

るよりは、今回の PPAR の関与で示されるように、他の多くの転写因子とのネットワークを解析していくことが重要である。

4. 結論

化学物質の核内受容体 PPAR α へのリガンド活性を、その化合物の肝毒性発現の指標とすることが、特定のグループの化合物に対しては可能であろう。また、他の核内受容体へのリガンド活性も、アンタゴニスト活性も含め、ある種の化合物の毒性発現の指標となることが予想される。しかし、毒性発現の機構には多様性があり、培養細胞や *in vitro* の測定系で、すべての化学物質の毒性発現予測を画一的に行なうことは困難であると思われる。化合物をその構造式などからグループ分けし、各グループに適した予測系を用いるなどの工夫が必要である。

●毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究

分担研究者

広野修一 北里大学 薬学部教授

ヒト PPAR α のリガンド結合ドメイン(LBD) と PPAR α アゴニストである GW409544 の複合体(PDB code:1k7l)の立体構造情報を使って、肝毒性を示す化合物の結合配座及び PPAR α -リガンド複合体の立体構造を作成し、2004 年度に作成した 3D-QSAR モデルを使って PPAR α に対する活性予測を行う。

1. 方法

肝毒性を生じる化合物 (表 1) は学習系リガンドに共通に存在して見られるカルボン酸を持たない。共通の官能基がない場合には、学習系リガンドの時に用いた FlexS はあまり適していない。そこで、当研究室で開発されている結合配座推定手法を利用した。初めに、高温分子動力学法を利用した配座解析プログラム CAMDAS を使ってエネルギー極小配座集団を生成した。

表 1 肝毒性を生じる化合物群

1	(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylene diamine
2	1H,1H-Perfluorooctanol
3	1H,1H, 2H, 2H-Perfluorooctanol
4	diphenyl 2-ethylhexyl phosphate
5	p-tert-Octylphenol
6	Nonylphenol
7	dibutyl adipate
8	2,4-D-tert-butyl phenol
9	diheptyl phthalate
10	butyl benzyl phthalate
11	diethyl phthalate
12	di (2-ethylhexyl) adipate
13	dibutyl phthalate
14	diethylhexyl phthalate

次に、PPAR α -GW409544 複合体の実験構造から取り出した GW409544 の結合配座を参照分子として、先に得られた配座集団を SUPERPOSE プログラムを使って重ね合わせた。SUPERPOSE プログラムは、リガンド構造の官能基に半径 1Å の球を割当て

た二つの配座を、同一特性の球がお互いに重なるように回転、並進運動させて、共通特性の官能基が重なるアライメントを生成するものである。この方法を使って化合物ごとに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。そして、エネルギー極小化後の複合体のエネルギーの低い複合体モデルのリガンドの配座を結合配座とした。この結合配座と GW409544 とのアライメントを用いて昨年度作成した CoMFA モデルを使って、各化合物の PPAR α 活性を計算した。

2. 結果

CoMFA 式による肝毒性を生じる化合物の PPAR α に対する活性予測の結果を表 2 に示す。計算から化合物はいずれも PPAR α 活性をある程度有することが予測された。この結果を実験結果と比較したものが図 2 である。

7 化合物(強:ピンク(5,1,9,6,4)、低い:青(2,3))は活性の強弱が実験結果と計算結果間で一致した(5 は実験による誤差が大きい)。一方、6 化合物(黄色;7,13,8,11,12,10)は実験では活性が弱いと出たにも関わらず、計算では活性があると予測された。

表2 肝毒性を生じる化合物に対する PPAR α 活性予測値 (Cell-Based transactivation Assays: log(1/EC₅₀))

	ClogP	計算値
1	(1,3-Dimethylbutyl)-N'-phenyl-p-phenylene diamine	5.41 6.16
2	1H,1H-Perfluorooctanol	2.04 4.91
3	1H,1H, 2H, 2H-Perfluorooctanol	1.44 4.42
4	Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate	5.24 6.86
5	p-tert-Octylphenol	5.16 5.63
6	Nonylphenol	6.21 6.03
7	Dibutyl adipate	3.90 6.06
8	2,4-D-tert-butyl phenol	5.13 5.98
9	Diheptyl phthalate	7.91 7.29
10	butyl benzyl phthalate	3.88 6.72
11	Diethyl phthalate	2.62 5.82
12	Di (2-ethylhexyl) adipate	7.87 7.66
13	Dibutyl phthalate	4.73 6.15
14	Diethylhexyl phthalate	8.71 8.18

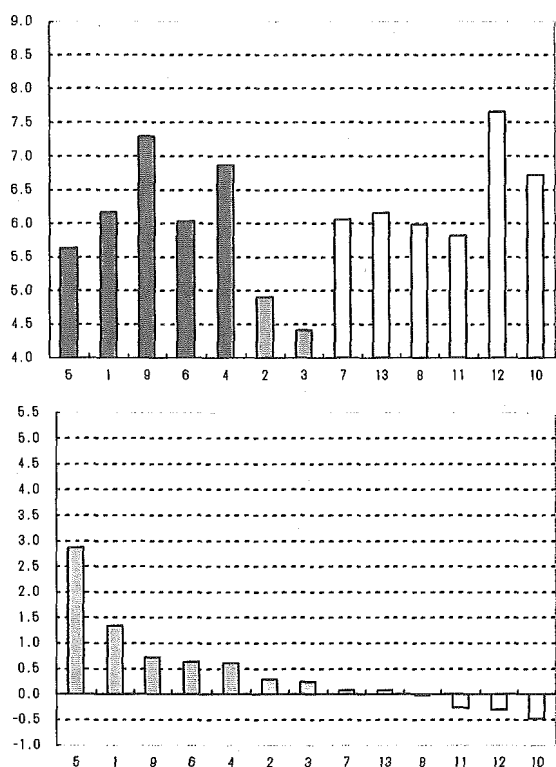


図2 上図 CoMFAモデルによる予測値
Cell-Based transactivation Assays:
log(1/EC₅₀)
下図 実験による活性値の規格値
Relative Luciferase Activity Assays
(F.L./R.L.) をDMSOとWy14643 (基準化合物) で
規格化した値 5は誤差が大きい (赤線)

この要因として、エステラーゼ酵素によって代謝される可能性が挙げられる。親化合物が代謝され代謝化合物になってしまうために、実験と予測間で異なったのではないかと考えられた。そこで、表2の化合物の中で代謝を受ける可能性がある化合物を調べた。その結果、7、9、10、11、12、13が代謝を受けると考えられた。そこで、これらの化合物が代謝を受けた後に生成されると考えられる化合物に対して、PPAR α 活性を計算した。代謝後に生成する化合物は親化合物より PPAR α 活性が弱いことが予測され、実験は細胞系によるものであるため、実験による活性結果が低かったのはその化合物が代謝されたためではないかと思われる。さらに、代謝生成によって生じる最終化合物の中で、PPAR α 活性が測定されている化合物に対して、同様に PPAR α の活性値を計算し、実験値と比較した。その結果、

活性順位を正しく求めることができた。

3. 考察

研究で求めた PPAR α リガンドと PPAR α LBD との複合体モデルから得られた、PPAR α との結合に関する 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工業材料に用いられる化合物の PPAR α に関する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。

4. 結論

PPAR α 活性の既知のリガンドから作成した三次元定量的構造活性相関モデル (CoMFA モデル) を使って肝毒性を示す化合物の活性の強弱を代謝も含めて予測することがほぼ可能であることがわかった。

●化学物質の代謝活性化の予測モデルに関する研究

分担研究者

山添 康 東北大学大学院薬学研究科
薬物動態学分野 教授

生体内での代謝変換の知見は、化学物質の安全性評価のための重要な情報である。過去 10 年間に医薬品を中心に代謝に関する情報の流れに大きな変化があった。従来実験動物で得られた代謝情報をヒトに外挿して代謝が評価されていた。しかし代謝酵素の研究が進展してヒトと実験動物の種差が明瞭になり、ヒトにおける代謝はヒト由来の試料を用いて評価することが前提となった。同様の種差は医薬品だけでなく多くの化学物質にも当てはまる。この問題を乗り越えるためヒト酵素発現系で得られた代謝情報をデータベース化して、これを基に単一酵素ごとに基質特異性を明らかにして、この情報から未評価化学物質の代謝特性を予測する系を開発することを試みた。

化学物質の安全性評価において癌原性や遺伝毒性は化学物質の構造と代謝に深く関わっている。本研究ではこれら試験に深く関わるチトクローム

P450 の CYP1A2 を取り上げ、解析した。

1. 方法

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。

2. 結果

得られた化学物質情報を下に示す。

Substrate	Product	CYP form1
7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo		
[a]pyrene	9,10-oxide	CYP1A1
3-Methylcholanthrene		CYP1A
Almotriptan		CYP3A4
Atrazine	iPr-OH	CYP1A2
Benzo[a]pyrene	3-hydroxylation	CYP1A
Benzo[a]pyrene	7,8-oxide	CYP1A
Benzo[a]pyrene	6-OH	CYP1A
Benzo[c]phenanthrene		CYP1A2
Clozapine		CYP1A2

Coumarin	coumarin 3,4-epoxide	CYP1A1/2
Cyclobenzaprine	N-demethylation	CYP1A2
Daidzein		CYP1A2
DMXAA	6-methylhydroxylation	CYP1A2
Fluvoxamine		CYP1A2
Furafylline	inf mechanism	CYP1A2
Imipramine		CYP1A2
JANEX-1	O-demethylation	CYP1A2
Lidocaine	N-DE	CYP1A2
Lisofylline	pentoxyfylline	CYP1A2
PhIP	N-OH	CYP1A2
Primaquine		CYP1A2
Promazine	5-sulphoxidation	1A1>2B6>1A2 2C19>2B6>1A1>
Promazine	N-demethylation	1A2
Ropivacaine	3-OH-ropivacaine	CYP1A2
Ropivacaine	4-OH-ropivacaine	CYP3A4
Ropivacaine	2-OH-methyl-ropivacaine	CYP3A4
Ropivacaine	2',6'-pipercoloxylidide	CYP3A4
Rutaecarpine	inh	CYP1A2
S 16020	Unknown	CYP1A2
Sanguinarine	inh mechanism	CYP1A2
Tacrine	7-OH	CYP1A2
Tanshinone IIA	inf	CYP1A2
Terbinafine	DHDiol	CYP1A2
Terbinafine	N-DM	CYP1A2
Thalidomide	5,5'-OHs	CYP1A
Theophylline	demethylation	CYP1A2
Theophylline	hydroxylation	CYP1A2
Tizanidine	ring Ox	CYP1A2
Verlukast	epoxidation	CYP1A1
Zaleplon	N-DE	CYP3A4
Zolmitriptan	N-demethylation	CYP1A2
Zolpidem	alcohol deriv	CYP1A2

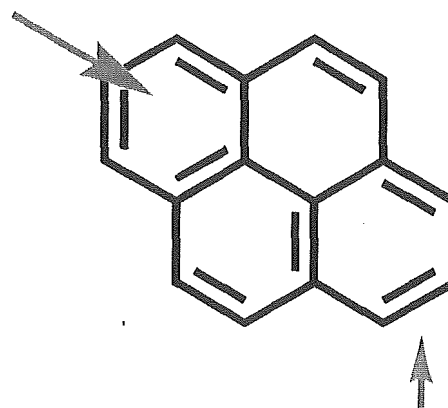
ここで CYPform1 は主代謝酵素として報告されてい

る分子種で、化学物質によっては CYP1A2 が主酵素

でなく、むしろ副次的に関与する場合、リストには他の分子種のみが記載されているものも加えた。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重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。

下図の *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ヘ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。

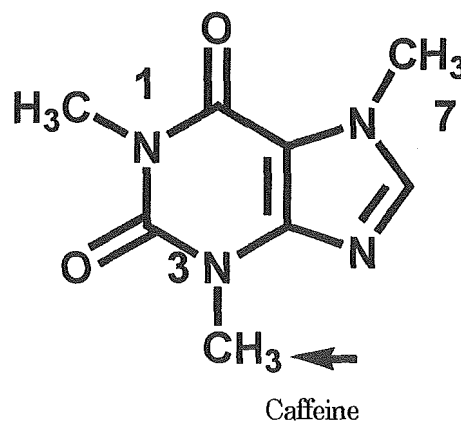
基本的には 3 環にわたって重なる部位の多い物質ほど、適合性があると考えられる。

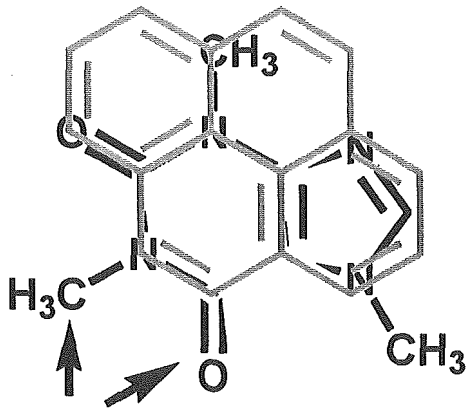
ヘムは緑の矢印下方から接近するので側鎖がこの下方 2 炭素までの範囲にあれば基質となる。

酸化部位右側はベンゼン環 1 個分の余裕があり、*pyrene* 下方の *naphthalene* 部は *anthracene* になっても収容可能である。しかしさらに延長できない。また左下に *pyrene* 下端を超えて伸張はできない。Trigger 部位の上は比較的余裕がある。

Pyrene rule を用いて、下記の化合物の予測を行った。

・Caffeine の酸化反応

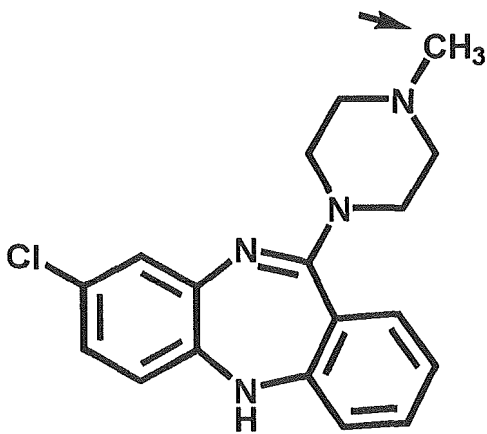




hinder ?

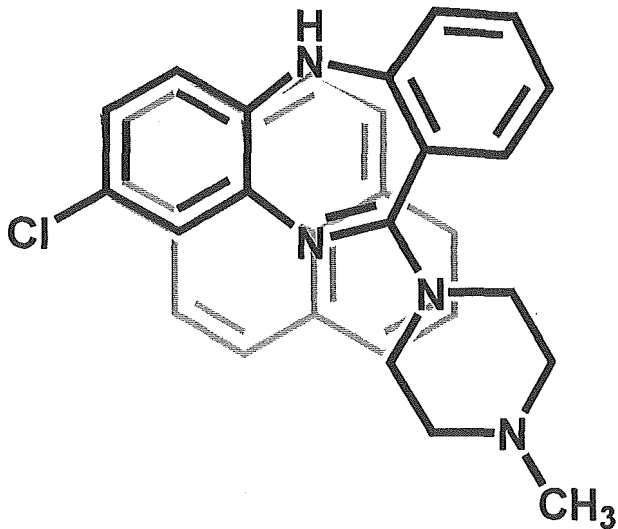
上図に示した配置で N-3-methyl 基の酸化が優先すると判断する。

・ Clozapine の CYP1A2 による代謝



Clozapine

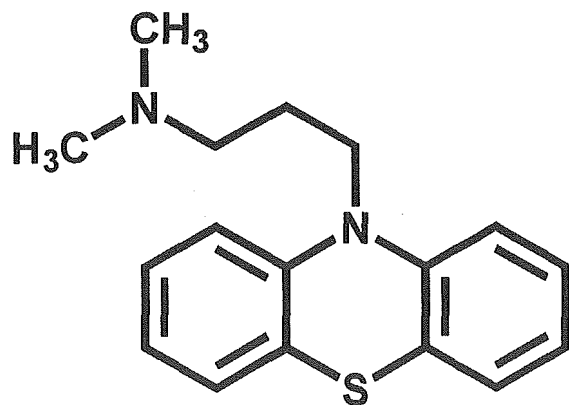
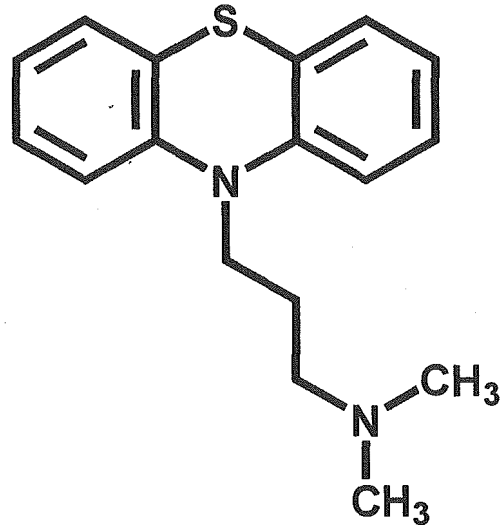
この物質は連続する3環の向きによって、この3環で作る平面に対してピペラジン環が手前あるいは奥に配置される。

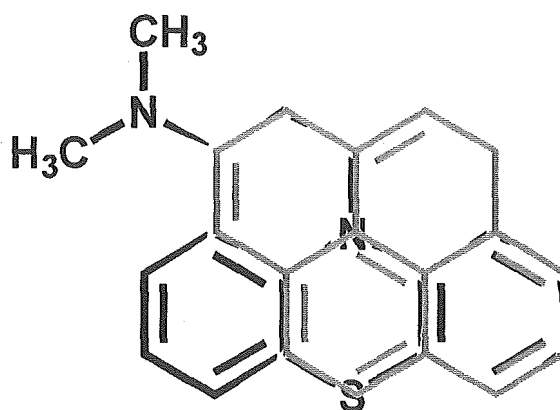
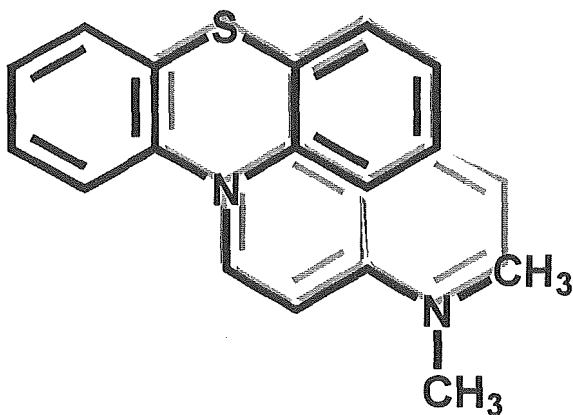


この配置では、7員環の C N2 重結合によってピペラジンの平面が固定される。左下に障害もなく、このため N-脱メチル化に適する。ただしヘムとの距離が近すぎる可能性がある。また右上ベンゼン環は限度いっぱいと考えられ、N-脱メチル化が起こると判断できる。

・ Perazine の代謝

erazine は CYP1A2 によって N- 脱メチル化され、一部は S-酸化される。この化合物では N-dimethylpropyl 側鎖が基質認識に関わると考える。このため右下の配置を採ると考えると pyrene 則を適用できる。

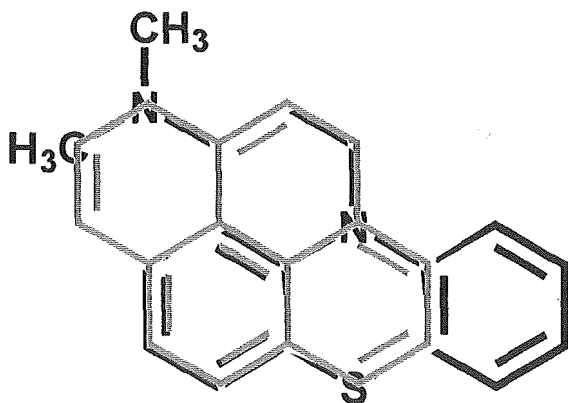




脱メチル化の配置

Trigger のあと側鎖が平面上に並んだコンフォーマーが酵素に捕捉されると考える。下の S- 酸化と 3- 水酸化は側鎖の自由度が大きいことから平面上配置を採る確率が低い。しかし並んだ配置を採ると残りの構造が平面なためある程度進行する。

逆に側鎖が trigger されると硫黄の酸化と 3-水酸化反応が起こる。ジメチルアミノ基が、ベンゼン環とともに trigger 部位を形成した場合、硫黄の酸化が起こる。この配置は、手前下の障害が少ないので可能となる。しかしベンゼン環の 3 位酸化反応は trigger の確率が一番少ないことと左下の障害のためゆっくりしか進行しないと考える。

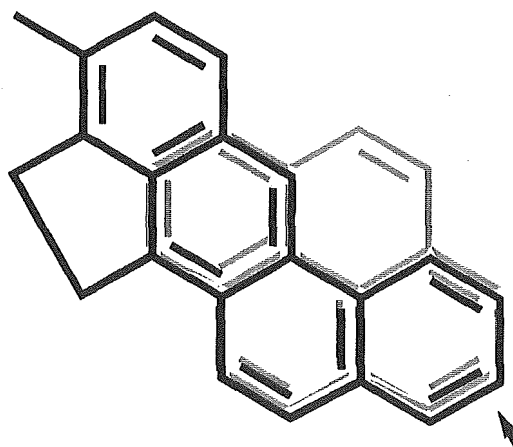


S-酸化の配置

・ 3-Methylcholanthrene の場合

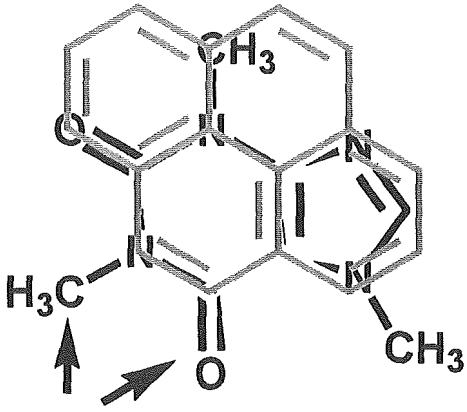
ヒト酵素について情報が不明であるが、ラットでは 1 位および 2 位が水酸化され、末端環の 9,10 および 11,12 が酸化によってエポキシドに変換される。3 位メチル基の水酸化も生成する。PAH で処置したラットの肝ミクロソームでは圧倒的に 2 位酸化が進行する。

Pyrene 則を適用すると 1 水酸化は下方右側が限度であるが、5 員環が酸化部位にはまる。9,10-oxide 生成反応は下図の配置で pyrene 則に適合する。



9,10-oxide 生成部位

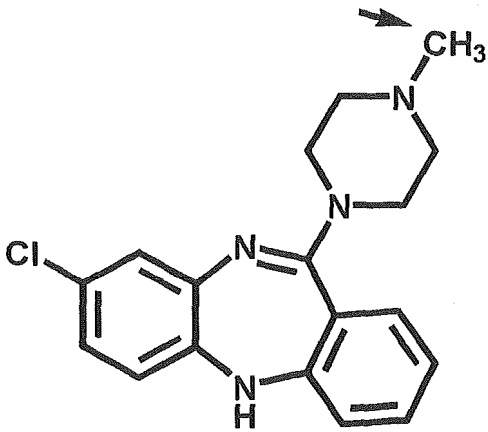
・ Atrazine の酸化代謝



hinder ?

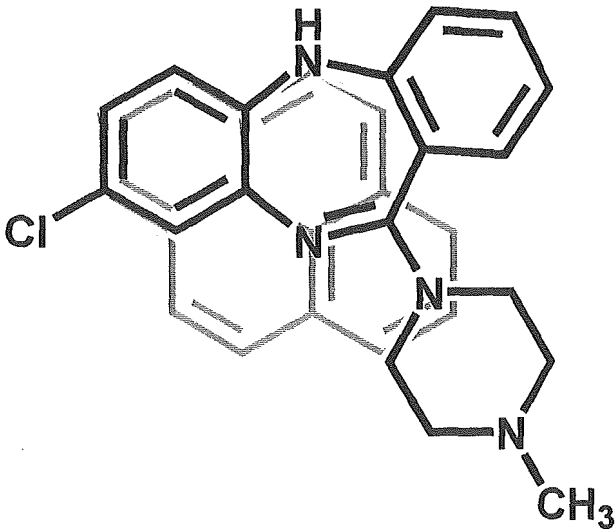
上図に示した配置で N-3-methyl 基の酸化が優先すると判断する。

・ Clozapine の CYP1A2 による代謝



Clozapine

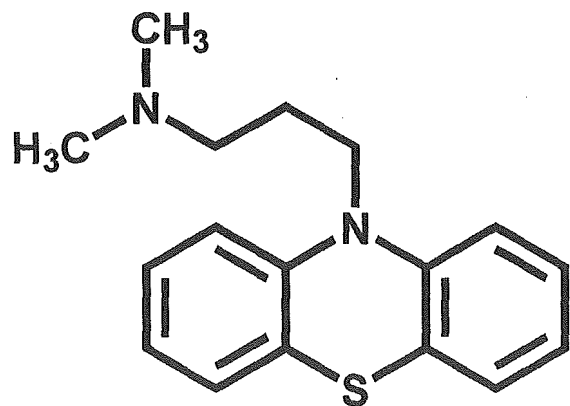
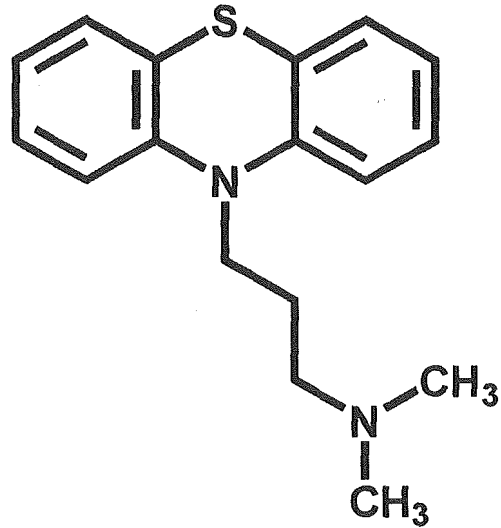
この物質は連続する3環の向きによって、この3環で作る平面に対してピペラジン環が手前あるいは奥に配置される。

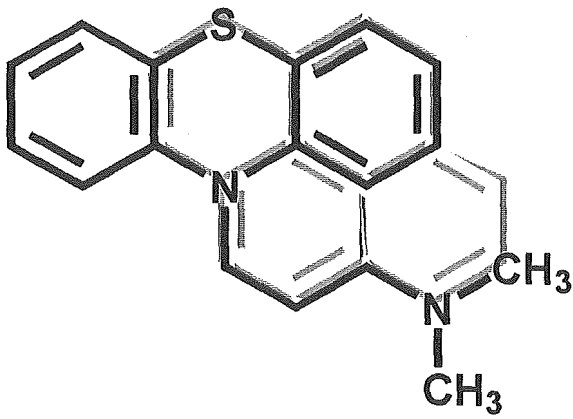


この配置では、7員環の C N2 重結合によってピペリジンの平面が固定される。左下に障害もなく、このため N-脱メチル化に適する。ただしヘムとの距離が近すぎる可能性がある。また右上ベンゼン環は限度いっぱいと考えられ、N-脱メチル化が起こると判断できる。

・ Perazine の代謝

erazine は CYP1A2 によって N- 脱メチル化され、一部は S-酸化される。この化合物では N-dimethylpropyl 側鎖が基質認識に関わると考える。このため右下の配置を採ると考えると pyrene 則を適用できる。

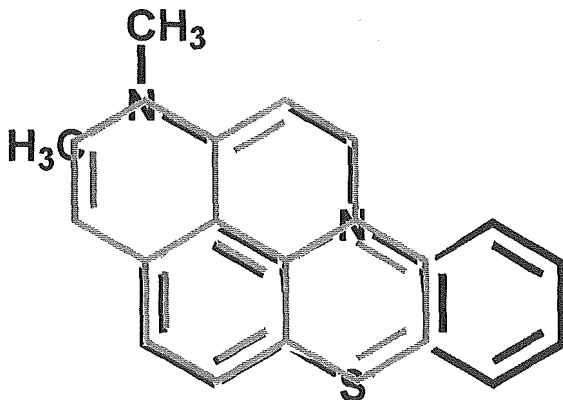




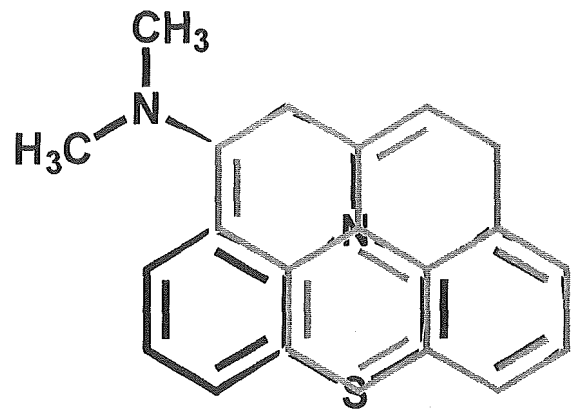
脱メチル化の配置

Trigger のあと側鎖が平面上に並んだコンフォーマーが酵素に捕捉されると考える。下の S-酸化と 3-水酸化は側鎖の自由度が大きいことから平面上配置を採る確率が低い。しかし並んだ配置を採ると残りの構造が平面なためある程度進行する。

逆に側鎖が trigger されると硫黄の酸化と 3-水酸化反応が起こる。ジメチルアミノ基が、ベンゼン環とともに trigger 部位を形成した場合、硫黄の酸化が起こる。この配置は、手前下の障害が少ないので可能となる。しかしベンゼン環の 3 位酸化反応は trigger の確率が一番少ないことと左下の障害のためゆっくりしか進行しないと考える。



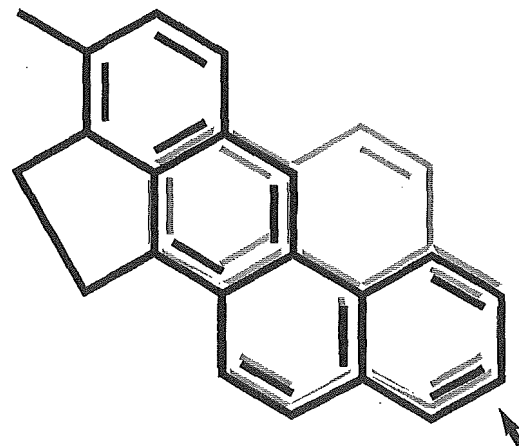
S-酸化の配置



・3-Methylcholanthrene の場合

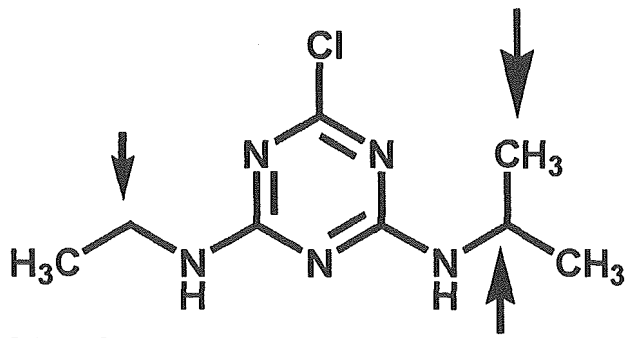
ヒト酵素について情報が不明であるが、ラットでは 1 位および 2 位が水酸化され、末端環の 9,10 および 11,12 が酸化によってエポキシドに変換される。3 位メチル基の水酸化も生成する。PAH で処置したラットの肝ミクロソームでは圧倒的に 2 位酸化が進行する。

Pyrene 則を適用すると 1 水酸化は下方右側が限度であるが、5 員環が酸化部位にはまる。9,10-oxide 生成反応は下図の配置で pyrene 則に適合する。



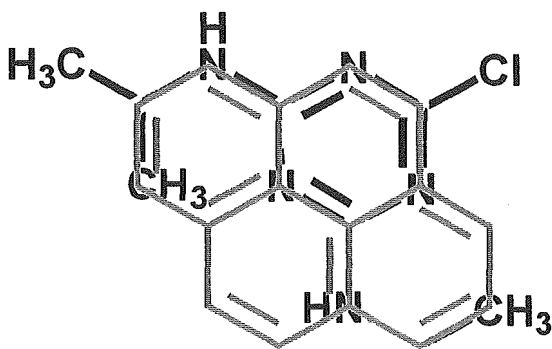
9,10-oxide 生成部位

・ Atrazine の酸化代謝



Atrazine

この物質は、矢印の部位が CYP1A2 によって酸化される。



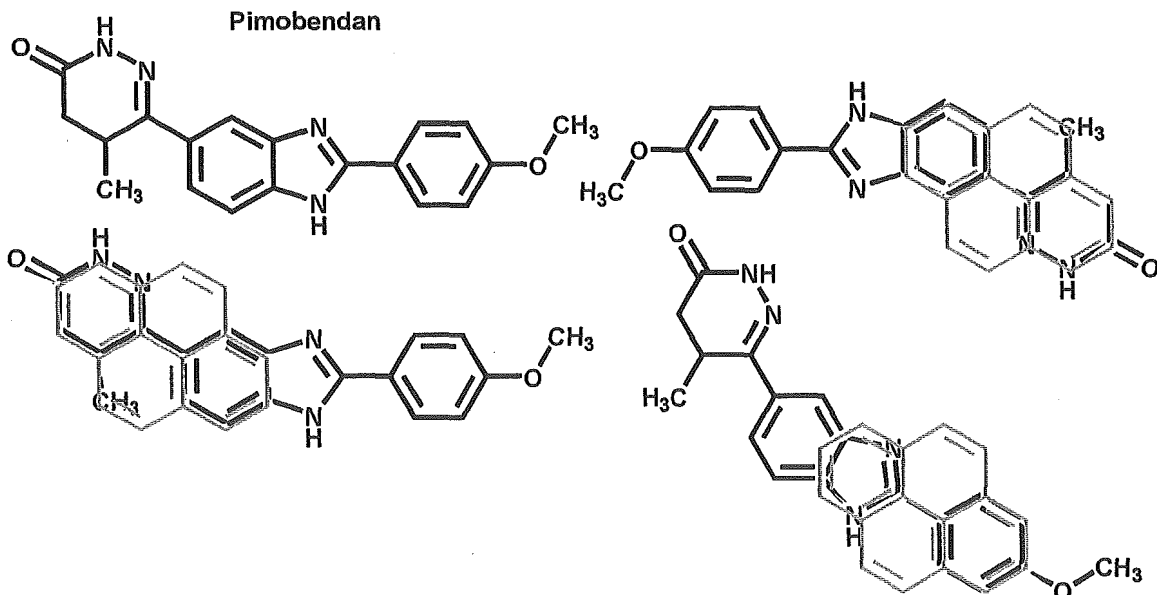
上図のようにクロル原子が関与しないで pyrene 則に当てはめることも可能で、特にエチル基が酸化される場合には適合は位置となる。Atrazine の trigger は弱い、トリアジン環が固定された場合、上の配置で主に脱アルキル化が進行すると予想できる。

・ Pimobendan の酸化反応

Pimobendan は平面性を保持しやすい性質を持つと考えられる。Pyrene 則を適用すると 3 カ所が予想できる。

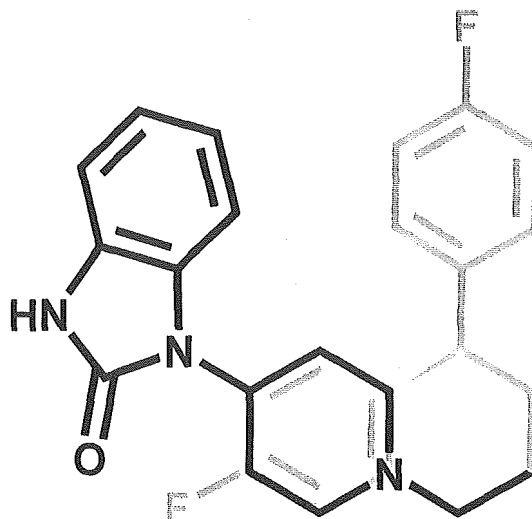
ここで左下の配置は酸化部位の先に長い基があるため不可となる。右上はうまく適合しているが、酸化部位がアミド構造のため不活性である。

唯一右下の構造は酸化部位にメトキシ基が配置される。この配置は回転による平面固定が不十分の可能性はあるが、benzimidazole 環と benzene が共役しており、比較的平面性を維持していると考えられる。



・ Pimozide の酸化反応

Pimozide は主に CYP3A4 によって N- 脱アルキル化される。この反応に CYP1A2 も弱いながら関与する。Fluorobenzene と Benzimidazole 誘導体が trigger 候補となる。Piperazine 環は平面から逸脱するので、許容範囲内に収める必要がある。Fluorobenzene が奥に回って配置される構造が想定される。いずれにせよ反応の進行は遅いと予想する。



3.考察と結論

薄い幅の CYP1A2 酸化部位にはまり込んだ下段立体配置で脱アルキル化が起きると予想される。

pyrene 則に基づいてヒト CYP1A2 の代謝可否と酸化部位の特定が可能となった。環境物質、天然物および医薬品について解析したデータから pyrene 周辺の環境を具体的な大きさ、空間としてとらえることができた。今後、ヒトによるマニュアル操作からコンピュータによる自動解析を行う手法の開発に着手する予定である。

C. 健康危険情報

特になし

D. 研究発表

1. 論文発表

Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morite T and Ema M (2005): In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutation Research*, 588, 129-135.

Suzuki H, Ikeda N, Kobayashi K, Terashima Y, Shimada Y, Suzuki T, Hagiwara T, Hatakeyama S, Nagaoka K, Yoshida J, Saito Y, Tanaka J and Hayashi M (2005): Evaluation of liver and peripheral blood micronucleus assays with 9 chemicals using young rats: A study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS)—Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Mutat Res*, 583, 133-145.

Hayashi M (2005): 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. *Environ Mutagen Res*, 27, 13-20.

Sofuni T, Nohmi T, Ohta T and Hayashi M (2005): Genotoxicity: Is a threshold concept applicable to evaluate the mutagenic activity of DNA-targeting substances!? *Environ Mutagen Res*, 27, 61-73. [in Japanese]

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E : Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat. *Drug Chem Toxicol*, (in press)

Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Ema M and Hasegawa R (2006): Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific $\alpha 2u$ -globulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *J Toxicol Sci*, 31, 35.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E and Ema M (2005): Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. *Congenit Anom (Kyoto)*, 45, 137-145, 2005.

Kawabe K, Saegusa H, Seto K, Urabe H and Motojima K (2005): Peroxisome proliferator-activated receptor α and its response element are required but not sufficient for transcriptional activation of the mouse heart-type fatty acid binding protein gene. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 1534-1546.

Nakamura T, Shibata N, Nishimoto-Shibata T, Feng D, Ikemoto M, Motojima K, Iso-O N, Tsukamoto K, Tsujimoto M and Arai H (2005): Regulation of SR-BI protein levels by phosphorylation of its associated protein, PDZK1: *Proc Natl Acad Sci USA*, 20, 13404-13409.

Sato O, Takanashi N and Motojima K : Third promoter and differential regulation of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes. *Mol Cell Biochem*, (in press)

- Araki M and Motojima K : Identification of ERR α as a specific partner of PGC-1 α for the activation of PDK4 gene expression in muscle. *FEBS J*, (in press)
- 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, 260-269.
- Katsuki M, Chuang VTG, Nishii K, Kawahara K, Nakayama H, Yamaotsu N, Hirono S and Otagiri M (2005): Use of Photoaffinity Labeling and Site Directed Mutagenesis for Identification of Key Residue Responsible for Extraordinarily High Affinity Binding of UCN-01 in Human Alpha 1-Acid Glycoprotein. *J Biol Chem*, 280, 1384-1391.
- Oda A, Yamaotsu N and Hirono (2005): S New AMBER Force-Field Parameters of Cytochrome P450s Determined by Quantum Chemical Calculations of Simplified Models. *J Comput Chem*, 26, 818-826.
- Osa Y, Hikima Y, Sato Y, Takino K, Ida Y, Hirono S and Nagase H (2005): Convenient Synthesis of Oxazolidinones by the Use of Halomethyloxirane, Primary Amine, and Carbonate Salt. *J Org Chem*, 70, 5737-5740.
- Ma S-F, Anraku M, Iwao Y, Yamasaki K, Kragh-Hansen U, Yamaotsu N, Hirono S, Ikeda T and Otagiri M (2005): Hydrolysis of Angiotensin II Receptor Blocker Prodrug Olmesartan Medoxomil by Human Serum Albumin and Identification of Its Catalytic Active Site. *Drug Metab Dispos*, 33, 1911-1919.
- Gouda H, Sunazuka T, Ui H, Handa M, Sakoh Y, Iwai Y, Hirono S and Omura S (2005): Stereostructure of luminamicin, an anaerobic antibiotic, via molecular dynamics, NMR spectroscopy, and the modified Mosher method. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(51), 18286-18291.
- Oda A, Tsuchida K, Takakura T, Yamaotsu N and Hirono S (2006): Comparison of Consensus Scoring Strategies for Evaluating Computational Models of Protein-Ligand Complexes. *J Chem Inf. Model*, 46, 380-391.
- Tsuchida K, Chaki H, Takakura T, Kotsubo H, Tanaka T, Aikawa Y, Shiozawa S and Hirono S (2006): Discovery of Nonpeptidic Small-Molecule AP-1 Inhibitors: Lead Hopping Based on Three-Dimensional Pharmacophore Model. *J Med Chem*, 49, 80-91.
- Yaguchi S, Fukui Y, Koshimizu I, Yoshimi H, Matsuo T, Gouda H, Hirono S, Yamazaki K and Yamori T (2006): A novel phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor, ZATK474, with potent antitumor activity and low toxicity. *J the National Cancer Institute*, (in press)
- Gouda H, Sunazuka T, Yoshida K, Sugawara A, Sakoh Y, Omura S and Hirono S (2006): Three-dimensional solution structure of EM703 with potent promoting activity of monocyte-to-macrophage differentiation. *Bioorg Med Chem Lett*, (in press)
- Ueda R, Iketaki H, Nagata K, Kimura S, Gonzalez FJ, Kusano K, Yoshimura T and Yamazoe Y : A common regulatory region functions bi-directionally in transcriptional activation of the human *CYP1A1* and *CYP1A2* genes. *Mol Pharmacol*, (in press)

2. 学会発表

- M. Hayashi : Strategy for evaluation and interpretation of genotoxicity for food and related chemicals, The Int Conf Environ & Genet Damage, The 12th Congress of the CEMS (Chongqing, People's republic of China), 中国重慶, 2005.
- 林 真 : Ames試験の結果をin silicoでいかに予測出来るか, またその精度は?, MMS研究会セミナー, 東京, 2005.
- 林 真, 鎌田栄一 : 化学物質安全性評価の為のカテゴリーアプローチ, 第一回カテゴリーシンポジウム, 東京, 2005.
- 林 真 : 毒性病理学に期待する-遺伝毒性の立場から -, 第21回毒性病理学会, 浜松, 2005.
- 広瀬明彦, 鎌田栄一, 高橋美加, 森田 健, 江馬 眞, 林 真 : In silico評価系を用いる化学物質遺伝毒性検出の戦略, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充 : ヒト細胞におけるDNA二本鎖切断修復の細胞周期依存性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 木本崇文, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 小林恒文, 笠原義典, 林 真, 本間正充 : ヒトリンパ芽球細胞TK6を用いたフラボノイド系サプリメント化合物のin vivo遺伝毒, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 真田尚和, 坂本浩子, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 林 真, 本間正充 : P53に依存したスピンドルポイズンのin vitro遺伝毒性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 本間正充, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 高島良生, 坂本浩子, 林 真 : DNA2本鎖切断によって誘発される相同染色体間組み換え, および遺伝子ターゲティング, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 高島良生, 櫻庭真弓, 小泉朋子, 坂本浩子, 林 真, 本間正充 : ヒト細胞におけるDNA2本鎖切断の細胞周期依存性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 鈴木 洋, 小川いずみ, 寺島ゆかり, 島田 康, 齋藤由希子, 田中 仁, 林 真 : 幼若ラット肝細胞小核試験 : 系統差の検討, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 浅野哲秀, D. Torous, S. Dertinger, C. Tometsko, 森田 健, 林 真 : AOおよびフローサイトメトリーを用いた低用量域での小核誘発について, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 森田 健, 祖父尼俊雄, 林 真, 田中憲穂, 中嶋 圓, 中西良文, 樋口政純, 石光 進, 小嶋 靖, 佐々木史歩, 森川 馨 : GHSにおける生殖細胞変異原性物質の分類, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 松藤 寛, 井上真由美, 千野 誠, 本間正充, 林 真, 山形一雄 : ヒトリンパ芽球細胞 TK6 を用いた抗酸化フラボノイド及びその酸化生成物の遺伝毒性, 第34回日本環境変異原学会, 東京, 2005.
- 林 真, 鎌田栄一, 広瀬明彦, 高橋美加, 森田 健, 江馬 眞 : 化学物質の安全性評価における(Q)SAR の利用, 日本動物実験代替法学会第19回大会, 2005
- Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Arima A, Ihara T. Teratology study of dibutyltin in cynomolgus monkeys given during organogenesis. The 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2006.
- 江馬 眞, 藤井咲子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一. 有機スズ化合物の生殖発生毒性 : ジブチルスズのマウ

- スにおける胚致死作用, 第7回環境ホルモン学会研究会, 2005.
- Ema M, Kimura E, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. EUROTOX 2005.
- Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Ema M. Susceptibility of new born rats to six chemicals, compared with young rats. EUROTOX 2005
- Hirose A, Aisaki H, Hara H, Takahashi M, Igarashi K, Kanno J, Ema M. DNA micro-array analysis of gene expressions in mice uterus exposed to dibutyltin dichloride during implantatio. The 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005).
- 江馬 眞, 福西克弘, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一. 紫外線吸収剤 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラットにおける発生毒性, 第32回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.
- 平田睦子, 楠岡 修, 西村信雄, 和田 肇, 緒方英博, 福田苗美, 伊藤義彦, 鎌田栄一, 江馬 眞, 長谷川隆一. 化学物質に対する新生児の感受性に関する研究: 1,3-ジブロモプロパン及び1,1,2,2-テトラブロモエタン, 第32回日本トキシコロジー学会学術年会, 2005.
- 江馬 眞, 原 洋明, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, プタノールのラットにおける発生毒性の検討. 第45回日本先天異常学会学術集会, 2005.
- 江馬 眞, OECD 神経発生毒性試験ガイドライン 426 (ドラフト) の進捗状況. 第45回日本先天異常学会学術集会 BT シンポジウム, 2005.
- Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.
- Tahara M, Kubota R, Nakazawa H, Hirose A, Ema M, Tokunaga H, Nishimura T. Evaluation for the additive toxic influence of organophosphorus pesticides The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.
- E. Komatsu, H. Shiraiishi and H. Yoshioka : Study on (Quantitative) structure-activity relationships of acute ecotoxicity based pattern recognition methods using fragment. SETAC North America 26th Annual Meeting, 2005, Baltimore, USA
- K. Motojima and S. Araki : PPAR α -dependent and independent induction of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in the mouse muscle: 3rd International Symposium on PPARs Efficacy and Safety, 2005/3, Monte Carlo, Monaco.
- 東 恭一郎, 本島清人, ミトコンドリアプロテアーゼ HtrA2 と PI3Kinase の相互作用. 第49回日本薬学会関東支部大会, 2005/10, 東京.
- 横井泰英, 本島清人, PPAR α アゴニストによって小腸で顕著に誘導される酵素 17 β HSD11 の性質. 第49回日本薬学会関東支部大会, 2005/10, 東京.
- 荒木 信, 浦辺宏明, 本島清人, 代謝変換酵素 PDK4 の PPAR α 依存的・非依存的誘導機構の解析. 第49回日本薬学会関東支部大会, 2005/10, 東京.

東恭一郎, 外山加奈, 本島清人, 小腸特異的脂肪酸輸送タンパク質4の酵素学的性質. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005/10.

横井泰英, 本島清人, PPAR α アゴニストによって小腸で誘導される 17 β HSD11 の解析. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005/10.

本島清人, 平井利武, PPAR α はある種の解毒システム発現に必須である. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005/10.

浦辺宏明, 本島清人, ラット肝癌細胞における L-FABP 遺伝子の転写調節. 第78回日本生化学会, 神戸, 2005/10.

荒木信, 本島清人, マウス PDK4 遺伝子は骨格筋において PGC-1 α /ERR α によって転写活性化される. 第28回日本分子生物学会, 福岡, 2005/12.

東恭一郎, 本島清人, ミトコンドリアプロテアーゼ HtrA2 と p110 β PI3-Kinase の相互作用. 第28回日本分子生物学会, 福岡, 2005/12.

松下周平, 山口智広, 本島清人, 廣瀬富美子, 大隈 隆, 脂肪滴に局在する新規 PAT ドメインタンパク質 NPAT1 の機能解析. 第28回日本分子生物学会, 福岡, 2005/12.

中込 泉, 山乙教之, 広野修一, PPAR α リガンドに対する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 (大阪), 2005.11.16, [第33回構造活性相関シンポジウム講演要旨集, p.147-150, 2005.11]

山添康, Chemical Approach to Predict Metabolism of CYP2Cs. ISSX-JXXS meeting, Maui, 2005/10/23

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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)

Ⅱ. 分担研究報告書

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)

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
研究協力者	高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室	リサーチアシスタント
研究協力者	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
研究協力者	秋山 浩子	(株)シーティシー・ラボラトリーシステムズ		
研究協力者	中嶋 圓	(財)食品農医薬品安全性評価センター		
研究協力者	益森 勝志	(財)食品農医薬品安全性評価センター		

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チャートの作成を目的としている。

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ことが判明した。

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。また、フローチャート改良の為の文献調査を行った。

A. 始めに

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チャートを作成することにある。

本年度は、昨年度に引き続き染色体試験用の (Q)SAR モデルの精度向上を行い、その精度を比較し、昨年提案した染色体用フローチャートの信頼性を検討した。

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を使用して Toxicophore の抽出を行い、更に、反復投与試験における各種毒性指標における Toxicophore の抽出も行い、新しい (Q)SAR モデルの構築を試みた。

AMES 試験において文献上の結果と *in Silico* での結果で差異が見られた化学物質について再実験を行い Alert 作製の一助とした。また、安全性評価と (Q)SAR に関する文献調査を行い、今後のフローチャートの改良のための資料とした。

B. 研究報告

1. DEREK のバージョンアップにおける信頼性の変化(AMES 試験)

1. 1. 方法

(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 について比較検討した。

検討には、厚生労働省の既存化学物質安全性点検事業で得られた AMES 試験結果を用いた。

検討には、構造式が Input できた 232 物質を用いた。

1. 2. 結果及び考察

既存化学物質安全性点検事業のデータをもとに Ver.7、Ver.8.01 および Ver.9.00 について精度を検証した結果を表 1～3 に示す。