

20050160B

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における
定量的構造活性相関に関する研究

平成15～17年度 総合研究報告書

主任研究者 林 真

平成18(2006)年3月

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

平成 18 年 4 月 7 日

厚生労働大臣 川崎 二郎 殿

住 所 〒243-0431 神奈川県海老名市
上今泉4-23-3-1

研究者 氏名 ツガナ 林 真 ハシ マコト
(所属機関 国立医薬品食品衛生研究所) 

平成 15 年度から実施した厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名(課題番号) : 化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究
(H15-化学-003)

国庫補助金精算所要額 : 金 150,000,000 円也 (うち間接経費 0 円)

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

なし

目 次

I. 総合研究報告書 [別添 3]

化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究 _____ 1

林 真、鎌田栄一、広瀬明彦

反復投与毒性試験を指標にした 3 次元構造活性相関モデルに関する研究 _____ 9

青木康展

毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究 _____ 27

広野修一

化学物質の代謝活性化の予測モデルに関する研究 _____ 33

山添 康

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 51

III. 研究成果の刊行物・別冊 _____ 55

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における
定量的構造活性相関に関する研究

平成15年度～17年度 総合研究報告書

主任研究者 林 真

厚生労働科学研究費補助金

(化学物質リスク研究事業)

総合研究報告書

化学物質リスク評価における定量的構造活性相関に関する研究

主任研究者 林 真 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

研究要旨： 昭和 48 年の「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法) 制定までに日本国内で生産または輸入されていた化学物質(既存化学物質)のリストを国が作成し、このリストに記載されていない化学物質はこの化審法に基づいて新規化学物質となり、国の審査を受けなければならなくなった。しかし、既存化学物質リストには約 2 万以上の化学物質が登録されているが、そのほとんどの化学物質の安全性の情報は皆無に等しい。既存化学物質の安全性は国が実施することとなっているが、現在までに約 1,000 物質が終了したに過ぎない。しかし、全ての化学物質について一律の試験を行い、データを収集することは経済的にも動物愛護の観点からも現実的なこととは言い難い。この問題の解決策の一案として構造活性相関(SAR)が有用であると考えられている。

既存の構造活性相関モデルの比較に関する研究では、化学物質のリスク評価を実施する上で必要とされる毒性を予測するにあたり、評価上必要な試験項目についての定量的構造活性相関に関して、国際的に使用されているいくつかの構造活性相関コンピュータープログラムの検証を行い、予測精度を上げるためのアルゴリズムの改良を行い、既存点検化学物質選定のためのフローチャートを考案し、その信頼性について検討した。既存化学物質の安全性点検において最低限必要な試験項目として、AMES 試験、染色体試験、28 日間反復投与試験が挙げられ、その内、AMES 試験と染色体試験用に、DEREK、MULTICASE、AdmeWorks の 3 つの(Q)SAR モデルを選定し、各々モデルの各試験についての信頼性を評価した結果、AMES 試験では 66~93%、染色体試験では 66~77%の正答率が得られた。また、AMES 試験や染色体試験で化学物質が生体と反応をおこすには、細胞膜を通過する必要があるため、その際には分子量が重要な要因となる。このことから、陽性物質の分子量分布を検討した結果、分子量 3000 以下に、AMES 試験では 96.4%、染色体試験では 98.9%が分布し、3000 以上の物質の過半数にはエポキシ基が存在していたことから、フローチャートの最初では、分子量 3000 で選択し、3000 以下の場合には上記 3 つの(Q)SAR モデルで計算を行うフローチャートを作製した。このフローチャートについて、既存化学物質点検事業で実施された AMES、染色体試験結果をもとに、その信頼性を検討したところ、ほぼ使用に耐えうるフローチャートで有ることが判明した。しかし、反復投与試験については上記 3 つの(Q)SAR モデルが適用できないことから、化合物生物活性リーズニングソフト(ClassPharmer)を使用して、モデルの構築を試みたが、データ数が少ないこと等から作製することは出来なかった。今後の課題としては、AMES 試験及び染色体試験の各々のモデルの精度の向上を行い、反復投与試験においては更なるデータ収集を行い、新しいモデル構築を行う必要性が考えられた。

反復投与毒性試験を指標にした 3 次元構造活性相関モデルに関する研究では、フッ素化合物の毒性発現に関係する構造情報を抽出するために、毒性試験の結果の情報が得られた化合物について、化合物の特徴を自己組織化マップによってクラスター分類し、さらに、ニューラルネットワークに準拠した定量的構造活性相関の解析を行った。重回帰解析より予測性の高い QSAR モデルを構築することが出来た。また、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、ある種の化学物質の肝毒性発現が、PPAR α を活性化し脂質代謝を攪乱することによっている可能性が考えられることから、肝毒性についての知見があるフッ素化合物およびフタル酸エステル類をはじめとした試験化学物質を用いて、PPAR α リガンド活性を測定した。化学物質によって細胞を用いた場合と、マウス個体と用いた場合で、リガンド活性の強さに差がある現象や、ヒトの受容体とマウスの受容体とで応答が異なる場合が例外的にあったが、概ね一致する結果となった。また、リガンド活性と肝毒性との対応が可能と思われる化学物質群があった。これらの結果から、特定の構造や特性をもった化合物の場合は、その PPAR α リガンド活性が毒性発現の指標になる可能性がある。そこでリガンド活性を第1部の QSAR に活用した。さらに、PPAR α ノックアウトマウスを用いた解析から、アゴニスト活性に加え、アンタゴニスト活性も毒性発現に関わる可能性があることと、毒性発現に至る機構には核内受容体群間のネットワークが重要であることが示唆された。

毒性予測に関する種々の CoMFA モデルの構築に関する研究では、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) のサブタイプである PPAR α は、肝臓における脂肪酸の代謝や中性脂質の代謝に関連する遺伝子の発現を制御している。現在、プラスチック可塑剤、農薬などの化合物が、齧歯類において PPAR α を介して酵素誘導、肝臓 DNA 合成、肝臓肥大、肝臓ガンを誘発することが知られている。そのため PPAR α とそのリガンドの結合に関する情報に基づいて PPAR α に対する結合活性を予測して化学物質の毒性を推定することは、化学物質の人体に対するリスクを予測することにおいて有用である。そこで、新規リガンドのヒト PPAR α への結合活性の予測が可能な三次元定量的構造活性相関解析(3D-QSAR)モデルを構築する事を目的として研究を行い、ヒト PPAR α 活性が既知の 20 個の薬物系リガンドを使って統計的に有意な 3D-QSAR モデルを作成した。そして得られた 3D-QSAR モデルを使って、肝毒性を示す化合物の PPAR α に対する活性予測を行った。さらにそれらの化合物から生じると考えられる代謝化合物に対しても解析を行い、これらの結果を PPAR α に対する実験結果と比較したところ、活性の大きさをほぼ正しく予測できることがわかった。このことから、新規リガンドの PPAR α 結合活性の大きさをほぼ正しく予測できる 3D-QSAR モデルを構築することができたと考えられる。

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

分担研究者

鎌田 栄一 国立医薬品食品衛生研究所
総合評価研究室 主任研究官
広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所
総合評価研究室 主任研究官
青木 康展 独立行政法人国立環境研究所
化学物質環境リスク研究センター
室長
広野 修一 北里大学 薬学部 教授
山添 康 東北大学大学院薬学研究科
薬物動態学分野 教授

協力研究者

高橋 美加 国立医薬品食品衛生研究所
リサーチレジデント
本島 清人 明治薬科大学 生化学教室
教授
小松 英司 国立環境研究所 NIES フェロー
秋山 浩子 櫛シーティシー・ラボラトリー
システムズ
森田 健 国立医薬品食品衛生研究

安全情報部 主任研究官

中嶋 圓 (財)食品農医薬品安全性評価センター
益森 勝志 (財)食品農医薬品安全性評価センター

A. 研究目的

現在、化学物質は、日本国内で年間 10 万種、5 億トンの生産がなされていると言われているものの、その毒性学的性状が明らかになっているものは数%にも満たない状況である。化学物質はそれぞれ各種の用途で広範に用いられるとともに、国民の日常生活にも入り込んでいるものであることから、個々の化学物質の特性を効率的に把握かつ評価し、必要に応じた管理を進めることは、国民の健康維持増進に必要不可欠となっている。

しかし、変異原性をはじめ毒性学的性状が明らかになっている化学物質は少ない。更に、個々の化学物質について、動物を用いて試験を行い、デ

ータを収集することは、試験実施機関での処理能力の観点から短期間に実施することは不可能であり、また全ての化学物質について一律の試験を行い、データを収集することは経済的にも動物愛護の観点からも適切なことではない。既に存在する化学物質の知見をもとに毒性学的影響を高精度で予測する方法が開発され、その予測に基づき評価作業を進めることは、より安全性の向上に資するのみならず、リスク評価段階におけるデータギャップを埋める方法にも利用が可能であり、その結果、より安全性評価の向上に資することが可能である。

本研究では、化学物質のリスク評価を実施する上で必要とされる毒性を予測するにあたり、評価に必要不可欠である試験項目について、定量的構造活性相関に関する研究や定量的構造活性相関に関する国際比較を実施し、まず、国際的に使用されているいくつかの構造活性相関コンピュータープログラムの検証を行い問題点の洗い出しを行うと共に、予測精度を上げるためのアルゴリズムの改良を行っている。また、標的分子との結合能を指標にした3D-QSARの方法開発、これらの研究を効率的に促進させるために求められるデータベースに関する研究を行い、CoMFAモデルの適用性や化学物質の代謝活性化の予測モデルについて検討した。さらに、国際間のデータの相互受入を促進させるため、海外の専門家とも連携をとるため、構造活性相関コンピュータープログラム制作会社の研究者と共同開発を行っている。

本研究において、マウスを用いた試験に関しては、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、また、ヒト材料を扱う試験は実施していないことから、動物愛護およびヒトに対する倫理的な問題が生ずる可能性はない。

B. 研究報告

●既存の構造活性相関モデルの比較に関する研究

1. 分子量と AMES 試験及び染色体試験結果との関係

1.1 方法

化学物質の生体内へ吸収されるためにはまず細胞膜を通過しなければならない。

AMES 試験及び染色体試験においても化学物質が細胞膜を通過することは必要条件であるので、AMES 試験陽性結果を示した 194 物質、染色体試験陽性結果を示した 657 化合物について、その分子量分布について検討した。

1.2. 結果及び考察

AMES 試験陽性化合物の分子量を累積度数(図1)に示す。分子量 1000 までの化合物は全体の 87.1%で、分子量 3000 まで考慮すると 96.4%が分布していた。

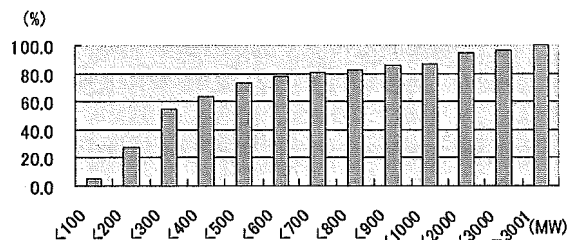


図1 AMES試験陽性化合物の分子量分布(累積度数)

分子量 3,000 以上で陽性を示したのは 7 化合物のみであった。

以上のことから分子量のみで AMES 試験結果を予測することは出来ないが、分子量 3000 以上であれば概ね「陰性」と考えることが出来る。上記の 7 物質中 4 物質の構造式中に末端にエポキシサイドをもった化合物があったことから、分子量 3000 であっても末端にエポキシサイドを有している場合には「陽性」と判断した方が良くと考えられた。

染色体試験結果陽性の 657 化合物の分子量の累積度数を図2に示す。分子量 1000 までの化合物は全体の 89.1%で、分子量 3000 まで考慮すると 98.9%が分布していた。

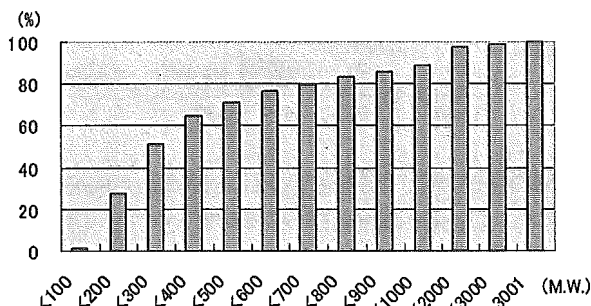


図2 染色体試験陽性化合物の分子量分布(累積度数)

分子量 3,000 以上で陽性を示したのは 657 物質中 5 化合物であり、AMES 試験と同様にこの 5 物質中 4 物質にエポキシサイドを有していた。

2. 既存の(Q)SARモデルの比較

2.1. 方法

OECD の QSAR 専門家会議(36th Joint Meeting, 4th-6th February 2004)において検討対象としている SAR モデル (DEREK, MULTICASE) と、日本で開発しているモデル (AdmeWorks) の計 3 モデルについて検証を行った。

DEREK は、LHASA UK 社によって開発された

モデルで、世界の 80 数機関で使用されており、独自のルールベースを作成することでその信頼性を向上することが出来る。

MULTICASE(MCase)は米国 Multicase 社が開発したモデルで、実験済みのデータからコンピュータが統計的・化学的に最適化された高度なデータベースを作成し、そこから活性値を判断するシステムであり、米国 FDA もこのモデルを使用している。

AdmeWorks(AWorks)は富士通九州が開発しているモデルで、多変量解析/パターン認識による毒性予測モデルである。

AMES 試験用モデルの検証には、Kirkland らの報告を用いた。染色体試験用モデルの検証には、厚生労働省の既存化学物質安全性点検事業で実施された染色体試験結果(219 物質)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

2.2.1 AMES 試験用モデル

3 つの SAR モデルに Kirkland らの構造式を INPUT したところ、DEREK は、表 1 に示すように、陽性を陽性として評価する割合(Sensitivity)は 81.8%、陰性を陰性として評価する割合 (Specificity)は 80.9%、全体の一致率(Concordance)は 81.4%であった。

表 1 DEREK

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

MultiCase では、Sensitivity は 88.0%、Specificity は 97.6%、Concordance は 92.7%であった (表 2)。

表 2 MultiCase

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

AdmeWorks では、Sensitivity は 75.0%、Specificity は 55.7%、Concordance は 65.6%であった (表 3)。

表 3 AdmeWorks

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

以上の結果から、陽性結果をより正しく示すモデルは、MultiCase 次いで DEREK, AdomeWorks の順となった。また、陰性結果の場合も同様な順位が見られた。

3. DEREK のバージョンアップにおける精度変化 (AMES 試験)

(Q)SAR モデルの DEREK の開発元(LHASA 社, UK)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。

3.1. 方法

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 試験結果のうち、構造式が Input できた 232 物質を用いた。

3.2. 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。

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)
Total		232	43	189	85.8% (Concordance)

表 2 DEREK Ver.8.01 の信頼性

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

表 3 DEREK Ver.9.00 の信頼性

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

Ver.7 の AMES に関する Alert 数は 74、Ver.8 は 75 であったが、Ver.9 は本研究班の提言による Alert が追加され 79 となった。

表が示すようにバージョンが上がるにつれ、試験結果陽性化合物で計算結果が陽性を示す割合 (Sensitivity)には変化が見られなかったが、試験結果陰性化合物で計算結果が陰性を示す割合

(Specificity)および試験結果と同じ結果を示す割合(Concordances)については、その精度の向上が見られた。今後は Sensitivity の向上のために、試験結果陽性で計算結果陰性 [偽陰性] の 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。

4. 染色体試験における(Q)SAR モデルの比較

初期の染色体試験用のモデルの精度では、既存点検化学物質選択用フローチャート用を使用することはできなかったため、各モデルの開発元と協同研究を行い、更なる改良を行った。

4.1. 方法

DEREK については LHASA 社(UK)と染色体試験用の Alert の追加を行い、MCase は MultiCase 社(USA)と染色体試験用のデータベースの改良を、AWorks は富士通九州(日本)とモデルの改良を行った。その改良バージョンについて、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検証した。

4.2. 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。

5. 既存点検化学物質選択のためのフローチャートの作製およびその信頼性

5.1. フローチャートの作製

化学物質の生体内へ吸収されるためにはまず細胞膜を通過しなければ成らない。生体膜透過機構の一つに受動輸送があり、分子の大きさが膜の小孔より小さく、水に溶けやすい物質は膜の小孔中を単純拡散によって吸収される。脂溶性の高い場合には膜の脂質中を単純拡散により通過する。魚を用いた濃縮性試験において、「えら」からの化学物質の吸収を分子と濃縮性で比較したところ、分子の断面の最大幅が 9.5 Å 以上の分子(分子量で約 1000)では「えら」からの吸収がほとんど認められないことが報告されている。

点検用物質を選択する上で分子量を考慮する場合、「えら」からの吸収は概ね分子量 1000 が目安となるが、化合物の吸収は単純拡散だけでなく他の能動移送も考えられることから、1000 以上の物質でも陽性結果が見られている。1. 分子量と AMES 試験及び染色体試験結果との関係で示したように、AMES の場合、分子量 3000 以上になると 7/194 物質(3.6%)のみが陽性結果を示し、染色体試験では 5/657 物質のみであり、それらの物質の過半数には末端にエポキシドを有していた。このことから、末端にエポキシドを有している分子量 3000 の化合物については概ね試験結果「陽性」と判断が出来ると推測された。

分子量を考慮した AMES 試験及び染色体試験用に考案したフローチャートを図 3 に示す。

5.2. フローチャートの信頼性

AMES 試験及び染色体試験の場合のフローチャートの信頼性について検討した。

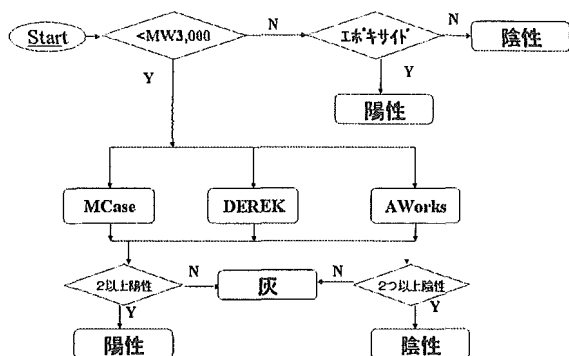


図3 AMES・染色体試験用判定フローチャート

5.2.1 方法

AMES 試験については、Kirkland らの報告した AMES 試験結果が記載された 703 化合物について、染色体については既存化学物質安全性点検事業で実施された 219 物質を用いて信頼性を検証した。

5.2.2. 結果及び考察

AMES 試験の結果を表 7 に、染色体試験の場合は表 8 に示す。

表 7 AMES 試験用フローチャートの信頼性(2つ以上同じ結果)

	試験結果		(Q)SAR モデル		
			++以上	--以上	
	+	319	280	39	86.7% (Concordance)
	-	291	42	249	87.8% (Sensitivity)
		610	322	288	85.6% (Specificity)
					86.8% (Applicability)

表 8 染色体試験用フローチャートの信頼性(2つ以上同じ結果)

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

AMES 試験の Concordance は 86.7%が得られていることから、ほぼ、判定予測としてのフローチャートとして使用出来ることが判明した。染色体試験については 76.6%の Concordance しか示していないことから、現段階でも判定予測に使用出来るが、更なるモデルの精度向上を行う必要が判明した。

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

染色体試験用 (Q) SAR モデルの精度は AMES 試験に比較し劣っていることから、その精度向上のため

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ことから、各種の文献から染色体試験を抽出して、その化合物の構造式分類を行い、Toxicophore の特定を行った。

6.1. 方法

染色体異常試験データトレーニングデータセットとして 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-) とし、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い、更に、目視による Toxicophore の抽出し、優先順位付けられた 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。

6.2. 結果及び考察

クラス分けした結果から、目視による解析もを行い、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。

特定された染色体異常活性の高いクラスが持つ 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 染色体異常陰性の37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%)

詳細に検討した結果、8 個の Toxicophore が特定された。更に目視により新規 Toxicophore の特定を試みた結果、更に 21 個の Toxicophore が特定され、計 29 個が特定された。

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 となったことから、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と考えられるが、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と考えられる。

7. 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

7.1 方法

種々の化学物質の AMES 試験結果は文献として

公表されていることから、その中の Synder ら(2004)、White ら(2003)と Kirkland ら(2005)の報告している化合物について3つの(Q)SAR モデルで検証し、結果に齟齬が見られた化合物のうち、Ames 試験陽性で上記3つの(Q)SARモデル全てに陰性を示した10化合物と、Ames 試験陰性で(Q)SARモデルで陽性を示した3化合物、計13化合物について、(Q)SARモデルの信頼性向上の目的の為に AMES 試験を行った。

7.2. 結果及び考察

結果を表11に示す。

Table 11 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
Citalopram	59729-33-8	+	-	-	-	-
Naloxone	465-65-6	+	+	-	-	-
Oxcarbazepime	28721-07-5	+	+	-	-	-
Rabeprazole	117976-89-3	+	+	-	-	-
2-(2-Methylpropyl) thiazole	18640-74-9	+	+	-	-	-
2-Chloropyridine	109-09-1	+	+	-	-	-
Pyrogallol	87-66-1	+	+	-	-	-
<i>o</i> -Phenylphenol	90-43-7	+	-	-	-	-
2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	81-16-3	+	+	-	-	-
2-Vinylpyridine	100-69-6	+	+	-	-	-
Toremifene	89778-26-7	-	-	+	+	+
Poly(2-hydroxypropyl methacrylate)	25703-79-1	-	-	+	+	+
Methidathion	950-37-8	-	-	+	+	+

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いることから、陰性であることは明白であることから、*in silico* システムでの陰性結果を支持するものとする。残りの8化合物については、(Q)SARモデルのデータベースに追加していくことで信頼性の向上が寄与すると考えられる。

8. 参考文献

Kirkland D, Aardema M, Henderson L, Muller L. (2005): Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat Res.* 584, 1-256.

Snyder RD, Pearl GS, Mandakas G, Choy WN, Goodsaid WN, Rosenblum WN (2004):

Assessment of the sensitivity of the computational programs DEREK, TOPKAT, and MCASE in the prediction of the genotoxicity of pharmaceutical molecules, *Environ. Mol. Mutagen.* 43, 143-58.

White AC, Mueller RA, Gallavan RH, Aaron S, Wilson AG (2003): A multiple in silico program approach for the prediction of mutagenicity from chemical structure, *Mutat. Res.* 539, 77-89.

9. 結論

分子量と AMES 試験及び染色体試験結果との関係では、分子量 3000 以内に陽性化合物の 87% 以上が含まれ、残りの化合物の過半数にエポキシサイドを末端に有する化合物であることから、末端にエポキシサイドを有している分子量 3000 の化合物については概ね試験結果「陽性」と判断が出来ることと推測された。

既存点検化学物質用フローチャートに使用する

る DEREK、MultiCase (MCase)及び AdmeWorks (AWorks)の AMES 試験および染色体試験については、その精度の向上を開発元と共同研究を行ってきた。その結果、AMES 試験の Concordance において 65.6~92.7%を示し、十分に使用できる範囲に精度向上したが、染色体試験の Concordance は 65.7~77.4%と AMES 試験より低い値が見られたが、ほぼ使用できる範囲までに向上した。

この3つのモデルと分子量を考慮したフローチャートを作製し、その信頼性を検証した結果、AMES 試験、染色体試験ともに、その concordance で各々86.7%、76.6%を示した。両試験のフローチャートは、実際の使用に問題は生じる可能性はないと思われるが、更なるモデルの精度向上が必要である。

また、染色体試験の精度向上の為に、ClassPharmer を使用して Toxicophore を抽出し、全 29 個の Toxicophore が抽出された。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。また、文献に報告されている AMES 試験の化合物について、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、ガイドラインに基づいた 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。

●反復投与毒性試験を指標にした3次元構造活性 相関モデルに関する研究

1. 毒性既知のフッ素化化合物のクラスタリング とニューラルネットワークによる QSAR

28日間反復投与試験の結果の情報が得られているフッ素化化合物について、電子的因子、立体因子を説明するパラメータを用いて化合物を自己組織化マップによってクラスタ分類した。各々の分類した化合物群について、ニューラルネットワーク法を用いて定量的構造活性相関の解析を行った。

1.2. 方法及び結果

毒性データがある34個のフッ素化化合物について、標的臓器を28日間反復投与試験の病理学・生化学試験の結果から推定した。また、各化合物のNOELは28日間反復投与試験の結果をそのまま採用した(平成15年度報告書図表2-1参照)。

これら化合物の置換基の種類および活性を説明する疎水性 *Kow*、立体因子(分子量、VDW半径)、電子的因子(*Dipole*、*HOMO*、*LUMO*)で化合物の特徴を自己組織化マップ(SOM)によって分類した。

クラスタ解析をした結果は平成15年度報告書図表2-1に示した通りであるが、SOMマップを図1-1に示す。34個のフッ素化化合物は10クラスタに分類された。

クラスタ6から10は、物理化学的パラメータおよび置換基パラメータの特有性からクラスタが分離して存在している。クラスタ7に属している化合物5-6414は、甲状腺に症状が現れている。また、クラスタ8に属している4-1687は、腎臓で毒性が現れている。構造に特徴がある2-3839、H15-99等は、どのクラスタにも属さず高毒性を有していることが示される。本解析で行った分類法により、エンドポイントの違いや特異的な毒性を物理化学的パラメータおよび置換基パラメータで分類することが出来ることを示した。

上記によって分類された化学物質群を重回帰モデルによってフッ素化化合物のNOELの定量的構造活性相関について検討を行った。

分類したクラスタごとに重回帰解析を行った結果、クラスタ1では予測値と実測値の R^2 値が0.78で、クラスタ2では、 R^2 値が0.8であった(図1-2)。しかしながら、クラスタ1の化合物数は12であり、クラスタ2の化合物数は8である。使用した構造活性相関式は、

$$NOEL = \alpha_1 \cdot Kow + \alpha_2 \cdot \text{分子量} + \alpha_3 \cdot \text{VDW半径} + \alpha_4 \cdot \text{Dipole} + \alpha_5 \cdot \text{HOMO} + \alpha_6 \cdot \text{LUMO} + \beta \quad (1)$$

を使用した。各係数のNOELに対する寄与率を図1-2に示す。クラスタ1では、*LUMO*が最も大きく*HOMO*が、クラスタ2では、*Kow*、*HOMO*および分子量がNOELに効いていることがわかった。両クラスタでは、*HOMO*、*LUMO*が活性のパラメータとして大きく寄与している。このことから、活性には電子的因子が強く影響していると判断される。しかしながら、重回帰解析では、パラメータ数に対し化合物数が少なく、予測信頼性がないと考えられる。

そこで、標的臓器が同じであり、記述子群のトポロジー的距離が似ているクラスタ1、クラスタ2を併せてニューラルネットワークによりNOELを予測した。なお、予測に使用した記述子は、重回帰で求めた寄与率の高い*Kow*、*LUMO*、*HOMO*、そして、*Dipole*を使った。

予測結果を図1-3に示す。予測値と実測値の相関係数 R^2 値は、*LOO*で求めたときが0.835であり、クラスタ1およびクラスタ2を一緒に解析しながらも重回帰解析より高い精度となっており、予測性に優れているといえる。ネットワークを構築した時の記述子の*EffectRatio*は、*LUMO*がもっとも高く0.6、次に*Dipole*が0.5、*Kow*、*HOMO*が0.1となっている。*LUMO*、*Dipole*が大きい影響度を示しているということは、これらが反応性を有している物質群と考えられる。なお、*Dipole*が大きい*LUMO*が最も小さいH15-55、一つのベンゼン環に $-CF_3$ が2つ置換しており*Dipole*が大きい3-4511は、実測値と予測値が乖離していた。これらの物質は、構造や記述子からその他とは異なる作用機序による活性を有すると考えられる。したがって、同じクラスタとして予測することは出来ないと推測される。これらの物質については、クロスバリデーションからは除外している。

この構築したネットワークでその他のクラスタの物質を予測しても、実測値を予測することはほとんど出来なかった。また、全物質を用いてネットワークの構築しようとした場合、記述子のダイバーシティが大きく、毒性を説明する良好なネットワークが構築することは出来なかった。このことから、クラスタ間には異なる作用機序を有すると考えられる。

1.3. 結論

ニューラルネットワークにより、物理化学的特性のトポロジー的距離の近いクラスタ1およびクラスタ2を併せてNOELを予測した。その結果、重回帰解析より予測性の高いQSARモデルを構築することが出来た。また、ニューラルネットワークで解析することにより、毒性を説明する因子を解析することができ、その情報から作用機序を推定することも出来た。また、記述子および構

造に特異性のある物質については、予測値と実測値が乖離してしまうことから、一連の置換基を持つ化合物群と違う作用機序を持っていると推定が出来る。

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

2. 肝毒性既知の化学物質の定量的構造活性相関

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

2.1. 方法

28 日間反復投与試験の結果の情報が得られたフッ素化合物およびフタル酸エステル類化合物などについて解析を行なった（表 2-1）。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、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。

2.2. 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、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 2-1）。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 2-1 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 $\log P$ 、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 2-2 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 $\log P$ は、これらの化合物では相関性が悪い（図 2-2）。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 2-3 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 2-4、図 2-5）。この結果、疎水性パラメータ： $\log P$ 、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 2-5 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。

$$\begin{aligned} \log(1/NOEL) = & 0.47\log P + 0.47E_{HOMO} \quad (1) \\ & - 0.071VDW - 0.11\log(1/EC50) + 5.36 \end{aligned}$$

このモデルでは、PFOS の毒性のみが表現できなかった（図 2-6）。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、 $\text{Log}(1/EC50)$ が 0.41 と最も大きく、次に $\text{Log}P$ 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なであるとされる。

(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 2-7)。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 2-8)。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 13 物質と検証系 9 物質の $\text{Log}P$ 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 2-9)。

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。

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

式(1)および式(2)では、 $\text{Log}P$ 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、 $\text{Log}(1/EC50)$ 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 2-10)。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。

2.3. 考察

NOEL の予測については、化学物質の作用機序

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

2.4. 結論

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

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

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

3. 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

化学物質の肝毒性発現の指標として、肝臓での脂質代謝調節の主要な調節因子である PPAR α のリガンド活性を用いる可能性を検討する。そのため、PPAR α のリガンド活性を指標することが、どの範囲の化合物に適用できるか見極めるために、試験化合物の構造と毒性発現を評価する系を検討する基礎データとしてのリガンド活性測定を行なう。また、リガンド活性としては、アゴニスト活性に加えアンタゴニスト活性も測定し、アンタゴニスト活性が毒性発現につながる可能性を、PPAR α ノックアウトマウスをモデル系として検討する。

3.1. 方法

1. リガンド活性測定

試験化合物の PPAR のリガンド活性測定には、最終的な問題である生体への影響をできるだけ反映するように、単純な試験管内での検討に終始することのない、以下の2方法を選んだ。

1-1. マウス個体を用いた解析

マウスに試験化合物を投与し、PPAR の標的遺伝子の発現変動を、肝臓から抽出精製した全 RNA を用いて、ノーザンブロット法で解析した。

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)。

1-2. レポーター遺伝子を用いた PPAR transactivation 解析

ヒトの PPAR は、すでに3次元構造が明らかにされており、そのリガンド結合領域との結合性予

測 (広野グループ担当) と実際のリガンド活性を対応させるために、ヒト PPAR のキメラ受容体を用いたレポーターアッセイを行なった。レポータープラスミドとキメラ PPAR 発現プラスミドを CV1 細胞に共導入し、PPAR 各サブタイプの代表的リガンドをコントロールとし、試験化合物の濃度を変えて添加し、48 時間後のレポーター活性を Dual luciferase 法で測定した。

2. アンタゴニストと毒性発現の検討

アンタゴニスト活性と毒性発現の関係を検討するために、核内受容体の活性化が完全に阻害された状態を想定し、PPAR α ノックアウトマウスをモデル系に用いた。実験動物飼育施設で通常用いられる飼料では、PPAR α ノックアウトマウスには顕著な変化が観察されないが、これは自然界での食物状況や変化とはかけ離れた状態にあるからと推察した。そのため、人工的な飼育状態にない野生マウスが接する可能性のある食物環境をつくり、それに対する応答に果たす PPAR α の役割を検討した。エサには、無加工・無添加の玄米、小麦、そば、黒ゴマ、大豆、とうもろこし、亜モンド、干しぶどうを自由摂食で与えた。一週間後、血清を回収しその生化学パラメーターを測定するとともに、肝臓と小腸のタンパク質、RNA を回収した。タンパク質は一次元電気泳動により分析後、発現量に差の見られたタンパク質については、peptide mass fingerprint 法によって同定した。RNA は whole genome oligo-array で発現量に差の生じた mRNA を解析した。

3.2. 研究結果

1. 各種化学物質のリガンド活性のレポーターアッセイによる測定

5 種類のフッ素化合物、PFHA-C6, PFOA-C8, PFNA-C10, PFDA-C12, PFOS について測定した。まとめを図 3-1 に、測定例を図 3-2 に示す。図中の Wy は PPAR α のリガンドでポジティブコントロール、Troglitazone は PPAR γ のリガンド GW は δ のリガンドで、ともにネガティブコントロールを示し、この測定が PPAR α 特異的な測定系であることを示す。

さらに、肝毒性の知見が得られている、あるいは毒性が疑われる 9 化合物について検討した。

1. N-(1,3-Dimethyl butyl)-N-phenyl-p-phenylenediamine
2. 1H,1H,-perfluoro octanol
3. 1H,1H,2H,2H-perfluor octan-1-ol
4. 2-Ethyl hexyl Diphenyl Phosphate
5. P-(1,1,3,3-Tetramethyl butyl)-phenol
6. Nonylphenol
7. Dibutyl Adipate
8. 2,4-Di-t-butylphenol
9. Diheptyl Phthalate

図 3-3 と 3-4 に示すように、9 種類の化合物の PPAR α リガンド活性は、ポジティブコントロールの Wy 化合物と、溶媒のみのコントロール DMSO との比較から、次のように分類することができる。

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

なお、ここでの細胞毒性は、高濃度暴露によって細胞がディッシュから剥がれたことを指すが、その形態は化合物によって異なっていた。PPAR α 以外の作用点も関与しているものと思われる。

上記とフタル酸エステルを含むいくつかの化学物質の PPAR α リガンド活性と NOAEL (LOAEL) を表 3-1 に取りまとめた。PPAR α リガンド活性が高い化合物が強い肝毒性を示す傾向にあることが見て取れる。

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

ゴマ食によって肝臓で誘導されるタンパク質を解析した結果、野生型マウスでは Glutathione S-transferase が同定された。解毒反応が亢進していることが予想された (図 3-5)。そのため、ゴマ食によって解毒代謝経路が亢進していることが予想された。そこで、遺伝子応答の変化を広範に解析することとし、アレイ解析を行なった。

3. 発現変動のある mRNA のアレイ解析

ゴマ食によって発現変動する 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。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。

4. PPAR α アンタゴニスト活性と毒性発現

PPAR α ノックアウトマウスを用いた結果から、アゴニストに加え、アンタゴニストも毒性発現に関わる可能性が考えられた。また、培養細胞を用いたレポーターアッセイでは、PPAR α のアンタゴニスト活性を有する可能性を示す化合物 Butylbenzylphthalate (BBP) が見出された BBP はレポーターアッセイ系で PPAR α の特異的なアゴニスト Wy による活性化を濃度依存的に抑制し、対照のプロモーター活性は阻害しなかった。そのため、アンタゴニスト活性をもつと判断した。しかし、レポーターアッセイに変えて、内在性の遺伝子発現に対する影響を見たところ、そのアンタゴニスト活性は再現性良くは観察できなかった。

3.3. 考察

リガンド活性測定法には、組換え体受容体を用いた、完全な *in vitro* 系から動物個体を用いた *in vivo* 系まで何種類か存在する。ハイスループットなスクリーニングが優先されると *in vitro* 系が用いられるが、こうした単純化した系のみでは毒性発現との対応関係の情報を得ることは困難と思われる。化学物質の変化吸収を含めた薬物動態的な観点が重要であることに加え、受容体結合から転写活性化のステップについては十分には解明されていない。さらに、生理的な応答と毒性発現の仕分けについても、未知な部分多い。そのため、核内受容体に関与する毒性発現機構の解析には、動物個体や培養細胞を用いた解析結果との対応を見るのが重要である。本研究でも、各種化学物質のリガンド活性は、アッセイ系によって異なる場合があることを経験した。さらに、レポーター遺伝子を用いた測定ではアンタゴニストであった化合物が、内在性遺伝子発現に対しては、アゴニストであるという結果も得た。エストロゲン受容体の場合にも報告されているように、リガンドと受容体、その結果としての転写制御には、解明されていない部分が多く、リガンド活性と生物応答あるいは毒性発現を一義的に結びつけるのは困難な面がある。

PPAR α アンタゴニストが、間接的に毒性発現に関与する可能性が考えられる結果を得たが、こうした機構は他の受容体にも広く起こりうることと予想される。そもそも解毒系は、食物とくに植物性の成分の排泄や代謝として、進化してきたものであろう。この代謝ネットワークのかく乱は、生体にストレスを起こすと考えられる (図 3-6 参照)。化合物の毒性発現を、異物代謝とのみ捉えるのではなく、本来生体が自然界の中で進化させてきたシステムとして、統合的に捉える見方も重要であると考えられる。

3.4. 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著しい多様性があり、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かもしれない。そのためには、すでに毒性が明らかとなっている代表的な化学物質の毒性発現機構を、1 種類の核内受容体との関係からどこまで明らかにできるか、といった本研究のような検討を多方面から展開し、情報を統合する努力が必要であると思われる。

図 1-1 フッ素化合物の分類結果

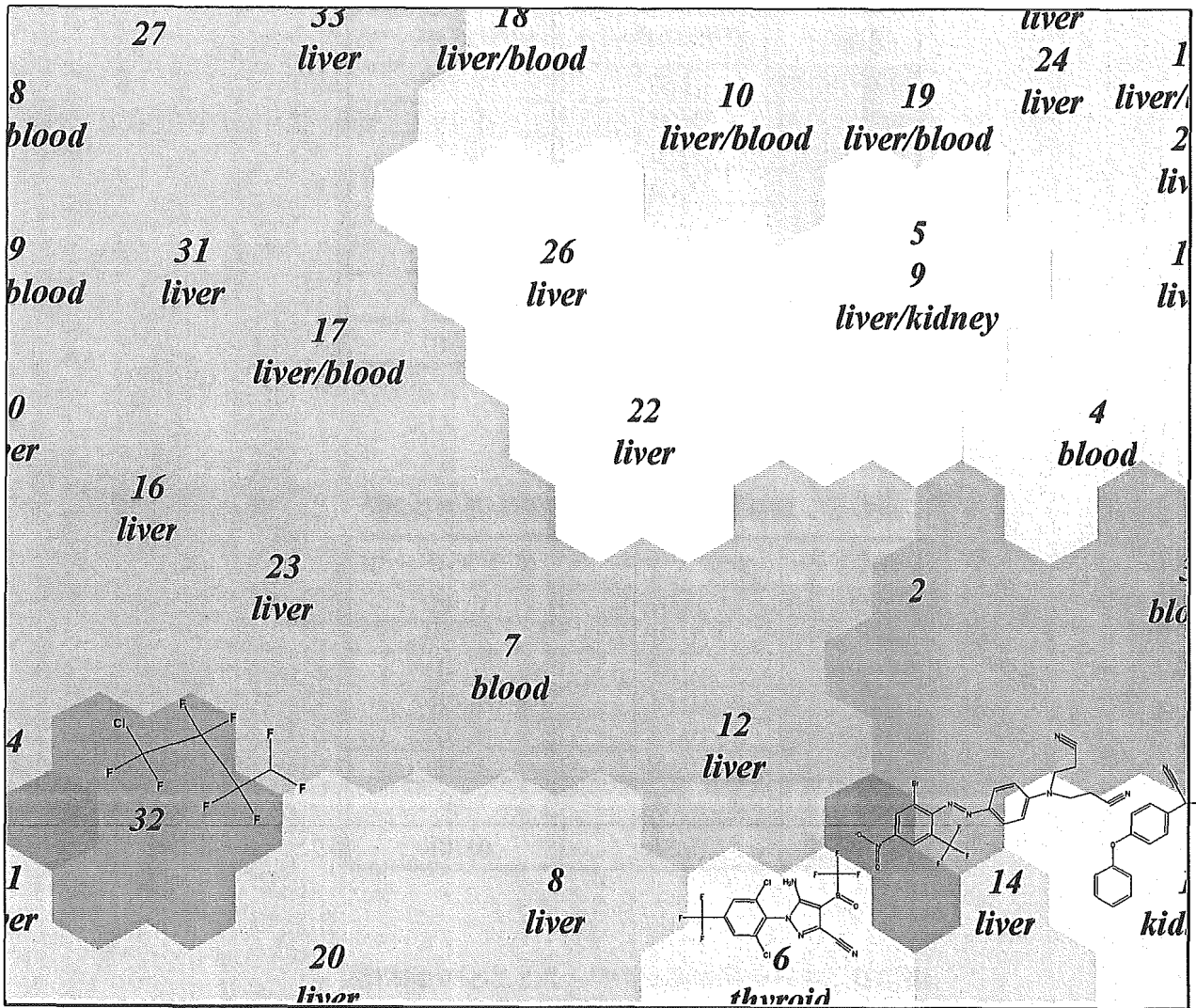


図1-2 重回帰の各係数の寄与度の比較

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

図1-2 重回帰の各係数の寄与度の比較

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

図 1-3 ニューラルネットワークによる予測結果

