

- 15) M. Balls *et al.*, *ALTEX*, 23 (Suppl), 270 (2006)
- 16) S. Coecke *et al.*, *Altern. Lab. Anim.*, 33, 261 (2005)
- 17) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/BG1Luc/AnnexG/1-CellViabMan.pdf>
- 18) <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/endocrine/BG1Luc/AnnexG/2-CytotoxReport.pdf>
- 19) M.M. Tabb, B. Blumberg, *Mol. Endocrinol.*, 20, 475 (2006)
- 20) N. Thorne *et al.*, *Chemistry and Biology*, 17, 646 (2010)
- 21) G.G. Kuiper *et al.*, *Endocrinology*, 139, 4252 (1998)
- 22) OECD, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 465, OECD Publishing, Paris (2009)

〈がん原性物質のスクリーニング〉

第19章 Bhas 42 細胞形質転換試験

(バリデーションおよび第三者評価終了)

酒井 綾子  
(Ayako Sakai)

1 はじめに

1.1 2段階発がん と 2段階細胞形質転換

Bhas 42 細胞形質転換試験 (Bhas CTA) は、化学物質の発がん性を予測するための方法で、2段階発がん説に基づいて開発された。今日では、発がん多段階説が広く行き渡っているが、2段階発がんは多段階発がんの単純化されたモデルとして受け入れられている。2段階発がんは、イニシエーションとプロモーションの過程から成り立っている。イニシエーション過程は、標的細胞のDNAが遺伝毒性のある発がん物質 (変異原性がん原性物質, 発がんイニシエーター) によって損傷を受け、損傷がゲノムに突然変異として固定される段階である。そういった突然変異の一部は、標的細胞を発がんに向かう準備が整った状態 (イニシエートされた細胞) にする。しかし、まだがん細胞にはなりきっていない。プロモーション過程は、イニシエートされた細胞が12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) のような遺伝毒性を示さない発がん物質 (非変異原性がん原性物質) によって、刺激されて増殖を始め、腫瘍形成に向かう段階である。イニシエートされた細胞を腫瘍形成に向けて促進する物質が発がんプロモーターである。発がんプロモーターは、単独で腫瘍を作ることはないが、発がんを促進する。2段階発がん説は、ベンゾ [a] ピレン等の変異原性がん原性物質の閾値以下による単独処理やクロトンオイル等の発がんプロモーターによる単独処理では腫瘍は形成されないけれども、閾値以下の変異原性がん原性物質による処理とそれに続く発がんプロモーターによる連続処理で腫瘍が形成されるというマウス皮膚における現象をよく説明する<sup>1)</sup>。2段階発がんは、マウス皮膚だけでなく他の実験動物や他の臓器でも報告されており<sup>2-9)</sup>、体細胞は、環境中や生体内に存在する少量のイニシエーターに常に暴露されているので、非変異原性がん原性物質の多くが発がんプロモーターであることが考えられる。培養細胞の形質転換は、発がんの良いモデル系である<sup>6-9)</sup>。発がん試験の長大な時間と費用を軽減するために、遺伝毒性試験を用いて発がん性の予測や作用メカニズムの研究が行われてきたが、非変異原性がん原性物質が相当数存在することが明らかになるにつれて<sup>9)</sup>、遺伝毒性試験よりも、もっと広範囲のがん原性物質を検出することができる細胞形質転換試験 (CTA) を発がん

文 献

- 1) OECD Series on Testing and Assessment No. 102 : Guidance Document for Using The OECD (Q)SAR Application Toolbox to Develop Chemical Categories According to The OECD Guidance on Grouping of Chemicals (2009)
- 2) R. Diderich, In Silico Toxicology, p.385, Royal Society of Chemistry (2010)
- 3) OECD Series on Testing and Assessment No. 80 : Guidance on Grouping of Chemicals (2007)
- 4) T. W. Schultz, In Silico Toxicology, p.346, Royal Society of Chemistry (2010)
- 5) OECD Series on Testing and Assessment No. 138 : Report of the Workshop on Using Mechanistic Information in Forming Chemical Categories (2011)
- 6) OECD Series on Testing and Assessment No. 184 : Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways (2013)
- 7) OECD Series on Testing and Assessment No. 168 : The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins (2012)
- 8) M. Hayashi *et al.*, New Horizons in Predictive Toxicology, p.26, Royal Society of Chemistry (2012)
- 9) Y. Sakuratani *et al.*, SAR QSAR Environ. Res., 24, 351 (2013)
- 10) 阿部武丸ほか, ファームステージ, 12 (5), 39 (2012)

### 第3章 化学物質の内分泌かく乱性の予測評価

小野 敦\*

#### 1. はじめに：化学物質の内分泌かく乱性の *in silico* 評価を 取り巻く状況

1990年代に入り、環境中に放出された様々な化学物質が野生生物やヒトの内分泌系をかく乱することによる有害影響（毒性）を示唆する報告が相次いだことなどから1996年に内分泌かく乱化学物質に関する初めての国際会議（Weybridge会議）が開催され、内分泌かく乱物質に対する国際的な研究戦略が提案された<sup>1)</sup>。その後、世界保健機構・国際化学物質安全計画（WHO・IPCS）により、内分泌かく乱化学物質は「内分泌系の機能を変化させることにより、健全な生物個体やその子孫、あるいは集団（またはその一部）の健康に有害な影響を及ぼす外因性化学物質または混合物」と定義されている<sup>2)</sup>。

EUの化学物質規制であるREACHでは、内分泌かく乱性を発がん性、変異原性及び生殖発生毒性とならぶ高懸念物質（SVHC）の判断基準としており、2011年には内分泌かく乱性のために懸念のある初めての化学物質としてオクテルフエノールをSVHC候補リストに掲載した<sup>3)</sup>。また、米国EPAでは「内分泌かく乱化学物質スクリーニング及び試験法諮問委員会」（EDSTAC）の勧告<sup>4)</sup>に基づき、2段階（Tier 1, 2）からなる内分泌かく乱スクリーニングプログラム（EDSP）により、2009年に農業を中心とした第1次リスト取載の67化学物質を対象にTier 1試験命令の発出を行い<sup>5)</sup>、2013年には、109化合物からなる第2次リストを公開した<sup>6)</sup>。

内分泌系は、生殖機能を始め免疫機能や脳機能等様々な生理的活動の調節に関わっていることから、内分泌かく乱により想定される有害影響<sup>7)</sup>は多岐にわたる上、それらの有害影響は従来の試験法では検出が困難である。そのため、既に市場に出回っている数万種の化学物質すべてについて改めて評価が必要であるとされており、コンピュータによる予測法、いわゆる *in silico* 手法の活用が期待されている。EU REACHでは、評価にあたっては *in vitro* 試験法とあわせて *in silico* 手法の利用を促進しており、米国EPAではEDSPにおけるTier 1スクリーニングの対象物質の優先順位付けに *in silico* 手法を用いている。我が国においては、詳細試験法が確立されていない事などから、現在のところ内分泌かく乱性の観点からの化学物質規制は行われていないが、厚生労働省「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」中間報告書追補その2において示された試験スキームにおける詳細試験実施の優先順位付けのためのスクリーニング試験法の一つとして *in silico* 試験法が挙げられている<sup>8)</sup>。OECD（経済協力開発機構）では、1998年に

\* Atsushi Ono 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

重点活動項目の1つとして、内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質のスクリーニングおよび詳細試験のテストガイドラインの整備を開始した。スクリーニングから確定試験までに有用と考えられる試験法を5レベルからなる“内分泌かく乱作用を有する可能性のある化学物質の試験および評価に関するOECD概念枠組み”として整理し(2011年に3レベルに再整理された)、各レベルにおける試験法のガイドラインの整備を進めている<sup>9)</sup>。In silico手法は、そのうち既存情報の収集等とともに、レベル2以降の試験実施の必要性を検討するための手段としてレベル1に位置づけられている。

## 2 化学物質による内分泌かく乱性の in silico 評価

内分泌かく乱化学物質の暴露によりヒトで起こり得ると想定されている有害影響は、生殖発達毒性を始め、神経発達、発がん、免疫系疾患、骨障害、代謝障害など多様である<sup>9)</sup>。しかも、それぞれの障害は、内分泌かく乱以外のメカニズムでも起こり得るため、内分泌かく乱性とヒトにおける障害の因果関係が完全に証明された化学物質は限られており、内分泌かく乱による有害影響そのものを in silico 予測することは、ほぼ不可能である。内分泌かく乱影響に限らずヒトにおける障害や毒性試験で検出されるフェノタイプは、いずれも様々なメカニズムによる生体反応の結果として示される現象であり、in vivo フェノタイプそのものの in silico 予測の信頼性は、作用既知の構造類似物質からのリードアクロスによる方法以外ではあまり高くはない。

一方、化学物質による内分泌かく乱のメカニズムのうち最も重要と考えられている作用はホルモン受容体を介した作用である。エストロゲンを始めとした性ホルモンは、受容体を介して様々な生体反応を調節している。ホルモン受容体は核内受容体であり、リガンド結合によりターゲット遺伝子の転写活性を調節することで細胞の成長・分化・代謝などを調節している<sup>10)</sup>。核内受容体は、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、およびコルチコステロイドなど各種ステロイドホルモン受容体を始め、レチノイン酸、甲状腺ホルモン、ビタミンDおよびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体など100種以上からなるスーパーファミリーを構成している<sup>11)</sup>。

ホルモン受容体に結合する性質を有する化学物質は、生体内でホルモン様作用もしくはホルモン作用を阻害して正常なホルモンシグナルをかく乱することで有害作用を発現すると考えられている。さらに、核内受容体を介した作用は、多段階の遺伝子発現の変動を惹起することにより理論的には、たとえ数分子の化学物質であってもその作用を発現することが可能であることから、従来の試験法では有害性が検出されない低用量の化学物質暴露によっても有害影響を発現する可能性が指摘されている。これまでの研究から、特にエストロゲン受容体には非常に多くの化学物質が結合することが示されているが、それら化学物質の構造は多岐にわたる。

核内受容体は、内分泌かく乱性だけでなく創薬ターゲットとしても重要であり、結合活性を有する化合物のスクリーニング手段として様々な in silico 手法の研究が行われている。それらの in silico 手法は、化学物質の受容体への結合活性を評価するものであり、生体内における有害作

用の有無を判定することは出来ないため、厳密には内分泌かく乱性の評価モデルとは言えない。しかし、受容体を介した内分泌かく乱ポテンシャルの有無を評価することにより、詳細試験のための優先順位付けを行う目的やエビデンスの重み付けアプローチを補強する目的においては、内分泌かく乱性の評価法として有用である。

## 3 エストロゲン受容体結合の in silico 評価法

生物活性の in silico 予測は、化学物質の生物学的活性を含む性質がその物質固有の性質によって説明可能であり、従って化学構造からの予測や既知の類似化合物の活性からの推定が可能であるとの前提に立っている<sup>12)</sup>。化学構造からの生物活性の予測手法には、分子記述子を用いた定量的構造活性相関(QSAR)及び構造活性相関(SAR)モデルを始め、特定の部分構造から活性の有無を判定するアラートシステムや複数の判断基準を組み合わせたエキスパートシステム、類似化学構造のグルーピングによるリードアクロス等の方法があるが、いずれも既知情報を基にした経験的な判断に基づくものである。そのため、予測の信頼性や適用性は予測モデルやアラート構築に用いられた化学構造の数と生物活性の情報の質に依存する。さらには、十分な情報の無いエンドポイントにはモデル構築そのものが出来ない。

内分泌かく乱性に関しては、全てのホルモン受容体(核内受容体)がターゲットとなり得る。しかしながら、エストロゲン受容体(ER)については非常に多くの in silico 予測の報告があるのに対し、その他の受容体についての報告はあまり多くない。これは、ERが内分泌かく乱のターゲットとして特に重要と考えられているためでもあるが、その他のホルモン受容体については、in silico 解析に利用可能な情報、すなわち受容体への結合が報告されている化学物質がERに比べ少ないためでもある。これまでにER結合の in silico 予測には様々な手法を用いた報告があるが、以下では、リガンドの受容体への結合が鍵と鍵穴のような関係にあるという特徴を利用した2種の手法を紹介する。その他の報告や予測に利用可能な市販ソフトウェアについては、欧州委員会共同研究センター(JRC: Joint Research Center)より詳細なレビューが公表されているのでそちらを参照するとよい<sup>13-15)</sup>。

### 3.1 Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)

CoMFAは、分子の立体構造を直接反映したQSAR解析を行うために開発されたQSAR計算手法である<sup>16)</sup>。CoMFAでは活性分子の3次元構造を重ね合わせた後、各分子の立体及び静電ポテンシャルからCoMFAフィールドと呼ばれる3次元構造記述子を求め、さらにCoMFAフィールドと各分子の活性値との関係をPLS(Partial Least Square)法<sup>16)</sup>により統計解析して、活性予測式を構築して活性予測を行う。CoMFA解析では、単に活性予測を行うだけでなく、リガンド側からの結合部位の構造予測や活性の高い化学物質に要求される置換基の立体的、静電的性質などを解析することが可能である。CoMFAを用いたER結合化学物質の解析の結果、エスト

ラジオールの3位と17位-OH基の陰性電荷がERへの強い結合に重要であることが示されている<sup>17)</sup>。注意すべき点として、CoMFA解析における分子の重ね合わせには幾つかの手法があるが、手法の選択は主観的であり、CoMFAによるQSAR予測は、重ね合わせに用いた分子構造及び分子の重ね合わせ手法の影響を受けやすいことが挙げられる。

### 3.2 3次元ドッキングモデル

ERのリガンド結合部位については、3次元結晶構造<sup>18)</sup>が報告されていることから、リガンド結合ポケット構造を基にした3次元ドッキングモデル<sup>19, 20)</sup>が報告されている。3次元ドッキングモデルは受容体構造を基に構築されるため、前述のCoMFAや古典的QSAR手法と比較してモデル構築に用いた化学物質構造の制約を受けにくく、多岐にわたる構造に適用可能である。以下では、3次元ドッキングモデルの予測精度を示す例として、著者らが分子設計研究所と共同で板井らの開発した手法を用いて構築したER 3次元ドッキングモデル<sup>20)</sup>の予測精度について検討した結果を示す。

図1は、*in vitro*試験データ(ER結合試験及びERレポーター試験)の入手が可能な化学物質について、3次元ドッキングモデルで予測された活性値と実際の試験結果の陽性・陰性判定の比較を行ったROC解析(Receiver Operating Characteristic Analysis)の結果である。ER結合試験及びERレポーター試験の結果については、化学物質総合情報提供システム(CHRIP: Chemical Risk Information Platform)<sup>21)</sup>公開データ及び独自に測定したデータを解析に用いた。また、3次元ドッキングモデル自体はER結合活性を評価するものであるが、ER結合試験(ERレポーター試験についても同様)にはある程度の実験エラーが想定されることから、ERレポ-

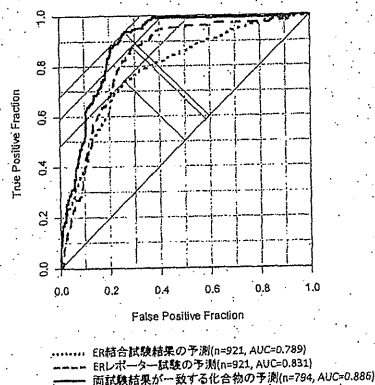


図1 3次元ドッキングモデルによるER結合活性予測精度の検証

ター試験についても併せて評価を行い、さらに両試験の結果が一致する化合物を真の陽性・陰性物質と仮定して判定した結果についても示した。ER結合試験もしくはERレポーター試験のみを判定対象とした場合には、真陽性率(縦軸)は100%とはならないが、両試験の結果が一致する化合物のみを判定対象とした場合、AUC=0.886となり、偽陽性率=0.4程度を許容すれば、ほぼ100%の陽性化合物の抽出が可能であることを示している。スクリーニング目的においては偽陰性を極力排除出来ることが望ましく、結果は3次元ドッキングモデルの有用性を示している。

### 4 OECD QSAR ToolboxによるER結合プロファイリング

文献等で報告されている*in silico*手法の多くは、市販ソフトウェアを用いる場合が多い。それらの手法を利用するには市販ソフトウェアの購入が必要な上に、モデル構築に必要な全ての条件が示されていない場合も多く、予測モデルそのものがソフトウェアとともに市販されている場合を除き、同じモデルを再現するのは難しい。

OECDでは、加盟各国の規制機関や関係者が共通に利用可能な*in silico*安全性評価プラットフォームとしてOECD QSAR Toolbox (OECD TB)<sup>22)</sup>の開発を進めている。OECD TBには、各国から提供された化学物質の化学構造情報や毒性情報とともに、加盟各国からの専門家で作成されるOECD TBマネージメントグループにより化学物質の安全性評価に有用であると判断された各種ツールが搭載されており、無償で提供されている。現在、配布されているバージョン(OECD TB ver3.1)では、内分泌かく乱関連のツールとしてER結合プロファイラーが利用可能である。このER結合プロファイラーは、米国EPAにおいて前述のEDSPにおけるTier 1対象物質の優先順位付けのために開発されたER結合評価のためのエキスパートシステムを基にしており、OECDで実施された第3者レビュー会議<sup>23)</sup>及び米国EPAの科学専門委員会(SAP: Scientific Advisory Panel)<sup>24)</sup>においてその有用性が評価されている。OECD TBの詳細については、前章に譲るが、以下ではOECD TBのER結合プロファイラーを用いた解析例を紹介する。

米国FDA・NCTRで測定された232化合物に関するラット子宮サイトゾールを用いたER結合試験の結果について、米国EPAのDistributed Structure-Searchable Toxicity (DSSTox) Database<sup>25)</sup>より化学構造ファイル(SDファイル)を入手してER結合プロファイラーにより評価した結果を表1に示す。オリジナルのER結合エキスパートシステムは化学構造に関する多段階の質問項目からなる決定木型の評価モデルである。OECD TBでは、そのうちER結合性が予測される構造的特徴が個別のアラートとして示されるが、結果ではいずれかのアラートが示された化学物質を全てアラート有りとしている。一方、いずれのアラート構造も有しない化学物質については、OECD TBでは「No alert found」と示されるが、これはアラートを有しないということであり、ER結合活性が陰性と判定されたわけではない。また、オリジナルのエキスパートモデルでは、OECD TBで「No alert found」となる物質の一部は「No binder」と判定されるが、大半は、「Needs testing」と判定されることに注意が必要である。

表1 OECD QSAR ToolboxによるER結合プロファイリング結果とER結合試験結果の比較

		ER結合試験結果		
		active	inactive	inconclusive
ER expert system (OECD QSAR Toolbox)	アラート有り	39	17	5
	アラート無し	92	76	3

結果として、いずれかのアラートが有ると判定された化合物の約6割については、実験的にもER結合活性が認められているのに対し、“アラート無し”と判定された化学物質でも半数以上でER結合活性が認められている。現在の米国EPAのER結合エキスパートモデルは、抗菌剤211物質及び農薬成分393物質のニジマスER結合試験結果をもとに構築されているが、適用可能な化学構造の範囲が限られている。エキスパートシステムは、新たな決定木を追加することで比較的簡単に予測ルールの拡張が可能であり、今後、新たな知見を加えたモデルの拡張が期待される。

### 5 おわりに

内分泌かく乱性に限らず化学物質規制における*in silico*評価手法の利用については各国で検討が進められているものの、現時点では、その利用は詳細評価を行う化学物質の優先順位付け等に限定されている。*In silico*手法のリスク評価そのものにおける実用化のためには、予測モデルの信頼性の向上はもとより、評価対象物質に対して得られた予測結果の信頼性の判断基準の設定やモデルの信頼性（偽陽性率、偽陰性率）に応じた予測結果の取り扱い、さらには*in vitro*評価法との組み合わせなど、安全性評価における新たな評価スキームの構築が望まれる。

### 文 献

- 1) EC : European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife (1996)
- 2) WHO/IPCS : Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors (2002)
- 3) ECHA : SVHC support document- 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol, 4-tert-octylphenol (2011)
- 4) EDSTAC : Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee, Final Report, Volume I-II (1998)
- 5) *Federal Register*, 74(71), 17477 (2009)
- 6) *Federal Register*, 78(115), 35922 (2013)

- 7) WHO : State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals (2012)
- 8) 厚生労働省 : 「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」中間報告書追補その2, <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/03/s0331-9.html>
- 9) OECD GD No.150 : Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (2012)
- 10) A. M. Brzozowski *et al.*, *Nature*, 389, 753 (1997)
- 11) M. Robinson-Rechavi *et al.*, *J. Cell Sci.*, 116, 585 (2003)
- 12) M. Johnson and G.M. Maggiora, *Concepts and Applications of Molecular Similarity*, Wiley, New York (1990)
- 13) Benfenati *et al.*, Validation of Selected, Non-Commercial (Q) SAR Models for Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding (2005)  
[http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/predictive\\_toxicology/information-sources/qsar-document-area/Final\\_report\\_Mario\\_Negri.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/predictive_toxicology/information-sources/qsar-document-area/Final_report_Mario_Negri.pdf)
- 14) E. Lo Piparo and A. Worth, : Review of QSAR Models and Software Tools for predicting Developmental and Reproductive Toxicity (2010)  
[http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/14815/1/eur\\_24522\\_en.pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/14815/1/eur_24522_en.pdf)
- 15) M. Fuat Gatnik and A. Worth, Review of Software Tools for Toxicity Prediction (2010)  
[http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/14817/1/reqno\\_jrc59685\\_software\\_tools\\_for\\_toxicity\\_prediction%5b1%5d.pdf](http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/111111111/14817/1/reqno_jrc59685_software_tools_for_toxicity_prediction%5b1%5d.pdf)
- 16) R. D. Cramer *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 5959 (1988)
- 17) L. M. Shi *et al.*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 41, 186 (2001)
- 18) A. M. Brzozowski *et al.*, *Nature*, 389, 753 (1997)
- 19) R. D. Head *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 3959 (1996)
- 20) M. Y. Mizutani *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 60, 183 (2012)
- 21) 化学物質総合情報提供システム (CHRIP) : <http://www.safe.nite.go.jp/japan/db.html>
- 22) OECD QSAR Toolbox : <http://www.oecd.org/env/ehs/risk-assessment/theoecdqsartoolbox.htm>
- 23) OECD Series on Testing and Assessment No. 111 : Report of the Expert Consultation to Evaluate an Estrogen Receptor Binding Affinity Model for Hazard Identification (2009)
- 24) U. S. EPA, SAP : Integrated Approaches to Testing and Assessment Strategies: Use of New Computational and Molecular Tools (2011)  
<http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2011/may/052411minutes.pdf>
- 25) EPA DSSTox : <http://www.epa.gov/ncct/dsstox/>

