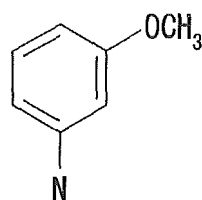


表 1 DEREK Ver.7.00 の信頼性

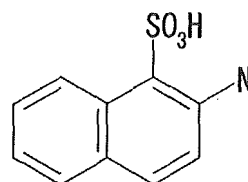
		Ver.7.00			
		+	-		
試験結果	+	32	21	11	65.6% (Sensitivity)
	-	200	22	178	89.0% (Specificity)
		232	43	189	85.8% (Concordance)



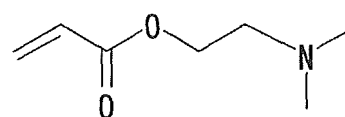
3-メキシベンゼナミン

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)



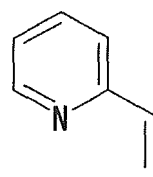
2-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸



アクリル酸 2-(ジメチルアミノ)エチルエステル

表 3 DEREK Ver.9.00 の信頼性

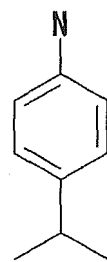
		Ver.9.00			
		+	-		
試験結果	+	32	21	11	65.6% (Sensitivity)
	-	200	14	186	93.0% (Specificity)
		232	35	197	89.2% (Concordance)



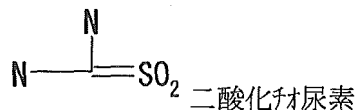
2-ビニルピリジン

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。

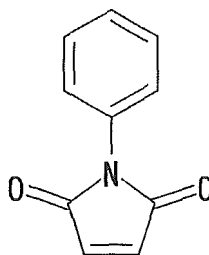
表が示すようにバージョンが上がるにつれ、試験結果陽性化合物で計算結果が陽性を示す割合 (Sensitivity) には変化が見られなかったが、試験結果陰性化合物で計算結果が陰性を示す割合 (Specificity) および試験結果と同じ結果を示す割合 (Concordances) については、その精度の向上が見られた。今後は Sensitivity の向上のために、試験結果陽性で計算結果陰性 [偽陰性] の 11 化合物の Alert を特定し、開発元の LHASA 社と協同で DEREK の改良を行う事とした。下記に 11 化合物の名称と構造式を列挙する。



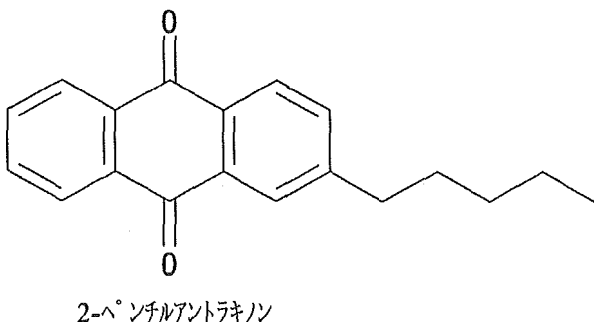
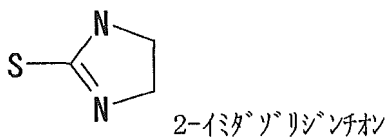
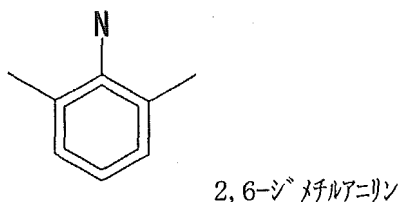
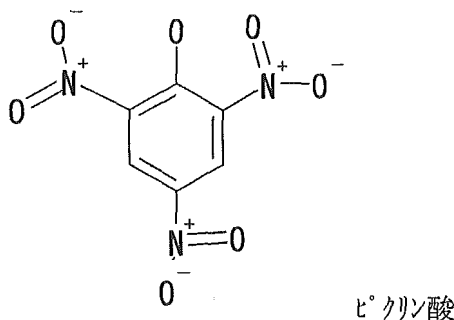
4-(1-メチルエチル)アニリン



二酸化チオ尿素



1-フェニル-1H-イミダゾール-2,5-ジオン



2. 染色体試験における(Q)SAR モデルの比較

2. 1. 方法

既存化学物質点検品目選定の為のフロー作製に使用する (Q)SAR モデルは、OECD の QSAR 専門家会議 (36th Joint Meeting, 4th-6th February 2004) において検討対象とされた SAR モデル (DEREK, MultiCase) と、日本で開発しているモデル (AdomeWorks) の計 3 モデルを使用した。染色体試験用のモデルの精度は、昨年度の成績では不十分なことから、さらなる改良を行ったので、その最新バージョンを用いて検証を行った。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、MCase、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%、全体の一致率 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。

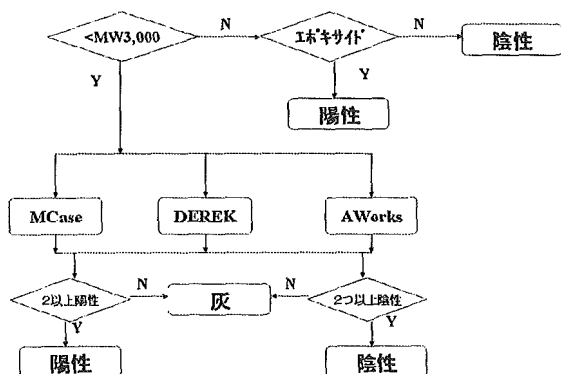


図1 AMES試験判定フローチャート

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)

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

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)

場合では 36.1%で、2 つ以上の場合(85.8%)の約半分以下であった。

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

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を使用して Toxicophore を抽出し、各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。

今年度は、文献から染色体試験を収集し、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 の抽出を行った。

4.1. 方法

4.1.1. 染色体異常に關与するToxicophore抽出

4.1.1.1. トレーニングデータセットのクラス分け

染色体異常試験データトレーニングデータセット1816化合物(既存化学物質、Kirklandらのデ

ータ、染色体異常試験データ集-改訂1998年度版-) に対して、ClassPharmer Suite v.3.5 Compound Classifier(ClassPharmer, Bioreason社製)を用いて最大共通部分構造 (MCS : Maximum Common Substructure) に基づいた化合物の分類を行った。今回は、異なる12条件によりクラス分けを行った。

クラス分け12条件の結果より、1クラスに3化合物以上所属、染色体異常平均値が0.8以上、Homogeneity値が0.5以上のクラスに対して優先順位付けを行った。優先順位付けられたクラスのMCSに対して、評価用70化合物(陽性33化合物、陰性37化合物)に対する共通骨格一致率の傾向を分析した。

4.1.1.2. 染色体異常活性に対する構造活性相関の解析とToxicophoreの特定

4.1.1.1.で特定された染色体異常活性の高いMCS123個に対して、置換基と染色体異常活性との相関に対する知見を得るため、RtableGeneratorを用いてMCSを中心としたR-tableを作成した。更に、SARXtractorを用いてSARルールの抽出を行った。

また、2.でClass Modelが作成されたクラスのMCSを中心に同様にR-table作成とSAR抽出を行った。

4.1.1.3. 目視によるToxicophoreの特定

更により多くの情報を引き出すため、染色体異常活性の高いMCS123個を目視により解析し、Toxicophore特定を行った。

4.1.2. 染色体異常に対する予測モデルの構築

4.1.2.1. 予測モデルの構築

4.1.1.で作成された染色体異常試験データトレーニングデータセット1816化合物のクラス分け12条件の結果から、ClassPharmerを用いて予測モデルの計算を行った。計算された R^2 平均値や Q^2 平均値から、最適なモデル作成条件の検討を行った。

4.1.2.2. 予測精度の評価

4.1.2.1で R^2 値と Q^2 値の和が高い予測モデル4条件に限定し、既知の染色体異常活性データに対して評価を行った。既存化学物質230化合物(陽性または擬陽性106化合物、陰性化合物124化合物)を評価に用いた。

4.1.2.3. 最適な予測条件の検討

染色体異常活性に対する予測正答率を上げるために、複数予測モデルをフローチャートにより組み合わせることで、最低な予測条件の検討を行った。その際に、評価用70化合物(陽性33化合物、陰性37化合物)を用いた予測精度の評価を行った。

4.1.3. 28日間反復投与毒性試験に対する解析

4.1.3.1. トレーニングデータセットのクラス分け

トレーニングデータセットには、ラット経口投与28日間反復投与毒性試験データ[748化合物]を用いて、ClassPharmerを用いてMCSに基づいた化合物の分類を行った。毒性Endpointの種類には、神経毒性学的所見、血液学的所見(RBC/Hgb)、血液生化学的所見(GOT/GPT、BUN/CRN、CHO/TG)、臓器重量変化(肝、腎、甲状腺、脾臓、胸腺、胃、腸、精巣、心臓、副腎、骨髄)がある。

4.1.3.2. 予測モデルの構築と評価

全Endpointに対するClassModelerを用いて予測モデル構築と予測精度の評価を行った。評価は、DiscoveryGate (MDL社) の検索結果を用いた。

4.1.3.3. Toxicophoreの特定

4.3.1.でクラス分けした結果に対して、R-tableの作成とSARルールの抽出を行い、SARルールの抽出できたクラスからToxicophoreの特定を試みた。

4.2. 結果

4.2.1. 染色体異常活性に関するToxicophore抽出

4.2.1.1. トレーニングデータセットのクラス分け

クラス分けした結果から、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MCS123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。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MCS123個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。

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%)

4.2.2. 染色体異常活性に対する構造活性相関の解析とToxicophoreの特定

4.2.1で特定された染色体異常活性の高いクラスのMCS、また2.でClass Modelが作成されたクラスのMCSを中心に解析した結果、8個のToxicophoreが特定された。その一部を図2に示した。

4.2.3. 目視によるToxicophoreの特定

更に目視により新規Toxicophoreの特定を試みた。その結果、更に21個のToxicophoreが特定された。その一部を図3に示した。

図2 Toxicophore (SAR解析による特定)

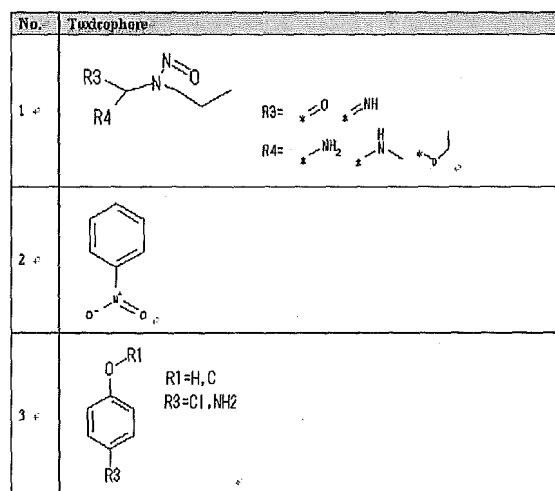
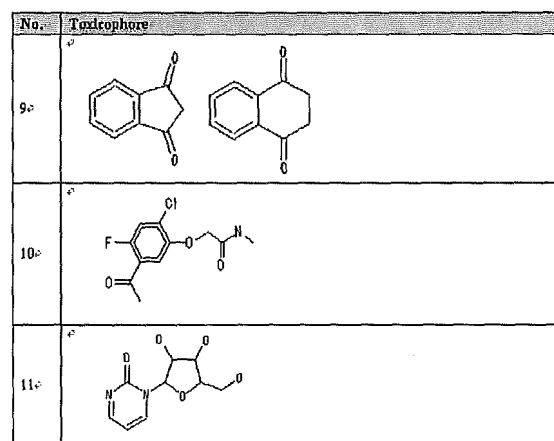


図3 Toxicophore (目視による特定)



4.2.3. 染色体異常に対する予測モデルの構築

4.2.3.1. 予測モデルの構築

トレーニングデータセットに対して、様々なモデル作成条件によるモデル構築した際に得られたR²値とQ²値を表11に示した。

表11 モデル構築条件と結果

Model	S R ²	S Q ²	S R ² +SQ ²	C R ²	C Q ²	C R ² +CQ ²	Model Option
6-0	0.67	0.6	1.27	0.765846	0.690308	1.456154	CART, G, Atom
6-1	0.6	0.6	1.2	0.759597	0.675641	1.435238	CART, G, 2D
6-2	0.58	0.56	1.14	0.767063	0.631413	1.398476	CART, E, Atom
6-3	0.55	0.55	1.1	0.745875	0.631167	1.377042	CART, E, 2D
6-4	0.76	0.61	1.37	0.766073	0.626021	1.392094	kNN, Atom
6-5	0.71	0.56	1.27	0.756937	0.613777	1.370714	kNN, 2D
9-0	0.67	0.6	1.27	0.87	0.795682	1.665662	CART, G, Atom
9-6	0.67	0.6	1.27	0.91625	0.869688	1.785938	CART, G, 2D
9-7	0.58	0.56	1.14	0.908644	0.84407	1.752714	CART, E, Atom
9-8	0.55	0.55	1.1	0.912759	0.865	1.777759	CART, E, 2D
9-9	0.76	0.61	1.37	0.865816	0.783878	1.649694	kNN, Atom
9-10	0.71	0.56	1.27	0.842755	0.785408	1.628163	kNN, 2D

S R²: Summary Class ModelのR²値
 S Q²: Summary Class ModelのQ²値
 C R²: Class ModelのR²値
 C Q²: Class ModelのQ²値

4.2.4. 予測精度の評価

表11で赤塗りのセル、つまりR²値とQ²値の和が高い予測モデル4条件に限定し、評価用化合物を用いて予測精度の評価を行った。最も予測精度の高かったkNNモデルではPositive正答率が83.0%、Negative正答率が77.9%であった。また、最も予測精度の高かったCART-likeモデルではPositive正答率が75.5%、Negative正答率が69.7%であった

上記で予測精度の高かったモデルに対して、5通りの予測条件により、最も高精度な結果ではPositive正答率が85.9%であった。

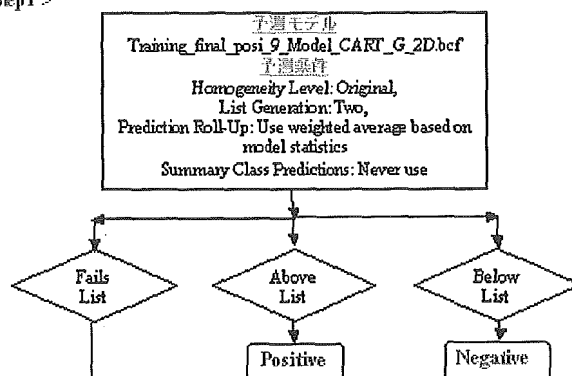
4.2.5. 最適な予測条件の検討

4.2.4.で最も予測精度の高かったkNNモデルとCART-likeモデルに、予測精度の高かった予測条件について、3通りのフローチャートを考案した。フローチャートの1例を図4に示す。各フローチャートにおける評価結果を以下の表12に示した。その陽性一致率が高いのはフローチャート2、陰性一致率が高いのがフローチャート3の場合となった。

また、表12の各フローチャートによる予測正答率と、4.2.4.でモットもPositiveとNegative正答率が高かったkNNモデルを単体利用した場合の予測正答率を表13に示した。

フローチャート1

< Step1 >



< Step2 >

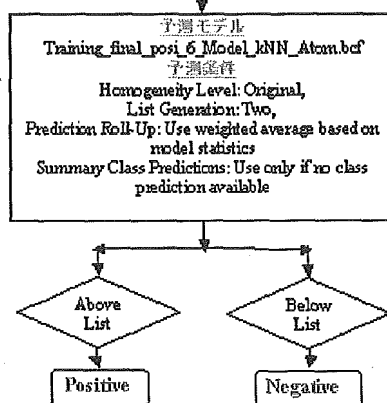


図3 フローチャート1の流れ

表12 各フローチャートにおける予測精度

フローチャート	1	2	3
Positive 正答率 (%)	0.7576	0.7879	0.7272
Negative 正答率 (%)	0.7568	0.6486	0.7837
Concordance	0.7571	0.7143	0.7571

表13 kNNモデル単体利用時の予測精度

Class Model 適用数	31+35=66
Positive 正答率	25/33=0.757576
Negative 正答率	25/37=0.67567
Concordance	50/70=0.71428

4.3. 28日間反復投与毒性試験に対する解析

4.3.1. トレーニングデータセットのクラス分け

予測モデルを構築する前提で、2.で採用された予測モデル構築時のクラス分け2条件により、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。

1つ目のクラス分け条件 (Homogeneity: Minimal, Ring Closure/Atom Matches: Fuzzy/Fuzzy) では、作成されたClass数55個、Subclass393個、Singleton6個であった。

また2つ目のクラス分け条件 (Homogeneity: Medium, Ring Closure/Atom Matches: Exact/Exact) では、作成されたClass数130個、Subclass68個、Singleton245個であった。

4.2.4. 予測モデルの構築と評価

予測モデルの構築は、1つ目のクラス分け条件にはkNNモデルを、2つ目のクラス分け条件にはCART-likeモデルの作成した。その結果、kNNモデルでは全てのEndpointに対してClass Modelが計算されたが、CART-likeモデルでは陽性化合物数の多いLiver (肝臓)、Kidney (腎臓) 等一部のEndpointに絞って予測モデル構築を試みた。

1つ目のクラス分け条件からは多数のClass Modelが生成したものの、クラスが持つMCSが小さいため、外部化合物に対する予測精度が低くなること、またClass Modelが生成したクラスのMCSに基づいてToxicophoreを抽出することが困難になる可能性が懸念された。そのため1つ目のクラス分け条件のHomogeneityをHighにし、MCSの大きさを拡大した設定でクラス分けを実行し、Weight Liver (肝重量)、Weight Kidney (腎重量)、Liver(肝臓)、Kidney (腎臓) に対して、CART-likeモデルの作成を行った。

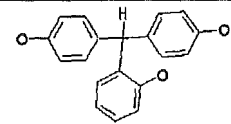
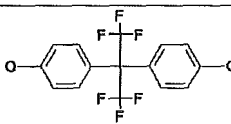
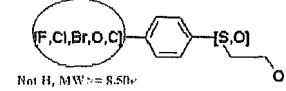
評価用化合物を用いたPositive正答率で最も高かったのが、Weight Liver (肝重量) モデルで78.7%、次いでWeight Kidney (腎重量) モデルで61.5%であった。

4.2.5. Toxicophoreの特定

R-table作成とSARルール解析の結果、Adrenal (副腎) は2個、GOT/GPTは1個、RBC/Hbは1個、Spleen (脾臓) は1個、Kidney (腎臓) は1個、Weight Kidney (腎重量) は2個、Liver (肝臓) は6個、Weight Liver (肝重量) は7個のToxicophoreが特定された。それ以外の、神経系、GOT/GPT、BUN/CRN、Cho/TG、胸腺、胃、腸、精巣、骨髄については陽性化合物数が少ないため、SARルールの抽出が困難であり、Toxicophoreを特定することはできなかった。

ここで特定されたToxicophoreの一例を図5に示す。

図5 28日間反復投与毒性Endpointに対するToxicophore

Endpoint	No.	Toxicophore
Adrenal	1.	
	2.	
GOT/GPT	1.	 Not H, MW = 8.50

4.3. 考察

染色体試験に関しては、全29個の染色体異常活性に相関するToxicophoreが抽出された。SARルール解析により抽出されたToxicophoreについては、ニトロベンゼン・フェノール誘導体のように、シンプルなToxicophoreとなった。これらのToxicophoreは既存の(Q)SARモデルの精度を改良する上で有用な情報になる。

例えば、芳香族ニトロ化合物が定義されているToxicophoreは、DEREK for Windows ver.8.0.1に、Alert105 Aromatic nitro compound (Carcinogenicity), Alert329 Aromatic nitro compound (Mutagenicity)として登録されているが、Endpoint Chromosome damageにリンクさせても良いのでは

ないかと考えられる。また、フェノール又はその誘導体は DEREK for Windows ver.8.0.1 で Alert470 phenol (Chromosome damage)と Alert 439 phenol or precursor (skin sensitization)として登録されている。そこで、今回特定された Toxicophore の情報により、既存 Alert を補足できる可能性があると考えられるので、今後は DEREK 開発元の Lhasa 社にも提案を行う予定である。

但し、現時点では特定された Toxicophore について詳細に Validation が行われていないため、これらは Toxicophore の素案として捉えた方が良い。更に染色体異常誘発のメカニズムと照らし合わせた上での精査も必要である。

将来的に評価用化合物が多数集まった段階で、各 Toxicophore を Query にした部分構造検索による Validation を行うことで、より正確な Toxicophore の特定ができると考えられる。

次に2.の染色体異常の予測モデル構築では、ClassPharmerの1モジュールである ClassModeler を使用して QSAR モデル構築を行った。市販の QSAR モデルと大きく異なる点は、トレーニングデータセットを先ず MCS に基づいたクラスに分類し、各クラスから Class Model を計算できるところである。そのため、Class Model 予測に適用された化合物に対しては非常に高精度に予測できることが特徴である。しかし、Class Model 予測に適用されなかった化合物については、トレーニングデータセット全体から計算される Summary Class により予測することができる。そのため、市販の QSAR モデルのように、予測不能の判定を避けることも可能である。

今回は様々なクラス分け条件による結果から、モデル構築を試みたが、クラス分け時に Homogeneity レベルを低く、Ring Closures/Atom Matches を Fuzzy にするほど作成される Class Model 数は増加するが、Class Model の R^2 値と Q^2 値は低くなると考えられる。これとは逆に Homogeneity レベルを高く、Ring closures/Atom Matches を Exact にするほど R^2 値と Q^2 値は高くなるが、作成される Class Model 数は現象する傾向が見られた。

最適な予測条件を検討した結果、精度の高いモデルを単体利用するよりも、フローチャートで2種類のモデルを組合せた方がより高い予測率を出すことができた。

フローチャート1では Positive 正答率と Negative 正答率がほぼ同じでバランスがとれており、フローチャート2では Positive 正答率が最も高く、フローチャート3では Negative 正答率が最も高い結果が得られた。どのフローにより予測を行うかは、陽性化合物をより高い確率で見つけたいか、また陰性化合物をより高い確率で見つけたいか、ケースに応じて使い分けることが最善ではないかと考えられる。

3.の28日間反復投与毒性試験に対する解析では、Derek for Windows をはじめ市販の毒性予測システムではあまりカバーされていない領域の毒性に対して、構造活性相関を見出すという試みであった。

本研究で用いたトレーニングデータセットには、染色体異常活性の解析に用いたトレーニングデータセットよりも圧倒的に陽性化合物数が少なかったため、ClassPharmer で分類した後、活性分布形状から解析すること、Class Model 構築や SAR ルールの抽出が比較的困難であった。また、肝毒性や腎毒性など一般毒性では毒性発現が構造以外の多数の要因に起因することが知られているが、ClassPharmer で扱えるのは2D構造情報と限界があるため、本研究で作成された予測モデルや 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する必要がある。

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

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

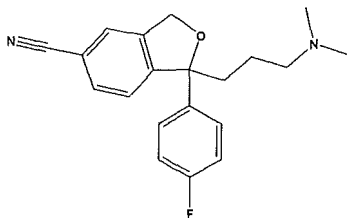
(Q)SAR モデルで陽性を示した 3 化合物、計 13 化合物について、(Q)SAR モデルの信頼性向上の目的の為に AMES 試験を行った。

5.1. 方法

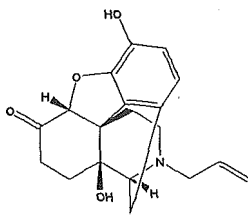
5.1.1. 化合物

①～⑩の化合物については、Ames 試験陽性で *in silico* システム陰性であり、□～□の化合物については、Ames 試験陰性で *in silico* システム陽性である。

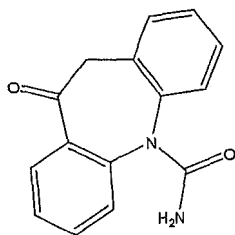
① Citalopram (Citalopram Hydrobromide)、CAS No.: 59729-33-8、分子量: 405.30、ロット番号: 095K1314、純度: 99.8%、Sigma-Aldrich) はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した。



② Naloxone (Citalopram Hydrobromide)、CAS No.: 465-65-6、分子量: 327.38、ロット番号: L0B124、純度: 100%、USP) は DMSO に溶解した。

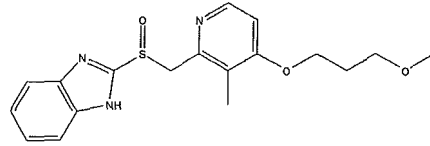


③ Oxcarbazepine (CAS No.: 28721-07-5、分子量: 252.27、ロット番号: 074K4702、純度: 98%、Sigma-Aldrich) は DMSO に溶解した。

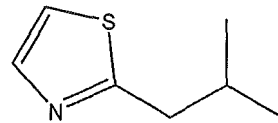


④ Rabeprazole (CAS No.: 117976-89-3、分子量:

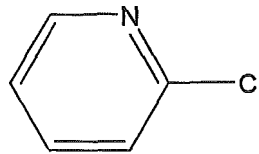
359.44、ロット番号: 23925605、純度: 98.87%、LKT Laboratories) は DMSO に溶解した。



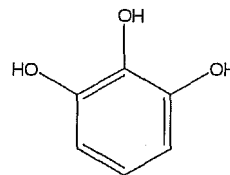
⑤ 2-(2-Methylpropyl) thiazole (CAS No.: 18640-74-9、分子量: 141.24、ロット番号: A0041592、純度: 99.8%、ACROS) は DMSO に溶解した。



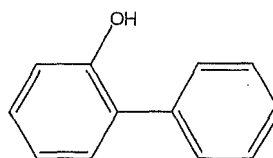
⑥ 2-Chloropyridine (CAS No.: 109-09-1、分子量: 113.55、ロット番号: A0189528、純度: 99.7%、ACROS) は DMSO に溶解した。



⑦ Pyrogallol (CAS No.: 87-66-1、分子量: 126.11、ロット番号: 702W2153、純度: 100.0%、関東化学) は水に溶解した。

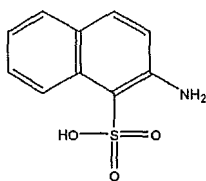


⑧ O-Phenylphenol (2-Phenylphenol, CAS No.: 90-43-7、分子量: 170.21、ロット番号: 04415MC、純度: 99.9%、Sigma-Aldrich) は DMSO に溶解した。

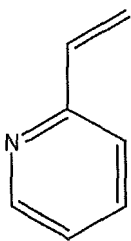


⑨ 2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid (CAS No.:

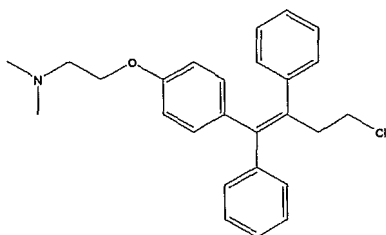
81-16-3、分子量: 223.25、ロット番号: 602C2120、純度: 99.4%、関東化学) は DMSO に溶解した。



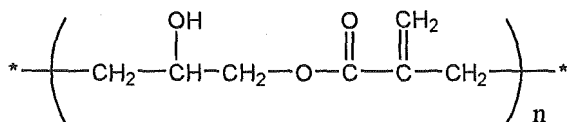
- ⑩ 2-Vinylpyridine (CAS No.: 100-69-6、分子量: 105.13、ロット番号: A0201406、純度: 98.9%、ACROS) は DMSO に溶解した。



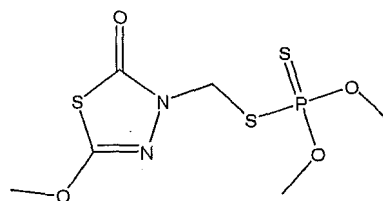
- ⑪ Tremifene (CAS No.: 89778-26-7、分子量: 405.96、ロット番号: 2396806、純度: 99.20%、LKT Laboratories) は DMSO に溶解した。



- ⑫ Poly (2-hydroxypropyl methacrylate) (CAS No.: 25703-79-1、ロット番号: A0132652、ACROS) は DMSO に溶解した。



- ⑬ Methidathion (CAS No.: 950-37-8、分子量: 302.3、ロット番号: 31007、純度: 98.2%、関東化学) は DMSO に溶解した。



5.1.2. 試験菌株

試験菌株はネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98 及び TA100 の 2 菌株を使用した。陰性結果となったものについてはさらに、ネズミチフス菌の TA1535、TA1537 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA の 3 菌株を用いた。入手した菌株は Ames ら¹⁾ 及び Maron ら²⁾ の方法に従い、遺伝的性質を調べた後、遺伝的性質が適切である菌株を保存した。保存は、静止期まで培養した菌前培養液に DMSO を 8.0% になるように加え、凍結用バイアルに小分けし -80°C で保存した。試験には小分けした保存菌株を解凍し、解凍菌液をニュートリエントブロス (OXOID #2) に 1/500 の接種量で植え、37°C で 8 時間振盪培養 (静止期の初期に相当する) した菌前培養液を用いた。

5.1.3. S9 及び S9 mix

S9 mix はフェノバルビタール及び 5,6-ベンゾフラボンで酵素誘導した Sprague-Dawley ラットの肝臓より調製された市販品 (キッコーマン株式会社製造) を購入して用いた。

S9 mix の組成は、4 mM NADPH、4 mM NADH、5 mM G-6-P、8 mM MgCl₂、33 mM KCl、100 mM ナトリウム・リン酸緩衝液 (pH7.4)、10% S9 である。

5.1.4. 溶媒および被験物質溶液の調製

化合物口は、水に可溶であるので、溶媒として日局注射用水を用いた。化合物口以外は、DMSO に可溶であるので、溶媒として DMSO を用いた。連続希釈により被験物質液を調製した。プレートあたり被験物質液を 100 μ L 添加した。

5.1.5. 復帰突然変異試験

平成11年11月1日付け、医薬審第1604号厚生省医薬安全局通知「医薬品の遺伝毒性試験に関するガイドラインについて」に基づき、Amesら¹⁾及びMaronら²⁾の方法に準拠し、以下の示したプレインキュベーション法³⁾で実施した。

被験物質溶液、溶媒または陽性対照物質溶液0.1mlとS9 mixあるいは0.1M Na-リン酸緩衝液0.5mlとテスト菌株の前培養液0.1mlを試験管に入れ、良く混合し37℃で20分間、恒温槽中で振盪した(プレインキュベーション)。プレインキュベーションした後、2mlのトップアガーを加え、ただちに最少グルコース寒天平板培地(プレート)上に広げて固めた。固化したプレートを37℃で48時間、恒温培養器で上下を転倒し遮光して培養した後、被験物質の試験菌株への抗菌作用(生育阻害)並びに被験物質の沈殿状況を調べ、復帰変異コロニー数を測定した。

5.1.6. 判定基準

復帰変異数が陰性対照値の2倍以上に復帰変異コロニー数が誘発される場合に、陽性と判定した。上記の条件が満たされない場合は陰性と判定した。

5.2. 結果

①Citalopram

2菌株(TA100、TA98)を用いた試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施したが、溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は代謝活性化による場合(+S9)、及びよらない場合(-S9)のいずれの場合においても認められなかった。さらに3菌株(TA1535、TA1537、WP2uvrA)を用いた追加試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施した結果、+S9のTA1535株において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。用量依存性が認められなかったため、確認試験を実施した結果、溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められなかった。したがって、陰性結果と判断したため、*in silico* システムの結果と一

致した。

②Naloxone

2菌株(TA100、TA98)を用いた試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施したが、溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は代謝活性化による場合+S9及び-S9のいずれの場合においても認められなかった。さらに3菌株(TA1535、TA1537、WP2uvrA)を用いた追加試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施した結果、+S9及び-S9のTA1535株において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、陽性結果と判断したため *in silico* システムの結果とは一致しなかった。

③Oxcarbazepine

2菌株(TA100、TA98)を用いた試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施したが、溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9及び-S9のいずれの場合においても認められなかった。さらに3菌株(TA1535、TA1537、WP2uvrA)を用いた追加試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施した結果、-S9のTA1535株において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、陽性結果と判断したため *in silico* システムの結果とは一致しなかった。

④Rabeprazole

2菌株(TA100、TA98)を用いた試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施したが、溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9及び-S9のいずれの場合においても認められなかった(表8)。さらに3菌株(TA1535、TA1537、WP2uvrA)を用いた追加試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施した結果、-S9のTA1535株において溶媒対照値の2倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、陽性結果と判断したため *in silico* システムの結果とは一致しなかった。

⑤2-(2-Methylpropyl) thiazole

2菌株(TA100、TA98)を用いた試験において、最高用量5000 µg/プレートまで実施した結果、

+S9 の TA100 株において溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、陽性結果と判断したため *in silico* システムの結果とは一致しなかった。

⑥2-Chloropyridine

2 菌株 (TA100、TA98) を用いた試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施した結果、+S9 の両菌株において溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、したがって、陽性結果と判断したため *in silico* システムの結果とは一致しなかった。

⑦Pyrogallol

2 菌株 (TA100、TA98) を用いた試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施した結果、+S9 及び-S9 の TA100 株、ならびに-S9 の TA98 において溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、陽性結果と判断したため *in silico* システムの結果とは一致しなかった。

⑧O-Phenylphenol

2 菌株 (TA100、TA98) を用いた試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9 及び-S9 のいずれの場合においても認められなかった。さらに 3 菌株 (TA1535、TA1537、WP2*uvrA*) を用いた追加試験においても最高用量 5000 μg /プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9 及びよらない場合-S9 のいずれの場合においても認められなかった。したがって、陰性結果と判断したため、*in silico* システムの結果と一致した。

⑨2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid

2 菌株 (TA100、TA98) を用いた試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施した結果、+S9 の TA100 株において溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、陽性結果と判断したため *in silico* システムの結果とは一致しなかった。

⑩2-Vinylpyridine

2 菌株 (TA100、TA98) を用いた試験において、

最高用量 5000 μg /プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9 及び-S9 のいずれの場合においても認められなかった。さらに 3 菌株 (TA1535、TA1537、WP2*uvrA*) を用いた追加試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施した結果、+S9 の TA1535 株において溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、陽性結果と判断したため *in silico* システムの結果とは一致しなかった。

⑪Tremifene

2 菌株 (TA100、TA98) を用いた試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9 及び-S9 のいずれの場合においても認められなかった。さらに 3 菌株 (TA1535、TA1537、WP2*uvrA*) を用いた追加試験においても最高用量 5000 μg /プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9 及び-S9 のいずれの場合においても認められなかった。したがって、陰性結果と判断したため、*in silico* システムの結果とは一致しなかった。

⑫Poly (2-hydroxypropyl methacrylate)

2 菌株 (TA100、TA98) を用いた試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9 及び-S9 のいずれの場合においても認められなかった。さらに 3 菌株 (TA1535、TA1537、WP2*uvrA*) を用いた追加試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施した結果、+S9 の TA1535 株において溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇が認められた。したがって、陰性結果と判断したため、*in silico* システムの結果とは一致しなかった。

⑬Methidathion

2 菌株 (TA100、TA98) を用いた試験において、最高用量 5000 μg /プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9 及び-S9 のいずれの場合においても認められなかった。さらに 3 菌株 (TA1535、TA1537、

WP2_{uvrA}) を用いた追加試験においても最高用量 5000 µg/プレートまで実施したが、溶媒対照値の 2 倍以上の復帰変異コロニー数の上昇は+S9 及び -S9 のいずれの場合においても認められなかった。

したがって、陰性結果と判断したため、*in silico* システムの結果とは一致しなかった。

以上の結果を表 14 にまとめた。

Table 14 Exceptional chemicals that showed Ames test gave positive but all three *in silico* systems (DEREK, MCase, AWorks) gave negative and Ames test gave negative but all three systems gave positive.

Compound	CAS No.	Ref. Result	Test Result	DEREK	MCase	Aworks
①Citalopram	59729-33-8	+	—	—	—	—
②Naloxone	465-65-6	+	+	—	—	—
③Oxcarbazepime	28721-07-5	+	+	—	—	—
④Rabeprazole	117976-89-3	+	+	—	—	—
⑤2-(2-Methylpropyl) thiazole	18640-74-9	+	+	—	—	—
⑥2-Chloropyridine	109-09-1	+	+	—	—	—
⑦Pyrogallol	87-66-1	+	+	—	—	—
⑧o-Phenylphenol	90-43-7	+	—	—	—	—
⑨2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	81-16-3	+	+	—	—	—
⑩2-Vinylpyridine	100-69-6	+	+	—	—	—
⑪Toremifene	89778-26-7	-	-	+	+	+
⑫Poly(2-hydroxypropyl methacrylate)	25703-79-1	-	-	+	+	+
⑬Methidathion	950-37-8	-	-	+	+	+

5.3. 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、復帰突然変異試験が陰性となった 2 化合物については、ガイドラインを基に試験を実施しても陰性であることから、*in silico* システムでの陰性結果を支持するものと考え。また、Ames 試験陰性で *in silico* システム陽性である 3 化合物すべてが復帰突然変異試験で陰性となった。このことから、試験条件（代謝活性化系における補酵素の量あるいは S9 の種類および添加量）を変えることにより、復帰突然変異試験で陽性になる可能性は残されるが、条件設定を考慮した実験を構築するのは現実的でないと考え。むしろ、他のバッテリー試験を実施した方が遺伝毒性を検出できる可能性があり、*in silico* システムの陽性結果を支持できる可能性がある。なお、Ames 試験陽性で *in silico* システム陰性である 10 化合物の内、復帰突然変異試験が陽性となった 8

化合物については、*in silico* システムに対しデータベースを追加していくことで一致率が上がると考えられる。

6. 安全性評価と(Q)SARに関する文献調査

安全性評価における(Q)SARに関する文献を、PubMedを用いて検索を行ったので、その要約を下記に列挙する。

Juranic ら (2006) は、ラットにおける *in vivo* の急性毒性について、19 種類の N-alkyl 及び N-cycloalkyl fluorocetamides [F-CH(2)-C(O)-NH-R] の構造的な相関を示した。用いた記述子は、化合物の分子量 (M(w)) 及び生成熱 (DeltaH(f))、分子全体のモル屈折度 (CMR)、親油性 (ClogP)、Broto lipol 値、virtual logP、分子の脂肪親和性 (MLP)、ファンデルワールス面 (VdW SAS) 及び hydrophobicity surface (ILM) などである。強い定量的構造-活性相関がみられ、毒性の作用機序

が提案された。

Tarasov ら (2005) は、齧歯類の性細胞の変異原性作用が知られている 105 化合物について、それらの分子構造と変異原性との関係について QSAR 解析を行った。ソフトウェアを用いて様々な分子の部分構造とその組合せを作成し、変異原性の高いものを抽出するように開発を行った。

Jacobs (2005) は、ある物質が DNA の直接的な変異原であったり、肝酵素の誘発性を示したり、特定臓器への毒性、細胞増殖性、細胞毒性、ホルモン攪乱性を持ったり、QSAR やオミクスの情報がある場合には、2 年間発がん性試験は必要ないという考えがあることを示し、これについて検証するために、薬理安全性データ・薬理活性・代謝データ・13 週間試験と 2 年間発がん性試験 (CDER/FDA によるデータ) を比較した。ICH genetic toxicology battery 及び alternative carcinogenicity models についてもチェックを行った。短期間試験から得られる情報では、長期間発がん性試験の結果予測を精度高く行うには、現状では不十分であると考えられた。

Tunkel ら (2005) は、計算モデル (TOPKAT、MCASE、OASIS と ECOSAR) によるラットの経口致死率と魚類の急性毒性の推定データを用いて、レギュラトリーの目的での QSAR の使用に関する実際的な問題について調査した。EPA HPV Challenge Program のデータを用いて、推定の質について比較が行われた。

O'Brien と de Groot (2005) は、ニーズに従って予測を適合させるため、どのように複数の ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) モデルを組み合わせるかについて示し、より良いデータ使用法と予測の組合せが、真に役立つ解答を提供するモデルをどのように作成するかについて示した。

Hulzebos ら (2005) は、セトウバル指針の一部を適用して、3 種の (Q)SAR システムの有効性を試験し、その結果を確認した。この指針には基本メカニズム (トレーニングセットの可用性と検証) が含まれる。ECOSAR、BIOWIN 及び DEREK

for Windows にはメカニズム的/経験的根拠がある。ECOSAR は各 QSAR のトレーニングセットを含む。ECOSAR は、部分構造と log Kow に基づき、直線回帰を用いて環境毒性を予測する。バリデーションの結果、predictivity は 64%以上であった。BIOWIN は、部分構造と分子量に基づき、(非)直線回帰を用いて、生物分解性の確率を予測する。大きなトレーニングセットが含まれ、生物難分解性を良く予測する。DEREK は機械的根拠と参考文献に基づく。構造的アラートが毒性データのトレーニングセットを用いて開発されている。

Gerner ら (2005) は、ウサギを用いたドレイズ眼刺激試験の代替案として QSAR 及び in vitro 試験を用いて、化学物質の眼への刺激性を評価した。

Dimitrov ら (2005) は、SAR 及び QSAR モデルの適用領域を決定するための段階的アプローチを提案した。4 段階に分けられ、1 段階目に一般のパラメータ必要条件が満たされ、2 段階目はモデルで正しく予測される化学物質における構造類似性が定義され、3 段階目にはモデル化された現象の機構的理解に基づき、4 段階目にシミュレートされた代謝の信頼性が予測の信頼性評価の際に考慮された。結果として、適用領域に属している化学物質についての QSAR モデルによる予測は、領域外の化学物質についての予測より信頼性が高いことがわかった。

Fedorowicz ら (2005) は、TOPKAT、DEREK for Windows 及びロジスティック回帰法を用いてアレルギー性接触皮膚炎 (ACD) の QSAR モデリングの有用性を調査した。モルモット・データにおける QSAR 予測による分類の正確さは TOPKAT で 73.3%、DEREK for Windows で 82.9%、ロジスティック回帰モデルで 87.6%であった。LINA データにおいては、DEREK for Windows で 73.0%、ロジスティック回帰モデルで 83.2%であった。

Bernauer ら (2005) は、現在、化学物質のリスク評価に in vitro 試験のデータが用いられているが、将来的には毒性メカニズムによって補完される QSAR アプローチが毒物規制において利用されることを示した。

Devillers (2004) は、雌雄ラットにおける有機リン系農薬の急性経口毒性を推定するために QSAR モデルを用いた。トレーニングセットの 51 化学物質と外部テストセットの 9 化合物が、親油性・モル屈折度・HBA・HBD をコード化した自己相関ベクトルによって記述された。最も妥当な自己相関記述子の選択には特徴選択が用いられた。PLS 回帰分析と人工ニューラル・ネットワーク (ANN) を使用し、農薬の毒性評価における性差を説明するモデルを導いた。

Luco ら (2004) は、多変量モデルを用いて、重篤な環境影響を持つ化合物 (すなわち、polychloro dibenzo-p-dioxins (PCDDs) と dibenzofurans (PCDFs)) の相対的毒性が予測可能であると報告した。重回帰分析 (MLR) と部分最小二乗による潜在構造への射影 (PLS) により、グラフ理論上の記述子、主に topological charge indices (TCIs) の有用性が示された。このグループの一般的な傾向は正確に再現され、以前にパブリッシュされたものよりより良い結果が示された。概して、毒性の強い化合物ほどより左右対称の分子構造を示していた。

Contrera ら (2004) は、ヒトを用いた phase I の臨床試験のための医薬品の最大推奨初回投与量 (MRSD) や非医薬品のための無影響量 (NOEL) の推定は、今のところ動物を用いた毒性試験の結果の外挿によって行われているが、この過程は不正確であり、無毒性量 (NOAEL) と最も感受性の高い種を決定するために、様々な種を用いた毒性試験の結果が必要であると報告した。また、多様な不確定係数が、ヒトに動物での毒性を外挿することでの不適合や不確実さを補うために必要である。医薬品の最大推奨一日投与量 (MRDD) はヒトの臨床試験から経験的に導かれている。MRDD は薬効が増加しないと推定される上限の投与量であり、または、悪影響が薬効を上回り始める投与量でもある。MRDD はヒトでの NOAEL と本質的に等しい。現在、実験動物での NOAEL がヒトの臨床試験の安全な初回投与量を推定するために用いられている。ヒトの MRDD の MDL

QSAR 予測モデルは、現在の動物試験に基づくリスク評価モデルよりも、より良く、より単純で、より妥当な、医薬品の MRSD やヒトにおける化学物質の毒性閾値の予測をもたらす可能性があり、また、現在の手法に付加的に用いて役立つ可能性がある。

Venkatapathy ら (2004) は、TOPKAT のラット慢性 LOAEL モデルの性能を、米国 EPA 事務局長の農薬プログラムにとって重要な化合物のデータベースを用いて検査した。検査は、ピアレビューを受けた LOAEL の記載のある米国 EPA の 3 種類のソースの化学物質のデータベースを用いて繰り返行われた。また、本研究の結果が TOPKAT のモデル構築過程の間に行われた試験結果と対比された。

Mekenyan ら (2004) は、AmesTA100 株のみを用いた突然変異試験の結果を予測する TA100 モデルの開発について述べた。TA100 モデルが、TA100 株において S9mix 非存在下で陽性とされた 148 化学物質を用いて開発された。まず、TA100 株において S9mix 非存在下で陽性の化学物質の反応プロフィールを残りの 1048 物質の反応プロフィールと比較することによって、決定樹が開発された。このアプローチによりトレーニングセットの primary acting な変異原の 82%、非変異原を 94% 識別した。トレーニングセット中の S9mix 存在下でのみ陽性である 188 物質が、決定樹により陰性と判定される可能性があり、次のステップで、S9mix 存在下でのみ陽性である物質を識別する。一連の階層的代謝変形が、1048 物質ごとに適用される S-9 代謝シミュレーターの開発に使用され、潜在的代謝産物がスクリーニングされた。このモデルによりトレーニングセットの代謝活性物質の 77% を正確に識別した。COREPA モデルを利用し、代謝活性を考慮した化学物質の変異原性を予測する計算システムが開発された。

Moridani ら (2004) は、1 または 2 パラメータの定量的構造毒性関係 (QSTR) 方程式を、2 時間で 50% 細胞毒性を誘引するカテコール濃度を LD50 として、23 種のカテコールによって誘導さ

れる分離ラット肝細胞の細胞毒性を記述するために得た。分離ラット肝細胞の細胞毒性の予測に重要なカテコールの特徴は親油性と $pK(a1)$ であった。より高い親油性/分配係数、より低いイオン化、より高い pK をもつカテコールほど肝細胞に対して有毒であった。

Klopman ら (2004) は、MCASE 人工知能システムによって作成される多数のモジュールに基づいて化学物質の毒性エンドポイントと薬理学的特性を予測するため、Expert System Prediction (ESP) という新手法を使用する計算プログラムの開発を行った。一般に、モジュールはエンドポイントを測定する様々な生物モデルに基づいている。目的は、化学物質の全体的な活性/不活性に関する意志決定プロセスを改善し、*in silico* スクリーニングを迅速に行えるようにすることである。ESP は様々な観点からバイオフィアの有毒性を評価し、新規化学物質の活性予測にこの情報を使用する。パターン・ベクトルと遺伝子人工ニューラルネットワーク (GA-ANN) の形において化学物質の特徴を表現する独自のコード化システムが、これらのパターンと全体的な薬理学的特性との関係の知識を得るために、使用された。ESP の有効性の例として、MCAS 雌雄ラット/マウス発がん性モジュールを用い、化学物質の種々のセットの一般的な発がん性の予測が示された。

Sanderson ら (2004) は、表層水における薬剤の環境リスクのランク付け及び優先度を調査するために、QSAR モデルを利用した。2986 の医薬品を、EPIWIN プログラムを使用して藻類、ミジンコ類、魚類へのハザードと関連して 51 クラスにランク付けた。変性添加物は最も強い毒物クラスであった。心臓血管、胃腸の医薬品、抗ウイルス剤、不安緩解鎮静催眠薬、抗精神病薬、コルチコイド、甲状腺の医薬品が、予測された最も危険な医薬品クラスであった。全体的な感受性は、ミジンコ > 魚類 > 藻類の順に高いと示された。

Moudgal ら (2003) は、米国 EPA は産業廃棄物廃棄場浄化政策 (Superfund) 等で懸念された化学物質 (CoC) をヒトへの潜在的毒性与生態系に基

づいて整理したが、しばしば文献中の CoC の健康影響を評価するための毒性試験のデータが不足してと報告し、CoC の代用となる化学物質を見つけるために定量的構造毒性関係 (QSTRs) を使用する方法について示した。代用となる化学物質の毒性データは、有害物廃棄場の化学物質の浄化前のランク付けに使用可能である。CoC と QSTR モデルデータベースの化学物質における構造や記述子の類似性を証明するのに TOPKAT が用いられた。Dichlorobenzophenone (DCBP)、Chlorobenzilate の代謝物、Dichlorodiphenyltrichloroethane、Dicofol の代用物質の決定に適用された。

Contrera ら (2003) は、医薬品と有機化合物の発がん性予測に使える SAR モデル開発に、MDL QSAR ソフトの使用可能性について評価を行った。86 医薬品と 22 化学物質の計 108 物質の妥当性検討により、MDL QSAR モデルがげっ歯類の発がん性について優れた coverage (93%)、良い sensitivity (72%)、そして、良い specificity (72%) を持つことが示された。E-state 記述子が、半数以上の発がん性予測の SAR モデルに貢献した。

Mattioni ら (2003) は、芳香族化合物と第二アミン化合物の計 334 物質が遺伝毒性/非遺伝毒性に分類するために、化学構造から算出された情報に基づいて複数のバイナリ QSAR モデルを開発した。各化合物の遺伝毒性エンドポイントは、S9mix の存在下/非存在下で SOS Chromotest を用いて決定された。分析結果が S9mix の存在下または非存在下で陽性の場合、その化合物は遺伝毒性であるとみなされた。データセットの各化合物が、化学構造の様々な側面を説明する数量記述子の計算を通してコード化された。特に偽陰性が最小になるようにして、合計の分類ミスを最小化するようにモデルが選択された。加えて、トレーニングセットに依らず一貫した結果が得られるようにモデルを組み合わせた。個々のモデルの平均分類率はトレーニングセットで 71.6%、予測セットでは 67.7%であった。モデルを組み合わせた場合には、全予測セットの 72.2%の遺伝毒性を正しく分類することが可能であった。

Klopman ら (2003) は、コンピューター・スクリーニングを変異原性や他の毒性エンドポイントのための HPV 化学物質の今後の試験の優先度を設定する方法として提案した。それらの結果は、2484 HPV 化学物質の一括スクリーニングによって各化学物質の Ames test での変異原性を予測することに提供されている。それらの化学物質は、サルモネラ属株 TA100、TA1535、TA1537、TA97、TA98 の 15 データベースに対して S9mix の存在下非存在下で試験された。2484 化学物質のうち 1868 物質は 15 のデータモジュールの全てにおいて完全に変異原性ではないと予測され、39 物質はエキスパートシステムの知識外の部分構造を含むことがわかり、更なる評価が提案された。残りの 616 化学物質は変異原性と関連のある様々なバイオフォア (構造的アラート) を含むことがわかった。

Pintore ら (2003) は、235 農薬化合物のデータセットをラットへの毒性に基づいて 3 クラスに分類し、ファジー理論を用いた AFP により分析した。この方法は、記述子スペースをファジーに分割された部分スペースにダイナミックに分けることによって、分子記述子と化学物質活性の関連の確立を可能にする。データセットをトレーニング用に 165 物質、テスト用に 70 物質に分け、AFP モデルを検証した。テストセットの 76% が正確に予測され、最も毒性の強いクラスでは 86% が正しく予測された。

Moridani ら (2003) は、31 種のフェノール類の細胞毒性予測のため、logLD50 (単離ラット肝細胞の 50% に細胞毒性を起こす濃度) と logP (オクタノール/水分配係数) を用いて QSTR 式を求めた。親油性、BDE、あるいはシグマ+値のより高い値を持つか、pK(a) 電位のより低い値を持つフェノール類ほど肝細胞毒性がより強いことがわかった。また、肝細胞ミトコンドリア膜電位の崩壊が大部分のフェノール類の細胞毒性に先行して起こることがわかった。

Theil ら (2003) は、in silico と in vitro での ADME 予測ツールを用いて、薬候補物質の薬物動態 (PK) の予測のモデルとシミュレーション戦略を提案

した。これらの方法は、特定の ADME パラメータを推測するのに使用でき、そして、生理ベース PK (PBPK) モデルの一部でもある。in silico 及び in vitro データに基づいて ADME 予測ツールが構築されるので、in vivo 試験に前もって、初期の創薬に適用可能である。

Hulzebos と Posthumus (2003) は、およそ 70 の物質の毒性影響の ECOSAR と DEREK による予測を、リスク評価の目的のために実験データと比較した。それら 2 つプログラムが選択されたのは、予測において使いやすく且つ結果が明白であるからである。それらは、どの化学クラスに物質が属するかを予測し、更に毒性をも予測する。ECOSAR は化学物質の 87% を正しくクラス分けした。環境毒性の予測に関して、ECOSAR による QSARs の信頼性のために基準が作成された。ECOSAR による QSARs の半数は信頼できないとみなされたが、予測結果は信頼できる QSARs と類似していた。ECOSAR による毒性予測の全体的な精度は 67% であった。DERK は化学物質の 90% を正しくクラス分けしたが、10% の部分構造についてより詳細な説明が必要であった。予測精度は感作性については約 60%、遺伝毒性及び発がん性については約 75% であった。刺激性と生殖毒性についての予測は不十分であった。

Benigni と Zito (2003) は、安全な医薬品の開発のために変異原性と発がん性に関して QSAR に基づいて検証を行った。後成的な発がん物質に関する研究とモデルの効率的はコンピュータ化が必要とされた。

Novak と Rajagopal (2002) は、アミンの定量的な変異原性または発がん性と対応する Nitrenium イオンの azide/solvent selectivity との相関について研究を行った。

Cronin ら (2002) は、4 つの毒性データセットの QSAR 分析を行った。毒性データには、文献からの 3 データセット (灌流ラット肝臓への 23 種の脂肪族アルコールの毒性・代謝) を用いた。また、13 種の mono-及び di-substituted nitrobenzenes のクロレラを用いた試験の毒性も分析された。

logP と E(LUMO)を用いて QSARs の発展に成功した。分子の分岐を記述するには脂肪族アルコールのためのデータモデルが必要である。

Lee ら (2002) は、フェニルプロパノイドを *Scrophularia buergeriana* MIQ の根から分離した。

“Scrophulariaceae” は四塩化炭素 (CCl₄) による毒性からラット初代培養肝細胞を保護した。フェニルプロパノイドのうちの 3 種 (4-O-E-p-methoxycinnamoyl- α -L-rhamnopyranoside ester, p-methoxycinnamic acid 及び isoferulic acid) が肝保護活性を持つことを示した。これらの3つのフェニルプロパノイドの肝保護活性を及ぼした機構を決定するために、グルタチオン (GSH) 酸化還元系に関係する酵素の活性を測定して、肝臓ミトコンドリア GSH のレベルを検定した。ラット初代培養肝細胞の GSH 濃度は、CCl₄ 損傷によりかなり低下するが、これらの3つのフェニルプロパノイドでかなり保護された。さらに、CCl₄ で損傷したラット肝細胞におけるマロンジアルデヒド (過酸化脂質の副産物) の形成の増加が、これらのフェニルプロパノイドによって減少させられた。3 種のフェニルプロパノイドにおける肝保護活性に必要な必須部分構造は、アルファ、ベータ不飽和エステル部分と考えられた。

Espinosa ら (2002) は、ファジーARTMAP に基づく QSAR モデルの作成に必要な、化学物質の類似点分析と多くの記述子から関連のより高い最少のサブセットの選択を行うために、自動組織マップ (SOM) を適用した。まず、各分子記述と目的活性変数のためのカテゴリー・マップを SOM で作成し、その後、トポロジーと非線形分布に基づいて分類した。記述子の最高のサブセットが、各クラスターから、目的変数との相関関係の最も高いものを順に選ぶことによって獲得された。予測特性を上げるため、記述子の最適サブセットがファジーARTMAP 構造への入力に使用された。統合した SOM-fuzzy ARTMAP のパフォーマンスが、69 のベンゼン誘導体セットの急性毒性と 155 の有機化合物セットの経口急性毒性の予測で評価された。提唱された方法により、類似的な化合物の

分類違いが最小となり、適切に訓練されたファジーARTMAP ネットワークの予測率を上げた。

Moridani ら (2002) は、単離ラット肝細胞の logLD₅₀、log P、E(p/2)を用いて 22 種のポリフェノールの細胞毒性を記述するために QSAR 方程式を得た。ポリフェノール誘導肝細胞毒性の QSTR のために、1 及び 2 パラメータの方程式が導かれた。また、HeLa 細胞を用いた腫瘍細胞の成長についての 13 ポリフェノールの抑制効果を記述するために、1 及び 2 パラメータの方程式が導かれた。これらのことから、ポリフェノールの細胞毒性を決定している主要な特性は親油性であることがわかった。E(p/2)も、細胞毒性において重要な要因であった。ポリフェノールの細胞毒性にラジカル形成が必要であるなら、log P と E(p/2) が関与したことの説明がつく。

Oprea ら (2001) は、MTD-PLS (最小位相的差分 (MTD) 法の部分最小二乗法 (PLS) 変型) について示した。MTD-PLS において、分子は、古典的 MTD におけるハイパー分子の頂点の占有/非占有によるだけでなく、各頂点の付加的記述子 (部分的ファンデルワールス量、部分的疎水性、部分的原子荷電など) によっても特徴付けられる。以前に MTD によって研究されたジベンゾ p-ダイオキシン、ジベンゾフラン、ビフェニルの 73 種類の polyhalogenated 誘導体に、この方法を適用した。MTD-PLS 法によって古典的 MTD と比較して詳細な結果が得られた。置換基の位置での静電効果が重要であることが示された。

Sparks ら (2001) は、スピノシン系殺虫剤は多種の害虫、特に鱗翅類と双翅類に有効であり、害虫に対する生物活性はピレスロイド系殺虫剤と同程度であると記述した。現在までに 20 種類以上のスピノシンと 800 種類以上のスピノソイド (半合成類似体) が分離/合成されている。スピノシンの人工ニューラルネットワークに基づく QSAR 分析が、2',3',4'-tri-O-methylrhamnosyl 部分の変更が活性を改良することを示唆し、これらの変更を組み込んだ数種のスピノソイドの鱗翅類への活性はスピノサドと比較して顕著に改善され

た。また、重回帰分析に基づく QSAR 研究も、CLogP と MOPAC 双極子モーメントのような分子全体の特性がスピノシンやスピノソイドで観察された生物活性の多くを説明しうることを示した。

Geiss と Frazier (2001) は、揮発性ハロゲン化脂肪族化合物は *in vitro* 及び *in vivo* において酸化ストレスを引き起こしうる化学物質の一種であると述べた。これらの化学物質における特定の生体反応を引き起こす可能性と特異的化学的記述子 (LOMO や logP) との関係を確認した。臭素化及び塩素化した一連のメタンがラット初代肝細胞に酸化ストレスを引き起こす可能性について、QSAR モデルはこれまで報告されていなかった。ラット初代肝細胞の培養組織を揮発性化学物質に曝露する新しい *in vitro* 手法を用いて、各ハロゲン化メタンへの肝細胞の曝露から生体反応が評価された。過酸化脂質、活性酸素種及び細胞毒性の指標が測定された。10 種の臭素化及び塩素化メタンのために、半経験的な分子軌道法が QSAR モデルで使われる物理/化学的記述子の算出に用いられた。これらの QSAR モデルを用いて、ハロゲン化メタンが *in vivo* での酸化ストレスや関連損傷のマーカーを導く可能性を説明した。その結果、特定の記述子 (例えば、分子軌道エネルギー、結合長、親油性) が、ラット初代肝細胞にハロゲン化メタンによって酸化ストレスや細胞毒性の指標を誘導することと量的に相関があることを示した。

Singh (2001) は、PCDD、ポリ塩化炭化水素及び塩素系殺虫剤の急性毒性と発がん性を予測する QSAR モデルについて示した。PCDD 曝露マウスの LD50 は、極性とは負の “H acceptor x 2 chi” とは正の相関があり、一方、PCDD 曝露モルモットの LD50 は “H acceptor x density” と相関があった。“H acceptor x 2 chi” と “H acceptor x density” の両者は logP と放物関係を示した。発がん性は logP とは負の、“length x width” とは正の相関を示した。従って、疎水性メカニズムはマウスの PCDD 致死効果において重要な役割を果たし、一

方、疎水性及び電子メカニズムがモルモットの PCDD 致死効果関係している。しかし、分子の親油性、長さ、幅は塩素系合成物の発がん効果において重要な役割を果たす可能性がある。

Fouchecourt ら (2001) は、定量的構造薬物動態相関 (QSPkR) の現状を毒性学的に重要な化学物質を用いた例とともに示した。共通した方法として、薬物動態データの収集や実験データへの当てはめによる薬物動態パラメーター (半減期や分布量) の決定、そして、それらと、化学物質の特徴的構造との Free-Wilson モデルによる関連付けが挙げられた。

Gallegos ら (2001) は、多環式芳香族炭化水素 (PAHs) の毒性のための QSAR モデルの作成について示した。2 つの特性 (*in vitro* のラット経皮吸収と発がん性レベル) が、分子量子類似法 (MQSM) を用いて調査された。その結果、MQSM が物理化学的、位相的、量子化学的な分子記述子を用いた他のアプローチより良い結果を生む可能性があることがわかった。

Hansch ら (2000) は、乳酸脱水素酵素の増加によって定量される WB ラット肝細胞の上皮細胞膜の損傷を起こす可能性について、フェノールと 14 種のフェノール類を試験した。2 つの QSAR 回帰式が得られ、フェノールの細胞毒性の機構 (疎水性とフェノキシ遊離基の形成) が重要であることが示された。文献では、シグマ+と相関するフェノール毒性は希であるが、電子供与性グループを備えているフェノール類は毒性フェノキシ遊離基に変わる可能性がある。種々の細胞における共通の特性は、急成長に関連した活性酸素種の高生産である。

Eldred と Jurs (1999) は、有機リン系農薬化合物の及ぼすほ乳類への急性経口毒性 (LD50) について、QSAR 調査を行った。化合物は算出された分子構造記述子で表され、位相的、電子的、幾何学的な特徴をコード化した。特徴は、遺伝子アルゴリズムで記述子のサブセットを見つけることにより選択された。それらのサブセットは、構造記述子と $-\log(\text{mmol/kg})$ とをつなぐ高水準 CNN モ

デルをサポートする。

Piskorska-Pliszczynska (1998) は、Ah レセプターのリガンドであるハロゲン化芳香族のための SAR と QSAR に関する研究の要約を示した。これらの研究はダイオキシンの毒性における AhR の役割を強く裏付けた。

Selassie ら (1998) は、37 種類の simple 3-と 4-で置換されたフェノール類によるマウス白血病細胞の成長阻害パターンの調査を行った。フェノール類の 23 の電子供与性置換基のために得られた次の QSAR 式は、 $\log 1/IC50 = -1.58 \sigma(+) + 0.21 \log P + 3.10$ 、であった。IC50 は 50% 成長阻害濃度、P は疎水性、 $\sigma(+)$ は置換基の電子効果を現すブラウンの電子パラメータである。 $\sigma(+)$ への負の依存は、ラット胎児のフェノール類による発生毒性が観察されることを強く暗示させる。他の 15 の電子求引性置換基のための QSAR 式は、 $\log 1/IC50 = 0.62 \log P + 2.35$ 、であった。電子供与性置換基の場合、ラジカル介在プロセスと矛盾しない。電子求引性置換基の場合は、疎水性によって調節されるような非特異的毒性が優勢と思われた。

Tafazoli ら (1998) は、小核試験と Comet アッセイを用いて 5 種の塩素化炭化水素 (carbon tetrachloride, hexachloroethane, 1,2-dichloroethane, 1-chlorohexane and 2,3-dichlorobutane) を、単離ヒトリンパ球における変異原性、遺伝毒性、細胞毒性について評価し、以前調査された物質のデータやそれらの物理化学的記述子や電子的パラメータとともに QSAR 分析に使用した。QSAR 分析では、試験化合物が種々のパラメータ: 親油性 ($\log P$)、電子供与性 (charge)、最長炭素-塩素結合長 (LBC-Cl) によって影響されることが示された。さらに、立体パラメータ (モル屈折度 (MR) と LBC-Cl) と電子パラメータ (ELUMO) が、代謝活性の非存在下での遺伝毒性の有無についての支配的な因子であることが示された。少数の化合物についての調査であり、また、細胞毒性と遺伝毒性が異なる 2 つのバイオアッセイ試験で行われたが、データセットは同じ試験者によって得られ

ていたことから QSAR の信頼性が高められた。

McKarns ら (1997) は、in vitro のラット肝上皮細胞に及ぼす単鎖脂肪族アルコールの急性曝露による膜完全性の障害における疎水性の役割を評価した。メタノール、エタノール、1-プロピルアルコール、1-ブタノール、1-ペンタノール、1-ヘキサノール、1-ヘプタノール、1-オクタノール、2-ブタノール、2-メチル 1-プロピルアルコールと 2-メチル 2-プロピルアルコールが用いられた。乳酸脱水素酵素 (LDH) 分析は、膜完全性を定量化するのに用いられ、 $\log P$ は、疎水性を定量化するのに用いられた。LDH の放出が対照群より 50% 増加したアルコール濃度 (つまり、軽い障害) を表す LDH50 と LDH の最大放出量の 50% 増加したアルコール濃度 (つまり、中程度の障害) を表す EC50 が実験的に決定され、QSAR 式に用いられた。LDH50 の QSAR 式は $\log (1/LDH50) = 0.896 \log P + 0.117$ ($n = 11$, $SD = 0.131$) となり、EC50 の QSAR 式は $\log (1/EC50) = 0.893 \log P + 0.101$ ($n = 11$, $SD = 0.133$) となった。これらの結果から、LDH の放出量は疎水性と線形相関があることがわかった。

Hildebrand ら (1997) は、 α -2-ミクログロブリン誘発性腎症は成熟した雄ラットのみで生じると述べた。 α -2-ミクログロブリンは様々な化学物質と結合し、ラット・ネフロン内の P2 部分のリソソーム内でのそのタンパク質分解が阻害される。成熟した雄ラットに 2 グループの化合物を投与した。(1) α -2-ミクログロブリンの蓄積を誘発する化学物質の概要のための構造的に多様な化合物グループ。(2) 構造活性相関を解明するための構造的に密接に関連した化合物グループ (置換ベンゼン誘導体)。 α -2-ミクログロブリン誘発性腎症の程度は腎部の免疫組織化学染色で測定された。コントロールに対する増加率は 154%

(1,4-dichloromethyl-benzene) から 321%

(α -methyl-4-(1-methylethyl)-cyclohexanemethanol) まで変動した。(2) のグループから、硝子滴の蓄積 (HDA) は置換基のタイプ及び芳香環における位置に依存することがわかった。HAD において、