

HP掲載版

ICH M7に対応するin silico予測・評価の実際

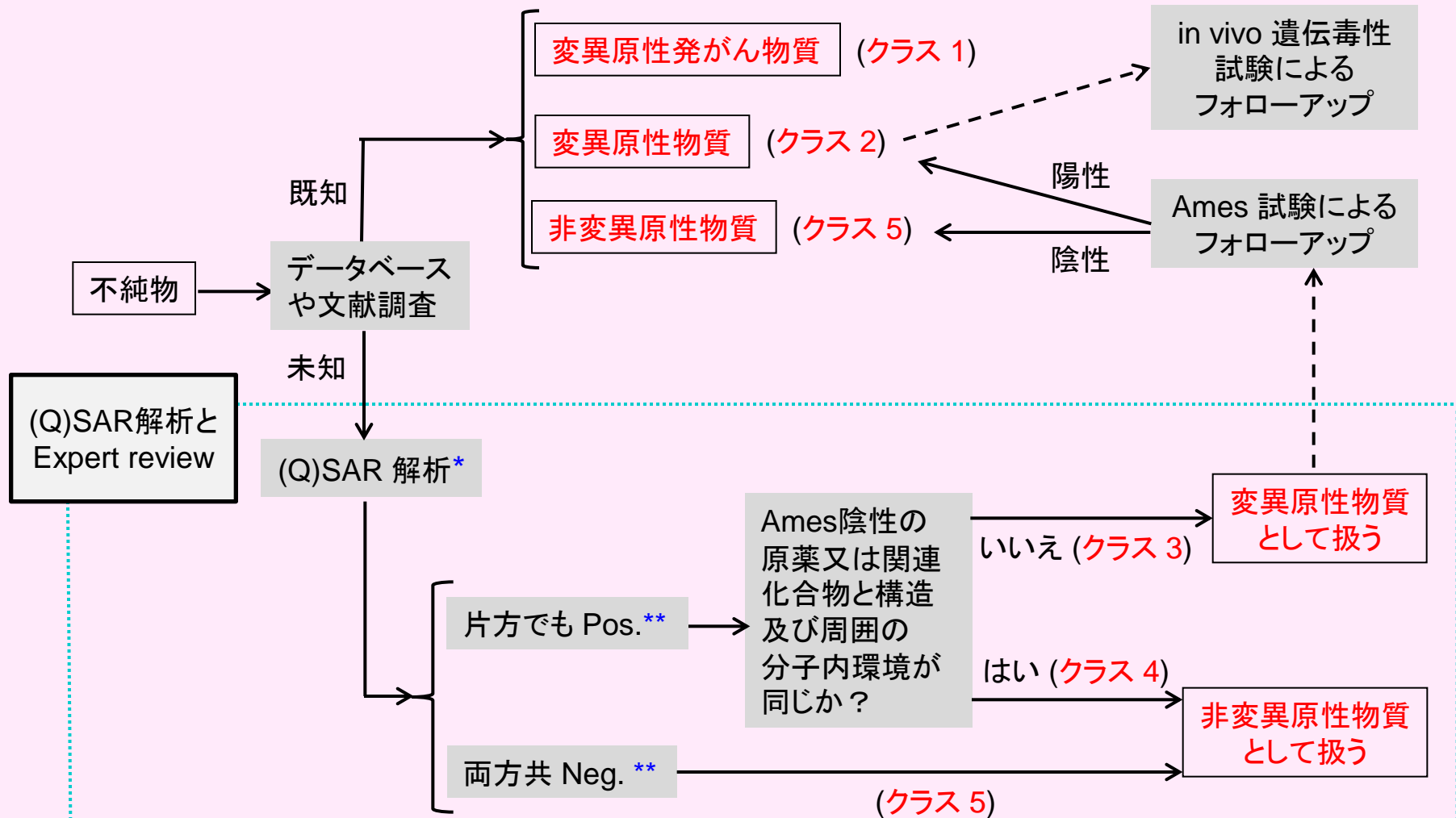
– 不純物クラス分けの高質なExpert Reviewを目指して –

エーザイ(株) 筑波安全性研究部

Hakura Atsushi

羽倉 昌志

ICH M7 不純物クラス分けのフローチャート

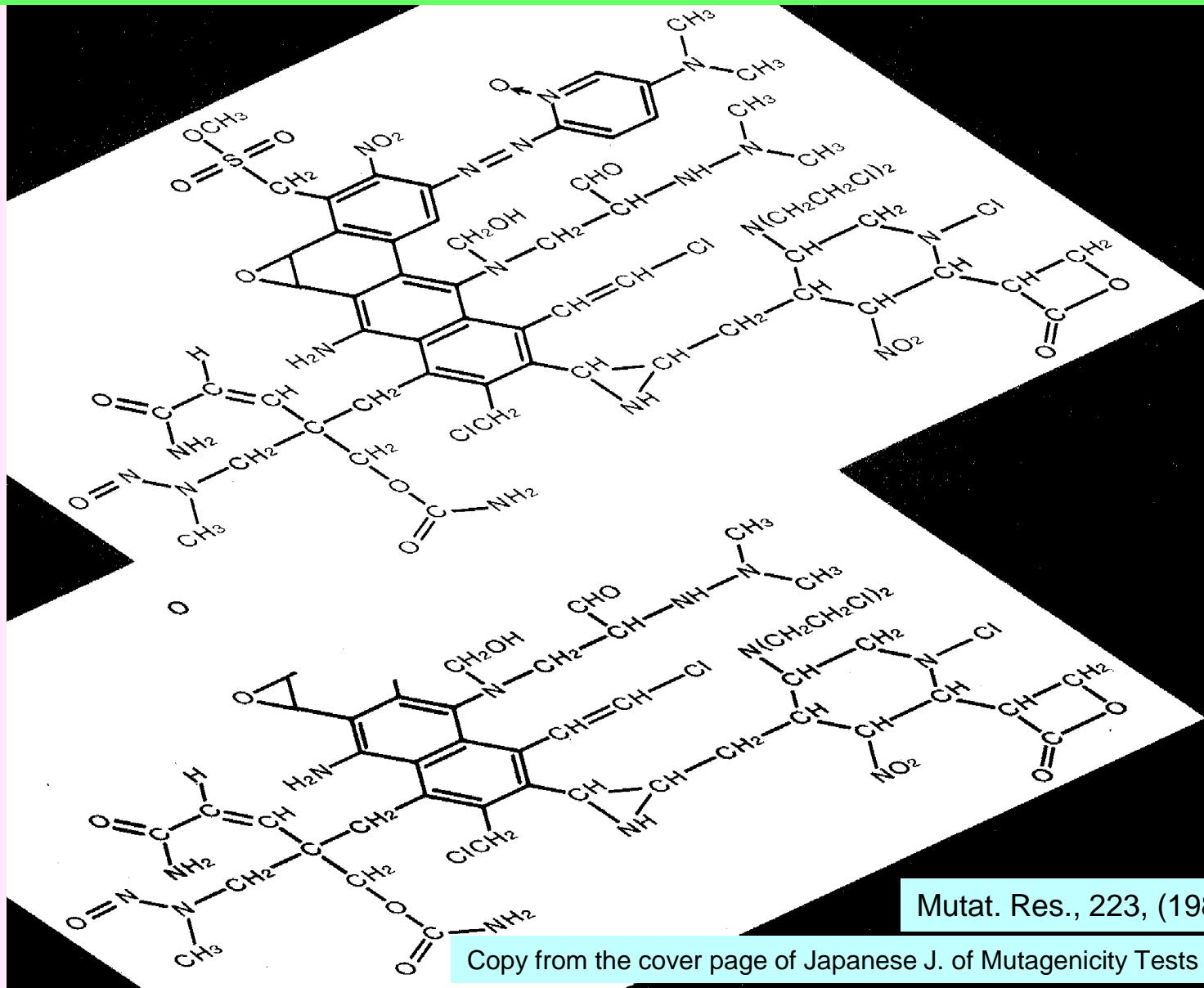


*: 知識ベース型と統計ベース型解析ソフトの使用。必要に応じて類似構造検索を利用した解析も有用

** : アラーム構造の有無又はAmes試験予測結果

仮想最強変異原性物質

変異原性を引き起こす多くのアラート構造をもっている!!



Mutat. Res., 223, (1989) 73-103.

Copy from the cover page of Japanese J. of Mutagenicity Tests on Chemicals

変異原性物質

変異原性物質.....DNA反応性物質 or 遺伝子傷害性物質

直接変異原性物質 (Direct mutagenic compounds) :

- それ自身が化学的に高い反応性のためDNAと反応し、変異原性を引き起こす物質
- 医薬品の合成中間体や原料等に多い

間接変異原性物質 (Indirect mutagenic compounds) :

- 薬物代謝酵素によって化学的に高い反応性の代謝物 (反応性代謝物) が生成し、DNAと反応して変異原性を引き起こす物質
- (医薬品や)環境化学物質に多い

変異原性の強さを決める主要因

発がん物質 / 変異原物質の求電子説

DNAは電子に富んだ物質(リン酸, 核酸塩基=負に帯電)
= 求核性物質

⇒ 求電子性物質と反応しやすい

⇒ 生体条件(pH 7.4, 37°C)での求電子性物質は遺伝子
傷害性物質(変異原性物質や発がん性物質)になる
可能性を有する

変異原性に関連する化学反応性のパラメーター

SN1性
(1分子反応性)

求核性物質 ($-\overset{\cdot\cdot}{\text{N}}\text{H}_2 < -\overset{\cdot\cdot}{\text{O}}\text{H} < -\overset{\cdot\cdot}{\text{S}}\text{H}$) への

SN2性
(2分子反応性)

低

反応選択性

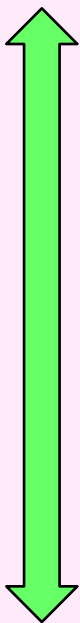
高

たんぱく質への
反応性低い

たんぱく質への
反応性高い

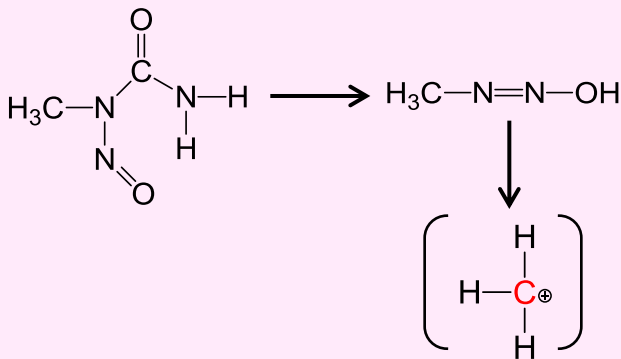
高

反応性(反応速度)



低

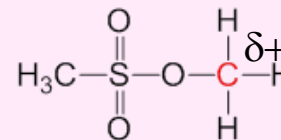
N-Methyl-N-nitrosourea



Formaldehyde

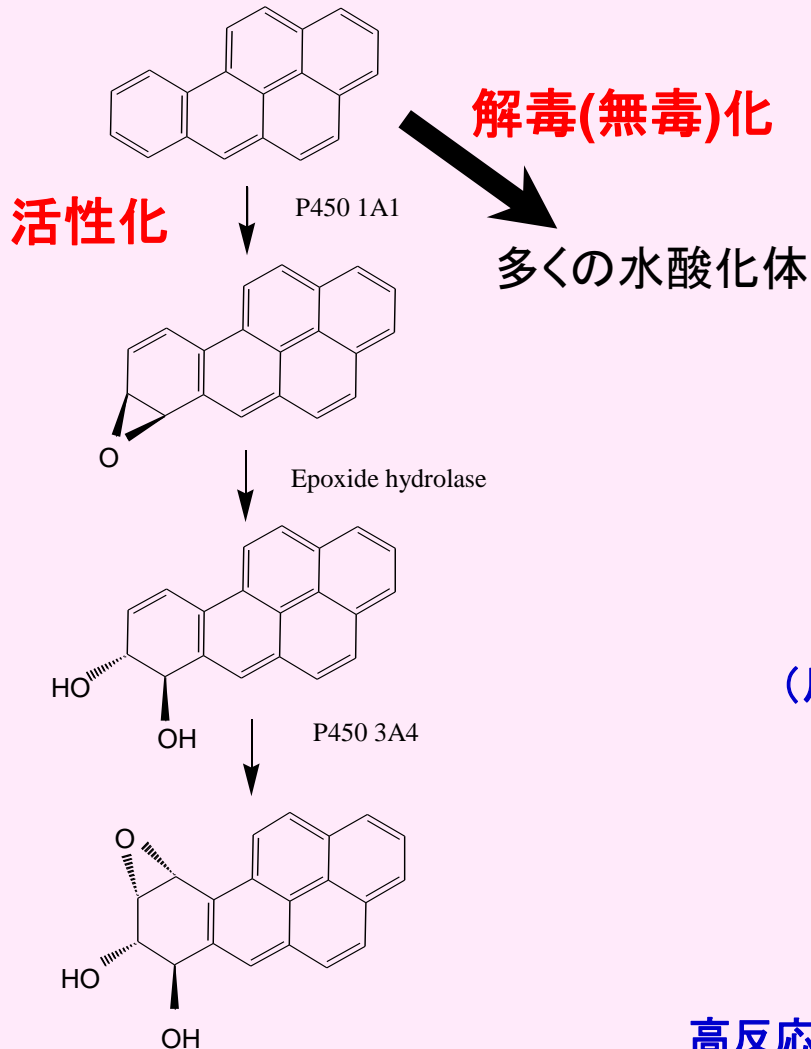


Methyl methanesulfonate

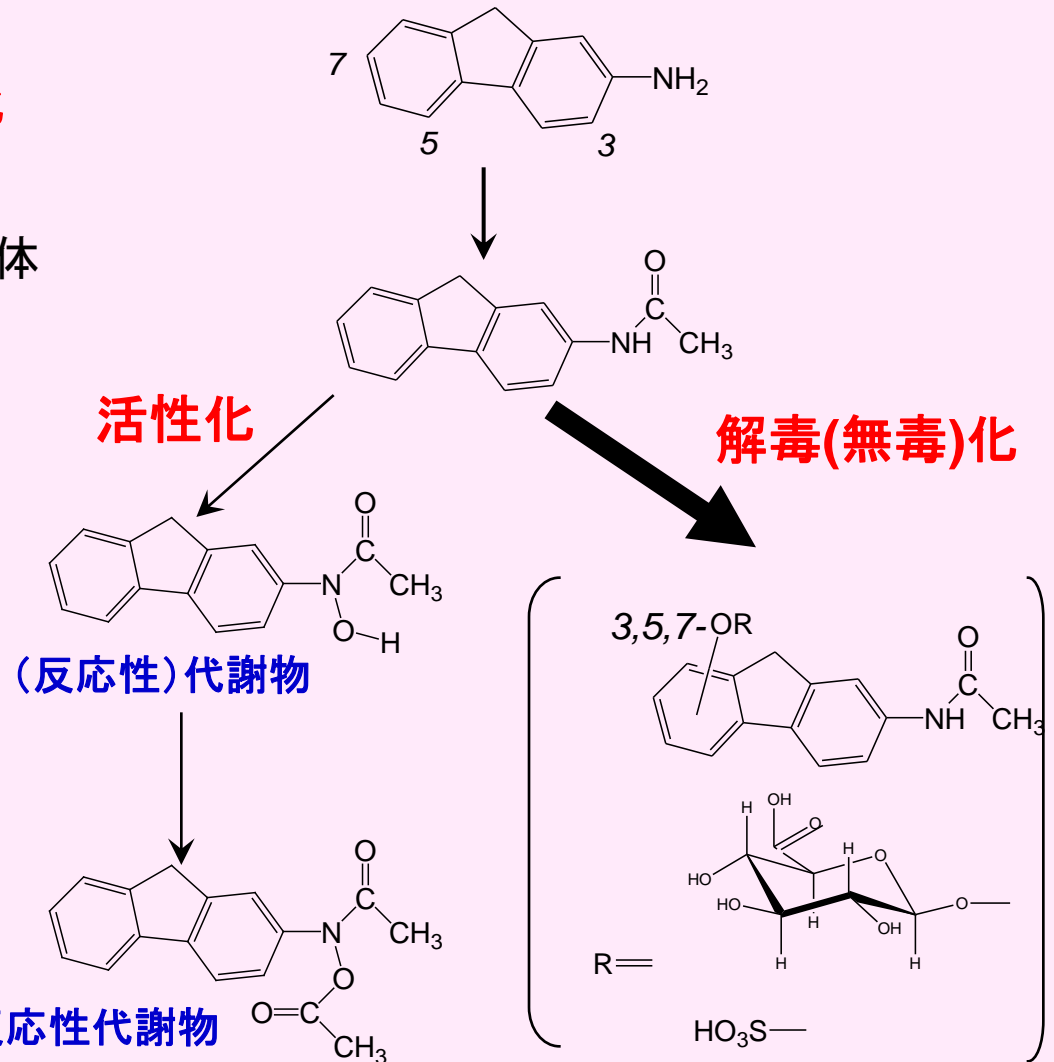


間接変異原性物質の薬物代謝と変異誘発・解毒化

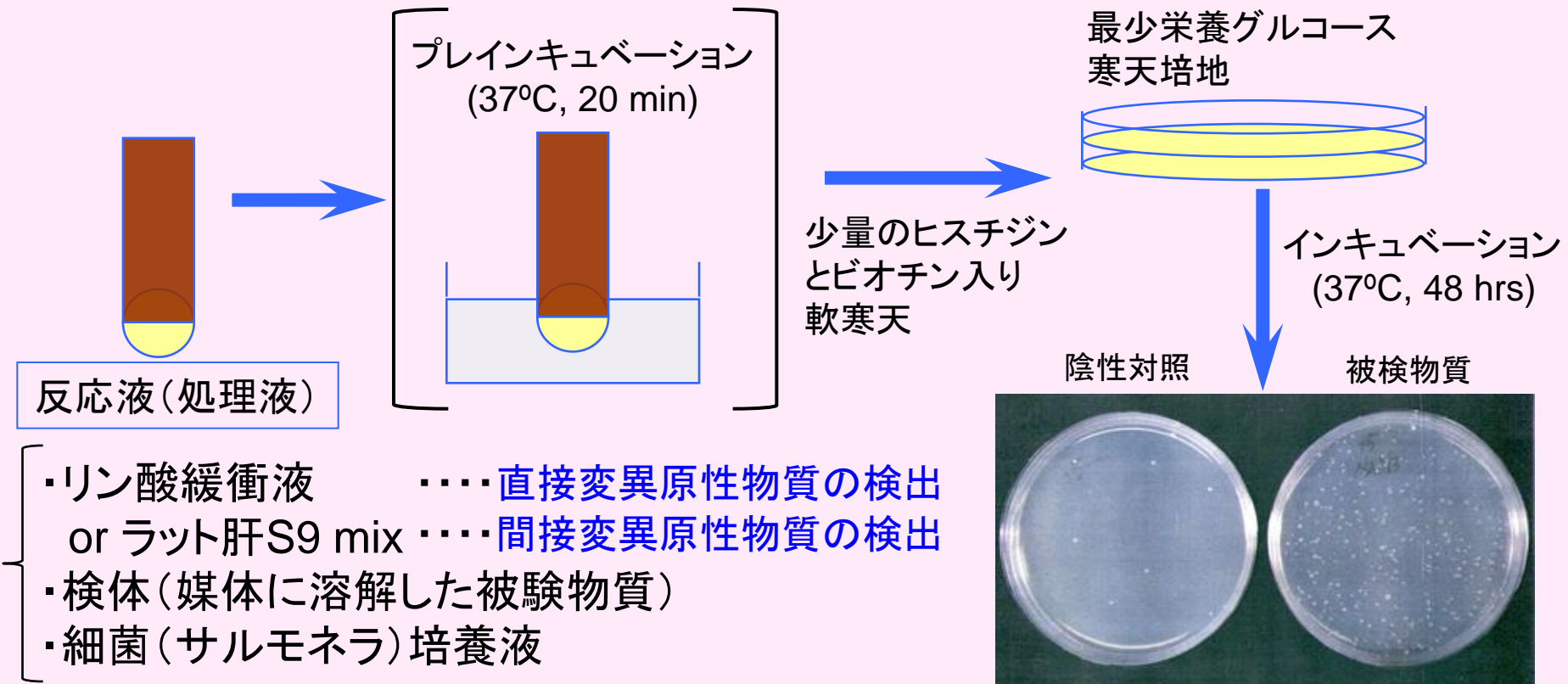
Benzo[a]pyrene



2-Acetylaminofluorene



Ames試験



復帰変異コロニー数測定

(10 - 100 his⁺ cells / 2 x 10⁸ his⁻ cells)

ヒスチジン要求性: his⁻
(ヒスチジン合成酵素遺伝子の変異によりヒスチジンを合成できない)

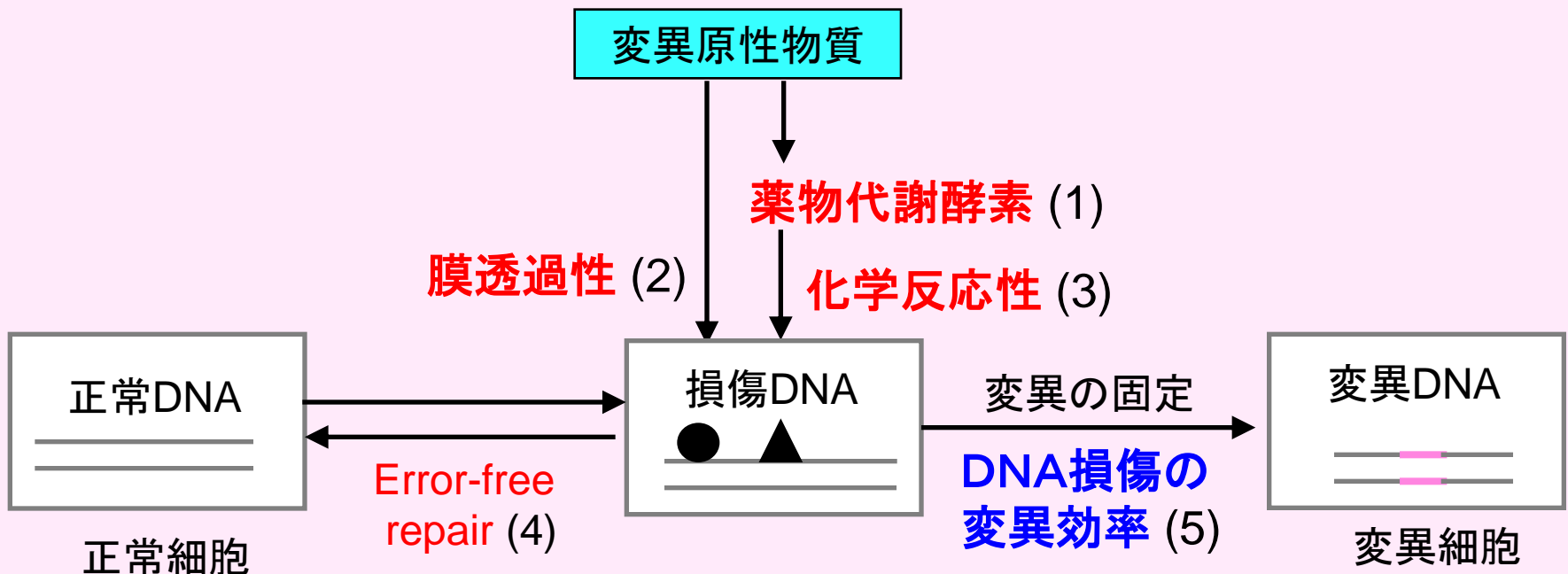
(復帰)変異

ヒスチジン非要求性: his⁺
(ヒスチジン合成遺伝子の変異が正常に戻るによりヒスチジンを合成できる)

変異原性の強さを決める主要因

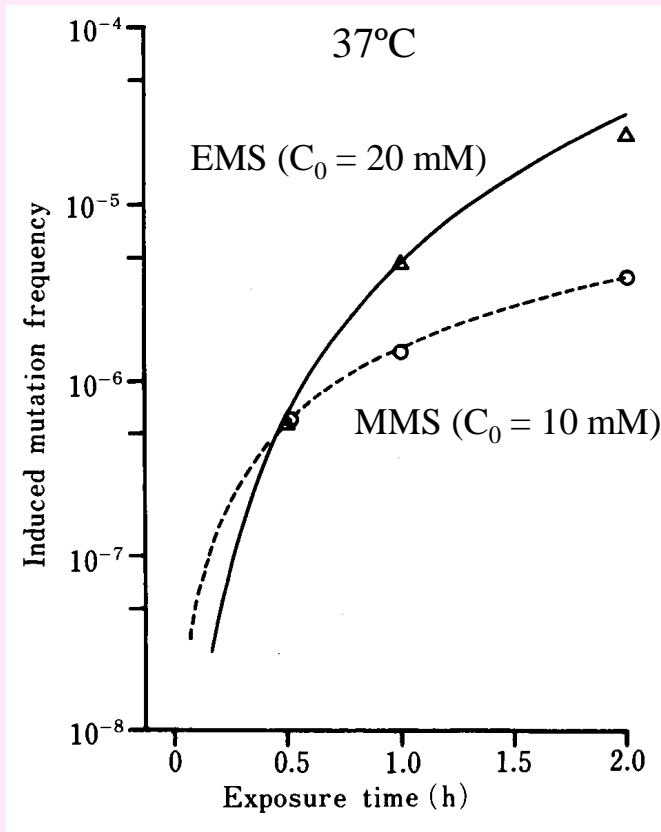
変異原性の強さは、一定処理時間に生じたDNA損傷の質(種類)や量によって決まる

- (1) 化合物の代謝的活性化の有無及びその場所
- (2) 化合物の細胞内への膜透過性
- (3) 化合物の化学的反応性(特に求電子性と反応速度)
⇒ DNA損傷(付加体, 切断, インターカレーション等)の量及び質
- (4) DNA損傷のerror-free repairの効率
- (5) 修復されずに残ったDNA損傷の変異効率

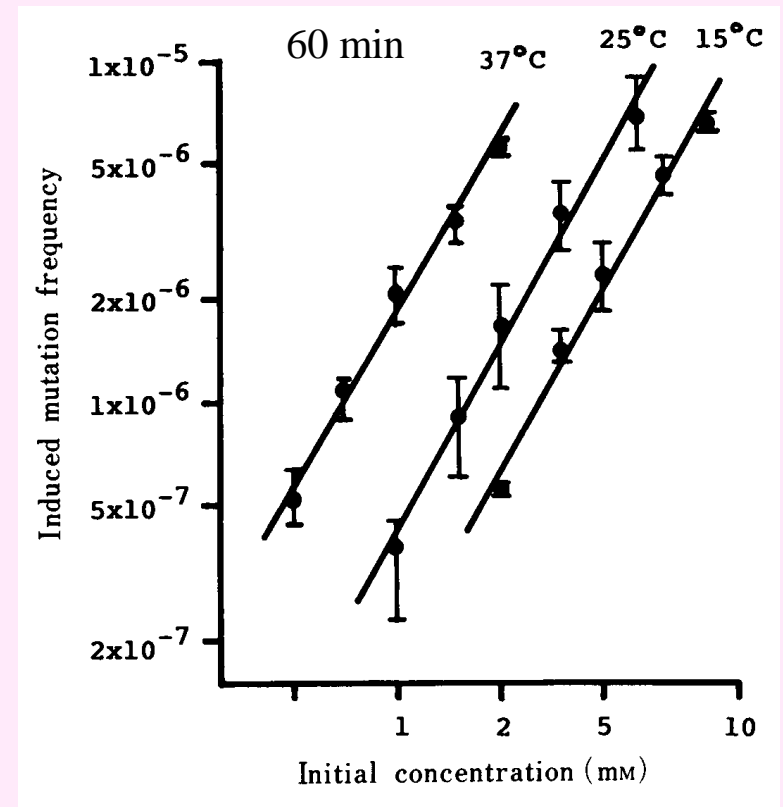


変異原性は化学物質のDNAへの反応性に基づく

MMSやEMSと試験菌株を処理する時の時間を変えた場合の変異誘発頻度



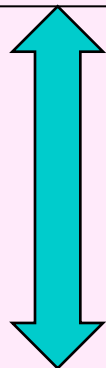
MNUと試験菌株を処理する時の温度を変えた場合の変異誘発頻度



E. coli Hs30R (*uvrA*⁻) 株のTrp⁻からTrp⁺への変異誘発頻度

ICH M7 Expert Reviewの実施方法

(1) in silico解析(知識ベース型と統計ベース型)



不純物クラス分けは, in silico結果の単純な解析だけでなく, 変異原性発現機序の(化学的)考察も加えた総合判断が大切

(2) in silico解析(類似構造化合物の変異原性情報の調査と考察)

(3) 物理化学的性質;分子の大きさと疎水性

(4) 薬物代謝酵素による反応性代謝物の生成

(5) 不純物そのもの、あるいは反応性代謝物の求電子性
(反応速度や求核性物質への反応選択性)

(6) インターカレーション能

知識ベース型 vs 統計ベース型ソフト(モデル)

	知識ベース型ソフト(例, DEREK)	統計ベース型ソフト(例, CASE-Ultra)
原理	既知データからAmes陽性の要因となる特徴的な部分構造を抽出し, それらをアラート構造としてルールベース化し, その有無で予測。	化学構造を小さなフラグメントに分割してパラメータ化し, Ames陽性と相関性が高いと判断されるパラメータを用いた多変量変換やパターン認識をもとに予測。
長所	・アラートの意味が明確。	・陰性として見逃す可能性は知識ベース型ソフトより低いように見える。
短所	・ルール作りが難しいため, 変異原性の多い化合物クラスは誤って陽性と判別されやすい。 (・公知で情報量の多いアラート構造がルールとして作られやすいので, アラート構造がないことで変異原性がないとは, 必ずしも言えない) ・予測率の高い化合物クラスと低い化合物クラスが存在する。試薬・原料は, その数と比較すると公知の変異原性データが限られているので予測率が低い。	・Ames陽性と相関性の高いフラグメント(統計的アラート)と, 知識ベース型ソフトのアラート構造とは同じでないこともしばしばあり, アラート構造の意味が明確でないことが多い。 ・解析結果が使用データベースや解析アルゴリズムに依存する。 ・知識ベース型ソフトと同様, 予測率の高い化合物クラスと低い化合物クラスが存在する。

ICH M7クラス分けマトリックス

知識ベース型 ソフトによる 予測	統計ベース型 ソフトによる 予測	両ソフトの 機械的判断 による予測		両ソフト結果と Expert reviewを 加えた判断
+	+	陽性	<ul style="list-style-type: none"> ・化学的性質(特に反応性) ・構造類似検索によるアラート解析 	多くの場合, 陽性
+	Out of domain or equivocal	陽性		陽性 or 陰性
+	-	多くの場合, 陽性		陽性 or 陰性
-	+	多くの場合, 陽性		陽性 or 陰性
-	Out of domain or equivocal	陽性 or 陰性		陽性 or 陰性
-	-	陰性		多くの場合, 陰性

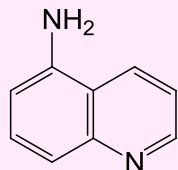
+: 構造アラートの存在 or Ames陽性
 -: 構造アラートの非存在 or Ames陰性

最近のソフトはこの
 解析のサポートも
 充実しつつある

ICH M7に対応するin silico評価の実例

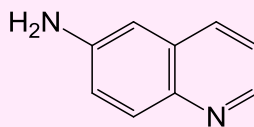
割愛いたします

アミノキノリン類誘導体の変異原性



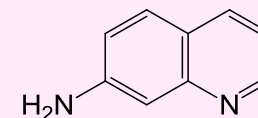
5AQ

Mutagenic
with S9 mix



6AQ

Non-mutagenic
with and without S9 mix

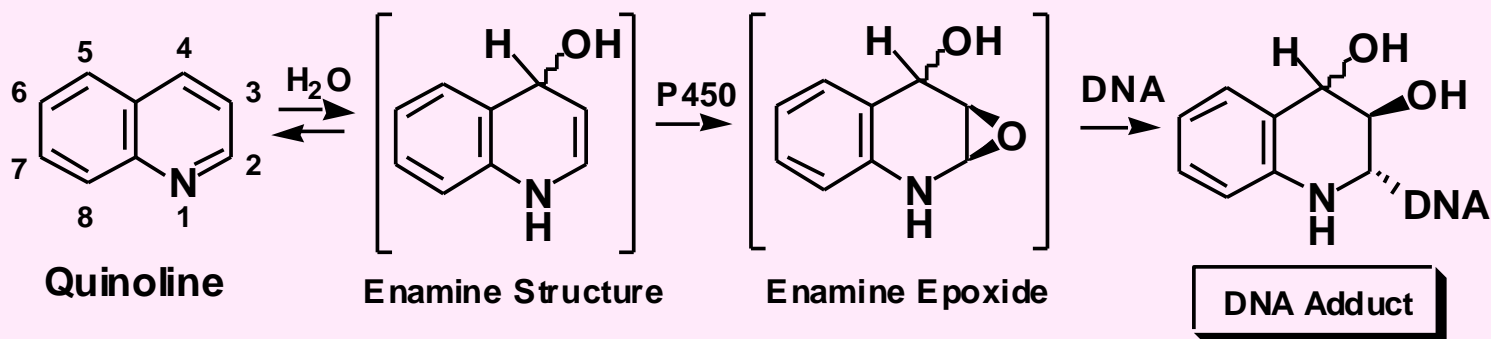


7AQ

Mutagenic
with and without S9 mix

Compound	Mutagenic activity (Revertants per μmol) in TA100	
	Without S9 mix	With S9 mix
2AQ	0	129
3AQ	0	82
4AQ	0	0
5AQ	0	8120
6AQ	0	0
7AQ	40	715
8AQ	255	1850
1-Naphthylamine	0	1530
2-Naphthylamine	0	6860

アラート構造であるキノリンの変異原性発現機序



キノリンの変異原性は, 2位又は3位のフッ素原子の導入によって消失

まとめ

- (1) 知識ベース型と統計ベース型ソフト(モデル)で一致しない解析結果が得られた場合, Expert reviewは特に大切。Expert reviewを助けるソフトの機能の最近の進化は著しい。
- (2) 両解析ソフトによって提示された構造アラートの解析が重要:
構造アラートは真 or 偽(形式的)か? 特に統計ベース型モデルで検出される構造アラート(統計的アラート)の解析が大切。
- (3) 複雑な部分構造(例, 複素環化合物)については, 既知の公開データはその数が限られているので解析ソフトの予測確度が低下しやすい。
→ この不足情報を補うため, 該当部分構造を含む化学物質のAmes試験データを得るのが有用(Class 4に分類できるような戦略を有効活用)
- (4) 化学反応性や代謝物の情報(それ自身あるいは代謝物が求電子性をもつか否かなど)をできるだけもつ。
- (5) 変異原性の機序解明や類似構造物質を含む変異原性データは精度の高い予測につながる。機序不明あるいはデータ数が乏しい化合物クラスも多く, 今後の研究や開示が期待される。