

benzene=phenol=alkylated phenols<halogenated phenols<halogenated benzenesの順に活性が増加した。

Polloth と Mangelsdorf (1997) は、発がん性、慢性毒性、再奇形性のような複合エンドポイントに関する予測は未だ不調であるが、感作性、変異原性、遺伝毒性のエンドポイントについては、近い将来入手可能となると示した。

Moriguchi ら (1996) は、北里大学で開発したファジー適応最小二乗法 (FALS) を有機化合物の発がん性に関する QSAR モデルの作成に使用した。評価には、米国毒性プログラムで試験された有機化合物の齧歯類に対する発がん性データを用いた。

Parry ら (1996) は、染色体数的異常を誘発する化学物質の発見と評価のための調査を行った。その中で、*Aspergillus nidulans* の染色体異常分離の分析結果が、菌類試験の高的中率を持つ QSAR モデル発展のために使用された。

Yamaguchi ら (1996) は、非同族工業用化学物質について、共通メカニズム及び生物学的要因を考慮にいれて、急性 (単回投与) 毒性データから亜慢性 (28 日間反復投与) 毒性データの予測式を発展させた。

Abou-Shaabani ら (1996) は、より少ない副作用の抗甲状腺薬を設計するために、thiourylene 部分 (SN&S) の電子位相学的状態 (E-state) インデックスを利用して、5 種の抗酸化特性の低下したアクリル thiourylene 系化合物の開発を試みた。

Crebelli ら (1995) は、55 種のハロゲン化炭化水素による、有糸分裂染色体異常分離、核分裂停止、致死性の誘発を調査した。*Aspergillus nidulans* の遺伝子分析が用いられた。得られた実験データは異数性誘導の QSAR モデルを開発するのに用いられ、調査されたハロゲン化炭化水素の異数性誘導性のための分子決定因子として、求電子性の果たす大きな役割が示された。遊離基種の生成を伴うハロアルカンの求電子性と生体内変化の傾向は関連すると仮定して、in vitro でのラット肝ミクロソームにおける過酸化脂質の誘発性のために

27 種の化合物が試験された。その結果、過酸化脂質の誘発性と有糸分裂の染色体分離阻害性との間の部分的な一致が示され、得られたデータベースが化学構造と過酸化性との間の調査に用いられ、炭素-ハロゲン結合の homolytic な開裂の容易性に関連する電子的構造的パラメータがハロアルカンの過酸化特性の決定に重要な役割を果たすことが示された。

Hollebone と Brownlee (1995) は、生体異物化学物質への多気質モノオキシゲナーゼ酵素系反応の熱力学的 QSAR 分析を行ったところ、2 つの電子因子だけに依存することがわかった。それらは、最も弱い炭素-水素結合の長さ (イオン及びフリーラジカル機構に共通する因子) に対する負の依存と、炭素の正電荷へのこの結合の分極化に対する強い負の依存である。

Mumtaz ら (1995) は、文献にない化学物質の発がん性を推定するために QSAR モデルを作成した。LOAEL のデータベースには米国 EPA 文章から 104、NCI/NTP レポートから 124、文献から 6 の毒性情報を用いた。計 234 物質の多様な構造の化学物質と脂環式化合物と芳香族化合物を含むクラスの化合物に基づく、回帰モデルが作成され、ラットの慢性経口毒性の LOAEL を評価した。観測された LOAEL の 2 倍以内に推定値の約 55%が、観察値の 5 倍以内に約 93%の推定値が含まれた。

Hansch と Zhang (1995) は、ラット胚に対するフェノール類の毒性と胚線維芽細胞に対するアニリン類の毒性の分析から、これらの化合物の新型の毒性を仮定した。シグマ+やエプシロン HOMO によって推定される芳香環上の電子密度を増加させる置換基が効力を増加させる。フェノール類とアニリン類の遊離基形状がそれらの毒性を説明すると仮定された。これらの結果が、遊離基補足剤と、フェノール類、アニリン類、カルバゾール類に作用している酸化還元酵素の QSAR と比較された。

Tysklind ら (1994) は、20 のポリ塩素化ジベンゾフラン (PCDFs) のエトキシレゾルフィン O-脱エチル化 (EROD) 誘導を H4IIE ラット肝癌細胞

胞バイオアッセイで調べた。PCDFsの全体をカバーするために多変量の化学的特徴付けに基づき、試験化合物が選択された。EROD誘導力はED50において25から1000,000,000 pg/mgまで約7桁の範囲で変化した。バイオアッセイの反応は2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシンで較正され、毒性等価係数(TEFs)が算出された。TEFsのQSAR作成のために、37の物理化学的記述変数が87の塩素化PCDFsを化学的に特徴付けるのに用いられた。その結果、TEFsの予測により、多数の同族体が有力なEROD誘導因子であることがわかった。

Smithら(1992)は、26の合成/自然複素環式アミンについてS9mix存在下でテスター株TA98とTA100を用いたエイムス試験を行った。化合物のうちの9つは、すでに変異原性を持つことが示されたタンパク質-熱分解物質である。これらの化合物については、以前の報告の結果と類似した結果が示された。17の構造的に多様な複素環式アミンが合成されて、変異原性について試験された。これらの合成複素環式アミンの構造上の多様性は、変異原性の必須構造の特徴を示すことにより将来のQSAR試験の感度を向上させる。本研究の結果から、この重要な種類の化合物の変異原性に関する大規模なデータベースが得られる。

Lipnick(1991)は、QSARの作成と適用において外れ値となる化学物質がみられることを示した。毒性の分子的記述子と分子構造の関係に関する情報によって、モデルの予測限界に関するガイダンスと同様、外れ物質となる原因への洞察が得られる。魚類とラットを用いた毒性試験のデータを用いて、外れ物質について検証を行った。

Gombarら(1991)は、化学物質の構造と雄ラットの経口LD50から最大耐用用量(MTD)を推測するQSARモデルをNCI/NTPプロトコル下で試験された269の多様な化学物質に基づいて作成した。ラットの経口LD50は最強の予測因子であった。さらに、22の構造的記述子(9の部分構造MOLSTACキー、3つの分子結合性指数、10のシグマ電荷)がエンドポイントの予測因子として確

認された。モデルは分散の76%を説明した。

Kavlock(1990)は、置換フェノール類の発生毒性試験の結果についてQSAR分析を行った。27同族体のうち14が母体毒性を持つと分類されたが、それらの50%にしか発生毒性はみられなかった。発生毒性のある9同族体のうち7が母体毒性を示した。発生毒性を示す物質のうち4つが、類似の作用機序または共通した代謝経路に関連のある効果の症候群をもたらした。結果として、定量的且つ質的な観点から、これらのフェノール類同族体における母体毒性は、発生毒性とは異なっていた。従って、これらの毒性の原因となる機構も異なることが予想された。

Trieffら(1989)は、S9mix存在下で調査されている19の芳香族アミンの変異原性について、これらの結果を用いてQSAR分析を行ったところ、変異原性に関する3つの因子(logP、I1、I2)を示した。QSARの重回帰式は変異原性における分散の80-90%を説明した。変異原性は親油性とともに増加することが示された。また、アミンまたはアセトアミドの位置がオルトの場合、他の異性体と比較して立体障害が生じやすくなるために変異原性が減少した。さらに、アミン基のアセチル化によっても減少した。

LavenharとMaczka(1985)は、芳香族アミン類の発がん性評価に関してSAR分析を行った。パターン認識法を使用して、分子記述子が芳香族アミン類のデータのために作成された。線形判別分析の結果、化合物の陽性/陰性について94.9%が正確に判別された。陽性化合物の芳香族アミン類の最適な類似体が物理化学的・位相的・幾何学的・電子分子的記述子を用いて確認された。陽性化合物について多段階発がんモデルを使用し、上限リスク推定値を算出した。陽性化合物について、実際のリスクと推定リスクの比較検討が行われた。

Tichyら(1985)は、脂肪族アルコール(C1-C5)をマウス、ハムスター、ラット、モルモット、ウサギに腹腔内投与した場合のLD50の外挿に使用するためのQSAR分析の概念に生物学的類似モデ

ルを結合し、アルコール類と試験動物のための定量的構造-活性-種相関モデルを提案した。

Leece ら (1985) は、ポリ塩化ビフェニール (PCBs) の *in vivo* QSAR を若齢雄ラットにおいて求めた。体重減少や胸腺萎縮のためと同様に、肝臓ミクロソームのアリル水酸化反応 (AHH) と ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) 誘導のための ED25 と ED50 が9種の PCB 同族体と 4'-bromo-2,3,4,5-tetrachlorobiphenyl について測定された。最も活性の高い化合物はコプラナーPCB 同族体と 3,3',4,4',5-penta-及び 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl であった。コプラナーPCB (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl) の *in vivo* 毒性は、より高く塩素化された同族体より有意に低く、このことはより低い塩素化同族体のより早い代謝と一致する。また、コプラナーPCBs の数種の mono-ortho-chloro-置換類似体の用量反応性生物学的毒性影響が決定され、このグループの化合物の毒性は全て 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl 及び 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl の毒性より低かった。PCB に関する *in vivo* QSAR と *in vitro* QSAR のデータ間に良い順位相関がみられた。この結果は、レセプターによって媒介される PCB の作用機序と一致する。さらに、この一連のハロゲン化ビフェニールにとって、ラットにおける *in vivo* 毒性と *in vitro* モノオキシゲナーゼ酵素誘導との線形相関が認められた。

Panthanickal ら (1978) は、アニリン・マスタード類の加水分解性と、Walker 256 腫瘍と L1210 及び P388 白血病に対する抗腫瘍活性についての QSAR を求めた。一般に、抗腫瘍活性はロスによって定義された状況下で加水分解性に対応する。つまり、LD50 は抗腫瘍効果に対応する。クロラムブシルは例外である。白血病と比較して、Walker 腫瘍に有効な理想親油性は非常に高いと思われる。このことは一般に、固形腫瘍が白血病より親油性薬物を必要とすることを示唆する。

6.1. 参考文献

Abou-Shaabn RR, al-Khamees HA, Abou-Auda HS,

Simonelli AP (1996): Atom level electrotopological state indexes in QSAR: designing and testing antithyroid agents. *Pharm Res*, 13(1), 129-136.

Ames, B.N., J. McCann and E. Yamasaki (1975): Method for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test, *Mutation Res.*, 31, 347-364.

Benigni R, Zito R (2003): Designing safer drugs: (Q)SAR-based identification of mutagens and carcinogens. *Curr Top Med Chem*, 3(11), 1289-1300.

Bernauer U, Oberemm A, Madle S, Gundert-Remy U (2005): The use of *in vitro* data in risk assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96(3), 176-181.

Contrera JF, Matthews EJ, Daniel Benz R (2003): Predicting the carcinogenic potential of pharmaceuticals in rodents using molecular structural similarity and E-state indices. *Regul Toxicol Pharmacol*, 38(3), 243-259.

Contrera JF, Matthews EJ, Kruhlak NL, Benz RD (2004): Estimating the safe starting dose in phase I clinical trials and no observed effect level based on QSAR modeling of the human maximum recommended daily dose. *Regul Toxicol Pharmacol*, 40(3), 185-206.

Crebelli R, Andreoli C, Carere A, Conti L, Crochi B, Cotta-Ramusino M, Benigni R (1995): Toxicology of halogenated aliphatic hydrocarbons: structural and molecular determinants for the disturbance of chromosome segregation and the induction of lipid peroxidation. *Chem Biol Interact*, 98(2), 113-129.

Cronin MT, Dearden JC, Duffy JC, Edwards R, Manga N, Worth AP, Worgan AD (2002): The importance of hydrophobicity and electrophilicity descriptors in

- mechanistically-based QSARs for toxicological endpoints. *SAR QSAR Environ Res*, 13(1), 167-176.
- Devillers J (2004): Prediction of mammalian toxicity of organophosphorus pesticides from QSTR modeling. *SAR QSAR Environ Res*, 15(5-6), 501-510.
- Dimitrov S, Dimitrova G, Pavlov T, Dimitrova N, Patlewicz G, Niemela J, Mekenyan O (2005): A stepwise approach for defining the applicability domain of SAR and QSAR models. *J Chem Inf Model*, 45(4), 839-849
- Eldred DV, Jurs PC (1999): Prediction of acute mammalian toxicity of organophosphorus pesticide compounds from molecular structure. *SAR QSAR Environ Res*, 10(2-3), 75-99.
- Espinosa G, Arenas A, Giralt F (2002): An integrated SOM-fuzzy ARTMAP neural system for the evaluation of toxicity. *J Chem Inf Comput Sci*, 42(2), 343-359.
- Fedorowicz A, Singh H, Soderholm S, Demchuk E (2005): Structure-activity models for contact sensitization. *Chem Res Toxicol*, 18(6), 954-969.
- Fouchecourt MO, Beliveau M, Krishnan K (2001): Quantitative structure-pharmacokinetic relationship modelling. *Sci Total Environ*, 274(1-3), 125-135.
- Gallegos A, Robert D, Girones X, Carbo-Dorca R (2001): Structure-toxicity relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons using molecular quantum similarity. *J Comput Aided Mol Des*, 15(1), 67-80.
- Geiss KT, Frazier JM (2001): QSAR modeling of oxidative stress in vitro following hepatocyte exposures to halogenated methanes. *Toxicol In Vitro*, 15(4-5), 557-563.
- Gerner I, Liebsch M, Spielmann H (2005): Assessment of the eye irritating properties of chemicals by applying alternatives to the Draize rabbit eye test: the use of QSARs and in vitro tests for the classification of eye irritation. *Altern Lab Anim*, 33(3), 215-237.
- Gombar VK, Enslein K, Hart JB, Blake BW, Borgstedt HH (1991): Estimation of maximum tolerated dose for long-term bioassays from acute lethal dose and structure by QSAR. *Risk Anal*, 11(3), 509-517.
- Hansch C, McKarns SC, Smith CJ, Doolittle DJ (2000): Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity. *Chem Biol Interact*, 127(1), 61-72.
- Hansch C, Zhang L (1995): Comparative QSAR: radical toxicity and scavenging. Two different sides of the same coin. *SAR QSAR Environ Res*, 4(2-3), 73-82.
- Hildebrand H, Hartmann E, Popp A, Bomhard E (1997): Quantitation of alpha(2)-microglobulin after administration of structurally divergent chemical compounds. *Arch Toxicol*, 71(6), 351-359.
- Hollebone BR, Brownlee LJ (1995): A thermodynamic QSAR analysis of the poly-substrate monooxygenase responses to xenobiotic chemicals. *Toxicol Lett*, 79(1-3), 157-168.
- Hulzebos E, Sijm D, Traas T, Posthumus R, Maslankiewicz L (2005): Validity and validation of expert (Q)SAR systems. *SAR QSAR Environ Res*, 16(4), 385-401.
- Hulzebos EM, Posthumus R (2003): (Q)SARs: gatekeepers against risk on chemicals? *SAR QSAR Environ Res*, 14(4), 285-316.
- Jacobs A (2005): Prediction of 2-year carcinogenicity study results for pharmaceutical products: how are we doing? *Toxicol Sci*, 88(1), 18-23.
- Juranic IO, Drakulic BJ, Petrovic SD, Mijin DZ, Stankovic MV (2006): A QSAR study of acute toxicity of N-substituted

- fluoroacetamides to rats. *Chemosphere*, 62(4), 641-649.
- Kavlock RJ (1990): Structure-activity relationships in the developmental toxicity of substituted phenols: in vivo effects. *Teratology*, 41(1), 43-59.
- Klopman G, Chakravarti SK, Harris N, Ivanov J, Saiakhov RD (2003): In-silico screening of high production volume chemicals for mutagenicity using the MCASE QSAR expert system. *SAR QSAR Environ Res*, 14(2), 165-180.
- Klopman G, Chakravarti SK, Zhu H, Ivanov JM, Saiakhov RD (2004): ESP: a method to predict toxicity and pharmacological properties of chemicals using multiple MCASE databases. *J Chem Inf Comput Sci*, 44(2), 704-715.
- Lavenhar SR, Maczka CA (1985): Structure-activity considerations in risk assessment: a simulation study. *Toxicol Ind Health*, 1(4), 249-259.
- Lee EJ, Kim SR, Kim J, Kim YC (2002): Hepatoprotective phenylpropanoids from *Scrophularia buergeriana* roots against CCl₄-induced toxicity: action mechanism and structure-activity relationship. *Planta Med*, 68(5), 407-411.
- Leece B, Denomme MA, Towner R, Li SM, Safe S (1985): Polychlorinated biphenyls: correlation between in vivo and in vitro quantitative structure-activity relationships (QSARs). *J Toxicol Environ Health*, 16(3-4), 379-388.
- Lipnick RL (1991): Outliers: their origin and use in the classification of molecular mechanisms of toxicity. *Sci Total Environ*, 109-110, 131-153.
- Luco JM, Galvez J, Garcia-Domenech R, de Julian-Ortiz JV (2004): Structural invariants for the prediction of relative toxicities of polychloro dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Mol Divers*, 8(4), 331-342.
- Maron, D.M. and B.N. Ames (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- Mattioni BE, Kauffman GW, Jurs PC, Custer LL, Durham SK, Pearl GM (2003): Predicting the genotoxicity of secondary and aromatic amines using data subsetting to generate a model ensemble. *J Chem Inf Comput Sci*, 43(3), 949-963.
- Matsushima, T., M. Sawamura, K. Hara and T. Sugimura (1976): Safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system, In : F.J. de Serres, J.R. Fouts, J.R. Bend and R.M. Philpot (Eds.), "In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing", Elsevier / North-Holland, Amsterdam, pp. 85-88.
- McKarns SC, Hansch C, Caldwell WS, Morgan WT, Moore SK, Doolittle DJ (1997): Correlation between hydrophobicity of short-chain aliphatic alcohols and their ability to alter plasma membrane integrity. *Fundam Appl Toxicol*, 36(1), 62-70.
- Mekenyan O, Dimitrov S, Serafimova R, Thompson E, Kotov S, Dimitrova N, Walker JD (2004): Identification of the structural requirements for mutagenicity by incorporating molecular flexibility and metabolic activation of chemicals I: TA100 model. *Chem Res Toxicol*, 17(6), 753-766.
- Moridani MY, Galati G, O'Brien PJ (2002): Comparative quantitative structure toxicity relationships for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells. *Chem Biol Interact*, 139(3), 251-564.
- Moridani MY, Siraki A, Chevaldina T, Scobie H, O'Brien PJ (2004): Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated

- rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*, 147(3), 297-307.
- Moridani MY, Siraki A, O'Brien PJ (2003): Quantitative structure toxicity relationships for phenols in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact*, 145(2), 213-223.
- Moriguchi I, Hirano H, Hirono S (1996): Prediction of the rodent carcinogenicity of organic compounds from their chemical structures using the FALS method. *Environ Health Perspect*, 104 (Suppl 5), 1051-1058.
- Moudgal CJ, Venkatapathy R, Choudhury H, Bruce RM, Lipscomb JC (2003): Application of QSTRs in the selection of a surrogate toxicity value for a chemical of concern. *Environ Sci Technol*, 37(22), 5228-5235.
- Mumtaz MM, Knauf LA, Reisman DJ, Peirano WB, DeRosa CT, Gombar VK, Enslein K, Carter JR, Blake BW, Huque KI, et al. (1995): Assessment of effect levels of chemicals from quantitative structure-activity relationship (QSAR) models. I. Chronic lowest-observed-adverse-effect level (LOAEL). *Toxicol Lett*, 79(1-3), 131-143.
- Novak M, Rajagopal S. (2002): Correlations of nitrenium ion selectivities with quantitative mutagenicity and carcinogenicity of the corresponding amines. *Chem Res Toxicol*, 15(12), 1495-1503.
- O'Brien SE, de Groot MJ (2005): Greater than the sum of its parts: combining models for useful ADMET prediction. *J Med Chem*, 48(4), 1287-1291.
- Oprea TI, Kurunczi L, Olah M, Simon Z (2001): MTD-PLS: a PLS-based variant of the MTD method. A 3D-QSAR analysis of receptor affinities for a series of halogenated dibenzoxin and biphenyl derivatives. *SAR QSAR Environ Res*, 12(1-2), 75-92.
- Panathanickal A, Hansch C, Leo A (1978): Structure-activity relationships in antitumor aniline mustards. *J Med Chem*, 21(1), 16-26.
- Parry JM, Parry EM, Bourner R, Doherty A, Ellard S, O'Donovan J, Hoebee B, de Stoppelaar JM, Mohn GR, Onfelt A, Renglin A, Schultz N, Soderpalm-Berndes C, Jensen KG, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Van Hummelen P, Degrassi F, Antoccia A, Cimini D, Izzo M, Tanzarella C, Adler ID, Kliesch U, Hess P, et al. (1996): The detection and evaluation of aneugenic chemicals. *Mutat Res*, 353(1-2), 11-46.
- Pintore M, Piclin N, Benfenati E, Gini G, Chretien JR (2003): Database mining with adaptive fuzzy partition: application to the prediction of pesticide toxicity on rats. *Environ Toxicol Chem*, 22(5), 983-991.
- Piskorska-Pliszczynska J (1998): SAR and QSAR methods in the study of dioxin action. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 49(4), 433-445. [Article in Polish]
- Polloth C, Mangelsdorf I (1997): Commentary on the application of (Q)SAR to the toxicological evaluation of existing chemicals. *Chemosphere*, 35(11), 2525-2542.
- Sanderson H, Johnson DJ, Reitsma T, Brain RA, Wilson CJ, Solomon KR (2004): Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. *Regul Toxicol Pharmacol*, 39(2), 158-183.
- Selassie CD, DeSoyza TV, Rosario M, Gao H, Hansch C (1998): Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process? *Chem Biol Interact*, 113(3), 175-190.
- Singh AK (2001): Development of quantitative structure-activity relationship (QSAR) models for predicting risk of exposure from carcinogens in animals. *Cancer Invest*, 19(6), 611-620.
- Smith C, Payne V, Doolittle DJ, Debnath AK, Lawlor

- T, Hansch C (1992): Mutagenic activity of a series of synthetic and naturally occurring heterocyclic amines in Salmonella. *Mutat Res*, 279(1), 61-73.
- Sparks TC, Crouse GD, Durst G (2001): Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pest Manag Sci*, 57(10), 896-905.
- Tafazoli M, Baeten A, Geerlings P, Kirsch-Volders M (1998): In vitro mutagenicity and genotoxicity study of a number of short-chain chlorinated hydrocarbons using the micro-nucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (Comet assay) in human lymphocytes: a structure-activity relationship (QSAR) analysis of the genotoxic and cytotoxic potential. *Mutagenesis*, 13(2), 115-126.
- Tarasov VA, Mustafaev ON, Abilev SK, Mel'nik VA (2005): Use of ensemble structural descriptors for increasing the efficiency of QSAR study. *Genetika*, 41(7), 997-1005. [Article in Russian]
- Theil FP, Guentert TW, Haddad S, Poulin P (2003): Utility of physiologically based pharmacokinetic models to drug development and rational drug discovery candidate selection. *Toxicol Lett*, 138(1-2), 29-49.
- Tichy M, Trcka V, Roth Z, Krivicova M (1985): QSAR analysis and data extrapolation among mammals in a series of aliphatic alcohols. *Environ Health Perspect*, 61, 321-328.
- Trieff NM, Biagi GL, Sadagopa Ramanujam VM, Connor TH, Cantelli-Forti G, Guerra MC, Bunce H 3rd, Legator MS (1989): Aromatic amines and acetamides in Salmonella typhimurium TA98 and TA100: a quantitative structure-activity relation study. *Mol Toxicol*, 2(1), 53-65.
- Tunkel J, Mayo K, Austin C, Hickerson A, Howard P (2005): Practical considerations on the use of predictive models for regulatory purposes. *Environ Sci Technol*, 39(7), 2188-2199.
- Tysklind M, Tillitt D, Eriksson L, Lundgren K, Rappe C (1994): A toxic equivalency factor scale for polychlorinated dibenzofurans. *Fundam Appl Toxicol*, 22(2), 277-285.
- Venkatapathy R, Moudgal CJ, Bruce RM (2004): Assessment of the oral rat chronic lowest observed adverse effect level model in TOPKAT, a QSAR software package for toxicity prediction. *J Chem Inf Comput Sci*, 44(5), 1623-1629.
- Yamaguchi T, Nishimura H, Watanabe T, Saito S, Yabuki M, Shiba K, Isobe N, Kishida F, Kumano M, Shono F, Adachi H, Matsuo M (1996): A research to develop a predicting system of mammalian subacute toxicity. I. Prediction of subacute toxicity using the biological parameters of acute toxicities. *Chemosphere*, 32(5), 979-998.

C. 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。齟齬がられた 11 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。

D. 倫理面への配慮

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

性はない。

E. 健康危機情報

特になし

F. 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, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A and Kamata E, Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, (in press)
- 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-chloro benzotriazole 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 $\alpha 2u$ -glubulin 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. (*Kyoto*), **45**, 137-145.

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 카테고리アプローチ, 第一回 카테고리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-ジブプロモプロパン及び1,1,2,2-テトラブプロモエタン, 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.

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

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

分担研究者 青木 康展 独立行政法人国立環境研究所 化学物質環境リスク研究センター 室長

研究要旨： 28日反復投与試験で得られる *NOEL* について、構造活性相関を用いた予測手法について研究を行った。肝毒性が明らかな、あるいは疑われるフッ素化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。この結果は、肝毒性を有する化合物の毒性を予測するためには、PPAR α リガンド活性のメカニズムを構造活性相関に反映させる必要があることを示唆するものである。このことは、構造活性相関を明らかにするには、毒性発現に関係する構造および物理化学的パラメータに基づいて毒性作用機序ごとに化合物をクラスターに分類し、毒性作用機序が異なる各クラスターでは、それぞれで予測手法や使用する記述子を検討しなくてはならないことを示している。肝毒性を有する化合物の毒性予測では、物理化学パラメータの他に PPAR の活性値を考慮し、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 モデルとして信頼性の高いモデル構築することが出来た。一方、異なる作用機序を有する化合物群をどのように予測するかという課題が顕在した。

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。PPAR α ノックアウトマウスに実験動物用飼料ではなく、植物種子などの自然食を与え、その応答を解析することによって、PPAR α が解毒反応でも間接的ながら必須の役割をしていることを見出した。この知見は、従来から解毒に関わっているとされている核内受容体以外でも、そのアンタゴニストとなる化合物が毒性を示す場合があるという、新たな毒性発現機構を提示するものである。

① 毒性既知のフッ素化合物等の定量的構造活性相関

(研究協力者；国立環境研究所 NIES フェロー・小松英司)

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

(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（図 1-1）。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 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検討した。表 1-2 に各記述子と *NOEL* との相関係数マトリックスを示す。一般的に QSAR 式に使用されている *LogP* は、これらの化合物では相関性が悪い（図 1-2）。他の記述子では、*E_{HOMO}* 以外は *NOEL* を説明する因子にはなりにくい。*E_{HOMO}* については、図 1-3 に示すとおり、高 *E_{HOMO}* と低 *E_{HOMO}* を有するクラスターに分類されるだけで、定量的構造活性相関には *E_{HOMO}* のみだけでは構築できないと考えられる。したがって、*NOEL* の構造活性相関を構築する場合、複数の記述子を使用する必要があると考えられる。そこで、上記で検討した記述子を使用して重相関解析を行った（図 1-4、図 1-5）。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。図 1-5 に示すとおり、 E_{HOMO} を考慮しない場合でも、ある程度の予測性があるが、di (2-ethyl hexyl) adipate と di (2-ethyl hexyl) phthalate のように電気移動結合の効果を入れないと表現できない物質があることがわかった。以上により構築した QSAR 式を以下に示す。

$$Log(1/NOEL) = 0.47LogP + 0.47E_{HOMO} - 0.07VDW - 0.11Log(1/EC50) + 5.36 \quad (1)$$

このモデルでは、PFOS の毒性のみが表現できなかった (図 1-6)。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。回帰式に使用した記述子の *Effect-Ratio* を計算すると、 $Log(1/EC50)$ が 0.41 と最も大きく、次に $LogP$ が 0.39、 VDW 0.32、 $Homo$ が 0.28 の順となっており、肝毒性を示す化合物の *NOEL* の予測では選定した記述子が一応に必要であるとされる。

(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)。これら検証に用いた物質は、PPAR との活性が小さいとことが PPAR-リガンドの複合体モデルの結果からわかっている (図 1-8)。一方、化合物は、毒性 (NOEL) は強いものから弱いものまで存在している。また、PFOS を除いた学習系の 13 物質と検証系の 9 物質の $LogP$ と *NOEL* の関係を見ると、疎水性からみた毒性の作用機序が全く異なっていると考えられ

る (図 1-9)。

以上のことから、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。したがって、9 物質は、式(1)の検証系の化合物にはならないといえる。そこで、検証系 9 物質を含めた QSAR 式を導出した。構築した QSAR 式は、以下の通りである。

$$Log(1/NOEL) = 0.34LogP + 0.38E_{HOMO} + 0.061VDW - 0.76Log(1/EC50) - 0.0262 \quad (2)$$

式(1)および式(2)では、 $LogP$ や E_{HOMO} の係数はそれほど変わらないが、 VDW の係数の符号が異なっていること、 $Log(1/EC50)$ の係数が大きな違いがあること等異なった。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い

Carbaryl やイミドを持つ Folpet は、式(2)で予測した値と実測値とが大きく乖離してしまう。この 2 物質は、構造に特徴があり、毒性作用機序が異なる可能性があるため、式(2)のドメインから外れてしまうと考えられる。

以上の検証系による QSAR 式の適合性の検討の結果、物質の構造、物理化学的パラメータ、PPAR 活性の違いにより、*NOEL* の毒性メカニズムが異なることから、同じ類縁化合物群 (ドメイン) に属さない化合物は構造活性相関による毒性の予測が困難になる場合がある。

D. 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。

E. 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。
- 異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

(研究協力者：明治薬科大学学生化学教室教授・本島清人)

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

なお、本動物実験は、明治薬科大学動物実験倫理委員会へ実験計画書を提出し、審査を受け承認を得た中で行なわれた (承認番号 1304)。

C. 研究結果

1. PPAR α が解毒応答において必須の役割を演じている。

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 (図 2-1)。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。解毒反応が充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 2-2)。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。

2. 試験化合物の中に、PPAR α アンタゴニスト活性を有するものがある。

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 (図 2-3)。

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。

D. 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することを示すのみならず、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のであろう。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 受容体として区分けするよりは、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。

E. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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: Kawabe K, Saegusa H, Seto K, Urabe H and Motojima K, *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 1534-1546 (2005)
2. Regulation of SR-BI protein levels by phosphorylation of its associated protein, PDZK1: Nakamura T^a, Shibata N^a, Nishimoto-Shibata T, Feng D, Ikemoto M, Motojima K, Iso-O N, Tsukamoto K, Tsujimoto M and Arai H, *Proc Natl Acad Sci USA.* 20, 13404-13409 (2005)
3. Third promoter and differential regulation of mouse and human fatty acid translocase/CD36 genes: Sato O, Takanashi N and Motojima K, *Mol. Cell. Biochem.* (in press).
4. Identification of ERR α as a specific partner of PGC-1 α for the activation of PDK4 gene expression in muscle: Araki M and Motojima K, *FEBS J.* (in press).

2. 学会発表

1. Study on (Quantitative) structure-activity relationships of acute ecotoxicity based pattern recognition methods using fragment. E. Komatsu, H. Shiraishi and H. Yoshioka, SETAC North America 26th Annual Meeting, 2005, Baltimore, USA

2. PPAR α -dependent and independent induction of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in the mouse muscle: K. Motojima and S. Araki, 3rd International Symposium on PPARs Efficacy and Safety, 2005/3, Monte Carlo, Monaco.
 3. ミトコンドリアプロテアーゼ HtrA2 と PI3Kinase の相互作用: 東 恭一郎、本島清人、第 49 回日本薬学会関東支部大会、2005/10、東京
 4. 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: 横井泰英、本島清人、第 49 回日本薬学会関東支部大会、2005/10、東京
 5. 代謝変換酵素 PDK4 の PPAR α 依存的・非依存的誘導機構の解析: 荒木 信、浦辺宏明、本島清人、第 49 回日本薬学会関東支部大会、2005/10、東京
 6. 小腸特異的脂肪酸輸送タンパク質 4 の酵素学的性質: 東恭一郎、外山加奈、本島清人、第 78 回日本生化学会、神戸、2005/10
 7. 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: 横井泰英、本島清人、第 78 回日本生化学会、神戸、2005/10
 8. PPAR α はある種の解毒システム発現に必須である: 本島清人、平井利武、第 78 回日本生化学会、神戸、2005/10
 9. ラット肝癌細胞における L-FABP 遺伝子の転写調節: 浦辺宏明、本島清人、第 78 回日本生化学会、神戸、2005/10
 10. 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: 荒木信、本島清人、第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005/12
 11. ミトコンドリアプロテアーゼ HtrA2 と p110bPI3-Kinase の相互作用: 東恭一郎、本島清人、第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005/12
 12. 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: 松下周平、山口智広、本島清人、廣瀬富美子、大隈隆、第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005/12
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

1-1(a) フッ素化化合物およびフタル酸エステル類などの化合物 (学習系)

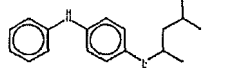
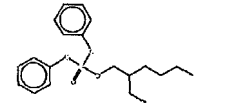
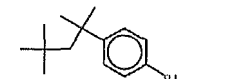
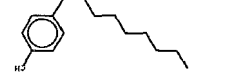
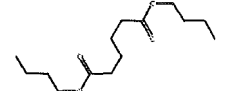
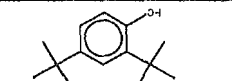
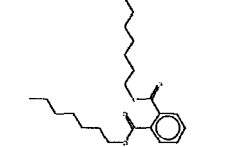
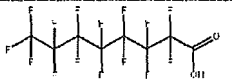
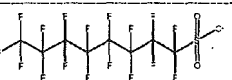
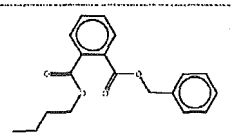
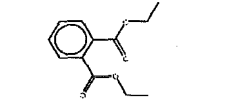
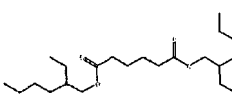
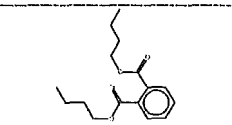
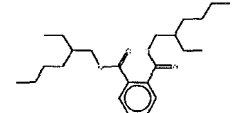
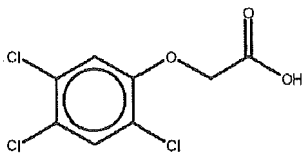
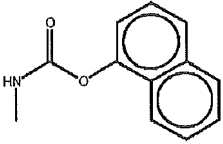
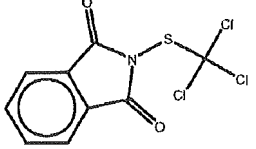
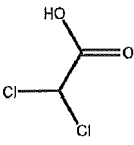
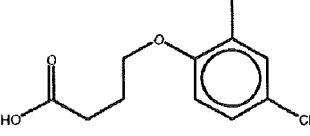
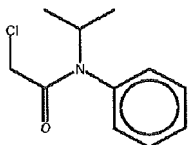

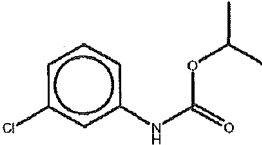
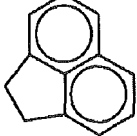
Mol_ID	系	STRUCTURE	Name	MolWt	NOEL	PPAR活性	Kow
1	S		N-(1,3-Dimethylbutyl)-N-phenyl-p-phenylenediamine	268.4	4	++	4.68
4	S		2-Ethyl hexyl diphenyl phosphate	362.4	20	+	6.30
5	S		p-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenol	206.3	15	++	5.28
6	S		Nonylphenol	220.4	150	+	5.99
7	S		Dibutyl adipate	258.4	1000	1/-	4.33
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) フッ素化合物およ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

化合物のPPAR活性とNOELの関係

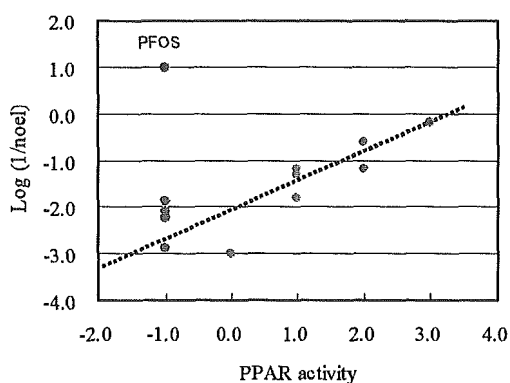


図 1-1 NOEL と PPAR 活性の関係

化合物の疎水性とNOELの関係

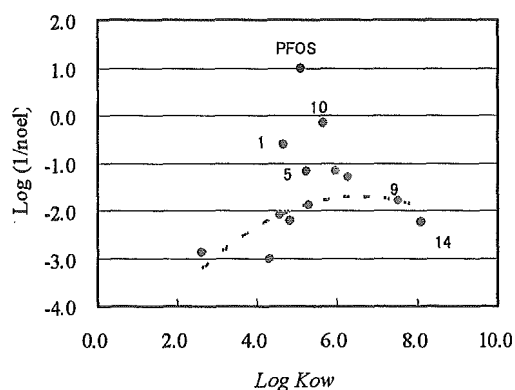


図 1-2 疎水性 (LogP) と NOEL との関係

表 1-2 記述子と NOEL との相関係数マトリックス

Kow	1.00							
Mol_Weight	0.47	1.00						
VDW	0.58	-0.03	1.00					
Dipole	0.10	0.28	0.17	1.00				
Homo	-0.20	0.51	-0.70	0.00	1.00			
Lumo	-0.09	0.57	-0.57	-0.04	0.59	1.00		
Frontia	-0.05	0.52	-0.48	-0.04	0.43	0.98	1.00	
Log(1/C)	0.17	0.59	-0.58	0.12	0.81	0.69	0.58	1.00
Kow	Mol_Weight	VDW	Dipole	Homo	Lumo	Frontia	Log(1/C)	

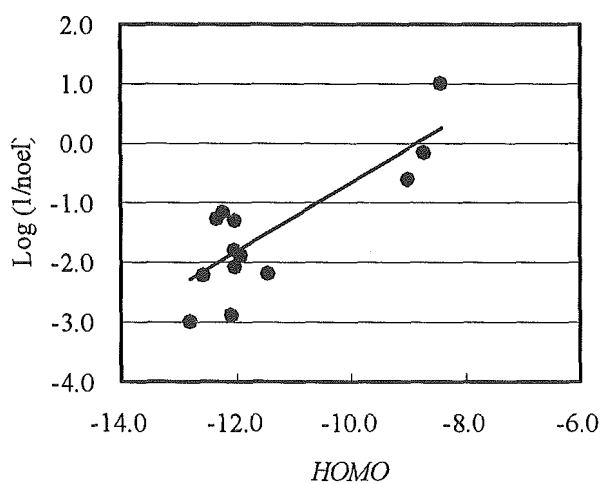


図 1-3 最高被占軌道エネルギー (E_{HOMO}) と NOEL の関係