kow
64	V		245T	255.5	3	3.31
55	V		Carbaryl	201.2	9	2.35
60	V		Folpet	296.6	10	2.85
59	V		Dichloroacetic acid	128.9	12	0.92
68	V		MCPB	228.7	12	3.50
63	V		Propachlor	211.7	13	2.18
58	V		Ethylene Dibromide	187.9	27	1.96
57	V		chloropham	213.7	50.0	2.66
54	V		Acenaphthene	154.2	175.0	2.36

系 : S ; 学習系化合物、V ; 検証系化合物

4. 結論

化合物の毒性の作用機序を反映していると考えられる物理化学的パラメータと部分構造で分類した結果、同じ作用機序を有する化合物は同じ化合物群に分類される。分類された化合物群ごとに作用機序に重要と考えられる記述子を使用した重回帰分析および非線形モデルにより高い予測性を有するQSARモデルを構築することが出来る。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、化合物の分類および生体内、特に標的臓器における化合物の作用機序を示す記述子を探索することが肝要であることが明らかになっている。特に肝毒性を有する化合物の毒性予測のためには、物理化学パラメータの他にPPARの活性値を考慮しなくてはならず、これらの記述子による重回帰解析よりNOELを予測できるQSARモデルを構築することが出来た。一方、肝毒性を有する化合物群でも異なる作用機序を有する可能性のあるものについては、QSAR式では外挿予測することは出来なかった。これを解決するためには、予測する化合物の同じドメインをもつ化合物を学習系として含める必要があることが示唆される。

PPARの活性値は、実験を行わず、広野教授が構築したPPAR α とリガンドとの複合体モデルから予測できることから、肝毒性を示す化合物については*in silico*でNOELを予測することが出来ると考えられる結論となった。今後の課題として以下のものが考えられる。

- PPARとリガンドとの複合体モデルから得られる内部エネルギーの遷移。
- 更なる検証化合物によるモデルの予測性および頑強性の評価。
- 異なる作用機序を持つ化合物群をどのように予測するか。
- 構造活性相関に必要な他の過程・反応系の検討
 - ・ 特異的な毒性作用メカニズムの把握 (PFOS)
 - ・ 移行過程, 接近過程, 結合過程, 乖離過程等

2. 核内受容体PPARへのリガンド活性と肝毒性発現に関する研究

多くの化学物質は、その毒性発現の機構として、生体の脂質代謝の攪乱することによっていることが予想される。こうした攪乱の機構として、脂質代謝の中心的な調節因子として知られるペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 (PPAR, Peroxisome Proliferator-activated Receptor) など核内受容体の活性化が想定されている。化学物質の毒性の指標として従来はそのアゴニスト活性が注目されてきたが、それに加え、アンタゴニスト活性も重要な指標である可能性がある。今年度は、昨年度までのPPAR α アゴニスト活性の測定に加え、アンタゴニスト作用による毒性発現の可能性をPPAR α ノックアウトマウスを用いて検討し、化合物の中にアンタゴニスト活性を持つものがあるか検索した。

1. 方法

PPAR α がアンタゴニストによって阻害される場合のモデル系として、PPAR α ノックアウトマウスを用いた。このマウスと野生型マウスを各種の植物種子などで7日間飼育し、血清成分、肝臓と小腸での遺伝子発現の変化を比較した。血清成分は各種臨床パラメーターを比較した。発現量の異なるタンパク質は、peptide mass fingerprint (PMS)法で同定し、mRNAについてはwhole genome microarrayによって解析した。また、各種化合物のアンタゴニスト活性は、昨年度までの同様の、培養細胞系でのレポーターアッセイによって検討した

2. 結果

植物種子等の未加工品を餌としてマウスを飼育した結果、とくにゴマにおいて、PPAR α の有り無しで顕著な差が見られ、PPAR α ノックアウトマウスでは数日で死亡するケースがよく見られた。血清成分の比較では、ノックアウトマウスでの低血糖が際立

っていた。肝毒性も見られたが、数日内の死亡の直接原因は、この低血糖であると考えられる。

ゴマ食によって肝臓で誘導されるタンパク質を解析した結果、野生型マウスでは **Glutathione S-transferase** が同定された。解毒反応が亢進していることが予想された。

発現変動のある mRNA をアレイ解析したところ、Cyp2c 数タイプをはじめとする異物代謝系が更新していることが示唆された。この結果はノーザンブロット法で確認され、この誘導には PPAR α が必須であること、さらに、PPAR α のリガンド投与だけではこれらの誘導が見られないことから、間接的な関与であることがわかった (図 1)。

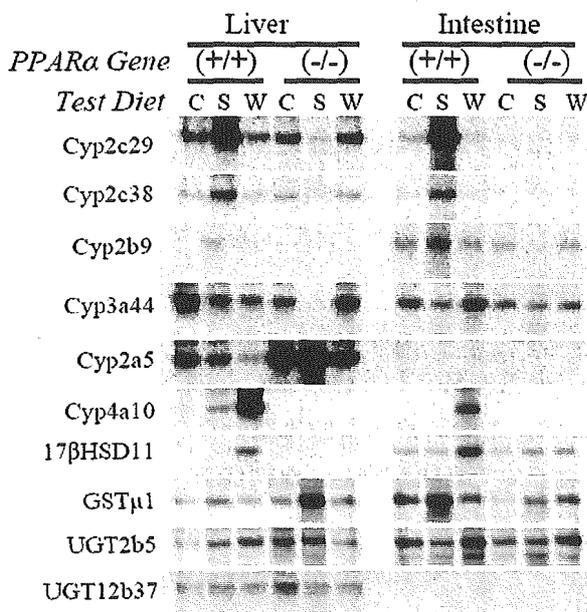


図 1 野生型マウスと PPAR α ノックアウトマウスの、ゴマ食 3 日後の肝臓と小腸における遺伝子発現のノーザンブロットによる確認。C は正常食、S はゴマ、W は PPAR α 特異的アゴニスト Wy14,643 を示す。

PPAR α は、異物代謝酵素遺伝子の転写活性化には直接的には関わっていないものの、それらの遺伝子発現誘導に関わる他のリガンド依存性の転写因子 (xenobiotic 受容体など) のリガンド産生の段階で必須の役割を演じていることが予想される。

培養細胞を用いたレポーターアッセイでは、PPAR α のアンタゴニスト活性を有する可能性を示

す化合物 **Butylbenzylphthalate(BBP)**が見出された。BBP はレポーターアッセイ系で PPAR α の特異的なアゴニスト Wy による活性化を濃度依存的に抑制し、対照のプロモーター活性は阻害しなかった。そのため、アンタゴニスト活性をもつと判断した。しかし、レポーターアッセイに変えて、内在性の遺伝子発現に対する影響を見たところ、そのアンタゴニスト活性は再現性良くは観察できなかった。

3. 考察

脂質代謝の中心的な調節因子として知られるペルオキシソーム増殖薬活性化受容体 (PPAR, Peroxisome Proliferator-activated Receptor) の活性を変化させることによって脂質代謝を攪乱し、肝毒性発現をする化合物が多数存在することが予想される。今まで、PPAR α の活性化を中心に検討を進め、すでに肝毒性が明らかになっている化合物について、そのアゴニスト活性との対応付けを行うために、レポーターアッセイによる測定を行ってきた。しかし、アゴニストに加え、アンタゴニストでも、毒性発現に至る可能性があることを、PPAR α ノックアウトマウスを用いた解析から初めて示した。

この結果は、肝臓での脂質異化反応での役割のみが強調されている PPAR α が、ある種の化合物の解毒作用にも必須の働きを示すのみならず、解毒系遺伝子の発現制御ネットワークの複雑性も示唆している。

従来、異物代謝あるいは薬物代謝として生体外分子の代謝に関与する系は、内在性分子の代謝との関わりがあまり意識されずに解析されてきた。しかし、これらの代謝系は、おそらく動物と植物の食物連鎖の中から進化してきたもので、動物は植物が合成する自衛のための異種分子を解毒するために持っているであろう。そうだとすると、xenobiotics の代謝と考えるよりは、parabiotics として捉え、内在性の代謝とのつながりをもっと考えていくことも重要であると考えられる。遺伝子発現制御に関わる核内受容体もいわゆる xenobiotic 受容体として分けす