

3) 構造活性相関による遺伝毒性の予測

本間正充

Structural Activity Relationship Approaches for Assessing Genotoxicity

Masamitsu Honma

The focus of the latest legislative and governmental efforts is to establish simple screening tools for identifying those chemicals most likely to cause adverse effects without experimental testing of all chemicals of regulatory concern. The use of structure-activity relationship (SAR) models is a powerful *in silico* technique that should be considered for prioritizing chemicals for subsequent experimental verification. Because carcinogenicity and genotoxicity are among the toxicological endpoints that pose the highest concern for human health, efforts in SAR models for them have been much more pronounced than for any of the other human health end points. This review paper overviews the historical background of SAR models for predicting carcinogenicity and genotoxicity, the current status of capacity and usefulness of some *in vitro* genotoxicity SAR models, and their perspective.

Keywords; Structural activity relationship (SAR), Genotoxicity, Ames tests, Sensitivity, Specificity

はじめに

化学物質の規制に関わる国際機関や、各国規制当局の最近の関心の焦点は、規制の対象となるすべての化学物質を実験的に試験することなく、有害作用を引き起こす化学物質を同定するための単純なスクリーニングツールを確立することにある。構造活性相関 (Structure Activity Relationship; SAR) は、コンピュータトキシコロジーの重要な研究分野であり、有害作用を引き起こす可能性が高い化学物質を、その化学構造から *in silico* で予測する手法である。SARは統合型毒性評価システムの重要な構成要素の1つであり、安全性評価が必要とされる化学物質の優先順位付けや絞り込みに有用である。また、動物実験の代替、もしくは最小化にも貢献できる。SARは、創薬における探索試験段階での医薬品候補化合物の選択や、実際の試験が困難な不純物の安全性評価にも利用されている。現在、工業化学物質、農薬、食品添加物、化粧品材料、医薬品候補化合物の毒性予測のため多くのエキスパートシステムやSARツールが開発されている。

発がん性、遺伝毒性予測とSAR

発がん性は、ヒトの健康にとって最も関心の高い毒性の一つであり、日常生活において暴露する可能性のある発がん性物質に関するSARモデル化の試みは、その他のヒトにおける健康関連のエンドポイントのいずれに対する試みよりも多大な努力が払われている。化学物質の構造から発がん性を予測する研究の歴史も古い。すでに1930年頃には強力な発がん物質として知られているベンツピレンの物性と発がん性との関連を明らかにするための研究が行われている。当初は、吸収、蛍光、赤外、NMRスペクトル、イオン化ポテンシャル、電位、磁気異方性、化学反応性などと、発がん性との関係が詳細に調べられたが、発がん性を規定する性質を見つけることはできなかった。1940年代にSchmidtおよびPullmanらはベンツピレン分子内の電子分布と発がん性の関係に注目し、一部の芳香族炭化水素の発がん性を合理的に説明することに成功した^{1, 2)}。これらの研究が発端となり、いわゆるベンツピレン分子のK領域や、Bay領域と言われる部分構造と、発がん性との相関が明らかとなった。

1970年代、James & Elizabeth Millerらは発がん性アルキル化剤の求電子性に注目し、多くの発がん性化学物質は、求電子性誘導体か、もしくは生体内でそれらに代謝されて、発がん標的組織においてDNAやタンパク質などの求核性基と結合し、がんを引き起こすという理論を唱えた³⁾。それ以降、化学発がんに関する研究は急速

To whom correspondence should be addressed:

Masamitsu Honma: 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-9847; Fax: +81-3-3700-2348; E-mail: honma@nihs.go.jp

に進展した。重要な進歩の一つは、化学発がん研究の重要なツールであるげっ歯類を用いた発がん性試験に対して、より安価で短期間の代替バイオアッセイが確立されたことである。Amesは発がん性化学物質（アルキル化剤、インターカレーターなど）に感受性をもつ一連のサルモネラ変異株を開発し、いわゆるエームス試験を確立した⁴⁾。エームス試験は、発がん性化学物質を検出する *in vitro* モデルといえる。当時の既知の発がん物質の多くは遺伝毒性機序によるものでありエームス試験で陽性を示す化学物質の作用は、ほとんどMillers仮説の範疇で妥当と考えられた。現在では作用機序の観点から、発がん性物質は以下の二つに分類される。1) 遺伝毒性発がん物質であり、DNAに直接損傷を与え、突然変異を誘発し、これが発がんの第1ステップになりうる。2) エピジェネティックな発がん物質であり、これはDNAとは共有結合はせず、直接的にDNA損傷を起こすことは無い。またエームス試験のような標準的な遺伝毒性試験では通常陰性を示す。1)のカテゴリーに属す遺伝毒性発がん物質がMiller仮説に従った特徴を持ち、それ自体が求電子性であるか、その代謝産物や代謝中間体が求電子性を持つ。

Millerの求電子理論に続いて、AshbyとTennantは発がん化学物質に対する構造アラート (Structural Alert; SA) と、発がん性予測のコンパイル (SARモデル) を開発した⁵⁾。発がん性に対するSAは、化学物質の発がん性活性に関連した分子官能基、または部分構造と定義され、同時に発がんの主要なステップであるDNAへの損傷や、突然変異の誘発をもたらす遺伝毒性のSAとも考えられた。Ashbyは米国National Toxicology Programの222の化学物質の中からげっ歯類発がん性試験陽性と強い相関性を示す18種類のSAを同定した。Fig. 1に“Ashby’s polycarcinogen”と呼ばれる18の全てのSAを持つ仮想の究極発がん物質を示す⁵⁾。Toxnet公開データベース、Gold/ZeigerのCarcinogenic Potency Database、イタリアのIstituto Superiore di Santaの動物がん原性ISSCAデータベースに存在する698のエームス試験データと、878のげっ歯類発がん性試験データを用いてAshbyのSARモデルの検証を行ったところ、発がん性試験結果とは65%の一致に留まったのに対して、エームス試験結果とは78%が一致した⁶⁾。このことは、エームス試験用サルモネラ菌株はDNA応答性に対して正しくデザインされており、Millerの提唱する発がん性物質の求電子理論を適切に反映することを示している。一方、他のバイオマーカーについてはSARモデルとの相関性が低い。このような事実から、SARモデルの予測率の検証にはエームス試験が使われることが多い。

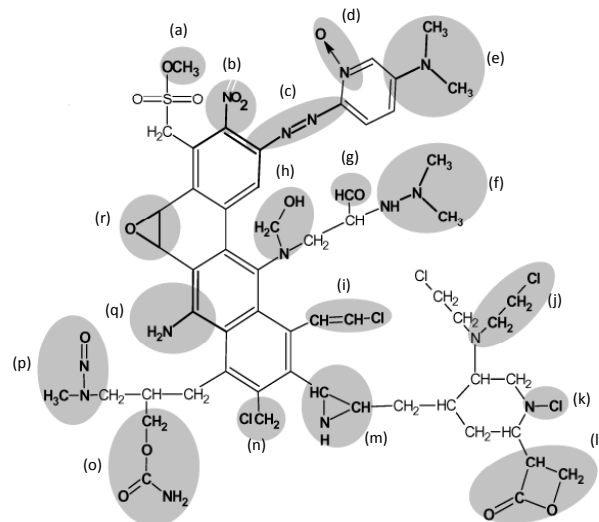


Fig. 1 “Ashby’s poly-carcinogen”; Major structural units which are classified as structure-active positive in the Ames tests. The structures are as follows: (a) alkyl ester of either phosphonic or sulphonic acids; (b) aromatic nitro group; (c) aromatic azo group; (d) aromatic ring N-oxides; (e) aromatic mono- and dialkylamino group; (f) alkyl hydrazines; (g) alkyl aldehyde; (h) N-methylol derivatives; (i) monohaloalkanes; (j) a large family of N and S mustards; (k) N-chloramines; (l) propiolactones and propiosultones; (m) aromatic and aliphatic aziridiny derivatives; (n) both aromatic and aliphatic substituted primary alkyl halides; (o) derivative of urethane; (p) alkyl N-nitrosoamines; (q) aromatic amines; (r) aliphatic and aromatic epoxide.

代表的なSARモデルによるエームス試験の予測

先に述べたようにエームス試験の予測に関しては多くのSARモデルが開発されている。そのモデルはアプローチにより2つに大別される。1つは、知識ベース、規則ベースのエキスパートシステムで、Ashbyらが行ったように、既知データから陽性をもたらす特徴的な部分構造を定義し、ルール化された経験則から、定性的にエームス試験結果の予測を行うものである。もう一つは、化学物質の構造をフラグメントに分解後、パラメータ (数値データ) に変換し、エームス試験陽性と相関性の高いパラメータを用いて、多変量解析、パターン認識により試験結果を予測する人工知能型アプローチである。数値データから定量的な毒性の予測が可能であり、こちらはQSAR (Quantitative SAR) モデルである。前者としては英国ラーサ社のDEREK、後者のQSARとしては富士通が開発したADMEWORKSなどが代表的である。また、その中間型として、化学物質の構造と特徴を表す構造記述子と、多数の部分的構造 (Biophore) を機械的に検出し、統計理論からエームス試験陽性と相関する構造記述子を選別し、予測を行うMultiCASEがある。3つのSARモデルの一般的な特徴に関しては本特論集の

小野の稿を参照されたい。

当研究所、変異遺伝部と総合評価研究室は、我が国の既存化学物質データベースからエームス試験データを有する206化学物質についてDEREK, MultiCASE, ADMEWORKSを用いてその予測性を評価した⁷⁾(Table 1)。予測の評価は感度(Sensitivity; エームス陽性物質を陽性と判定する能力)、特異性(Specificity; エームス陰性物質を陰性と判定する能力)、および一致性(Concordance; 陽性および陰性の一致率)を指標として行った。表が示すように感度が最も高かったものがDEREKとADMEWORKS(73.1%)、特異性が最も高かったものがMultiCASE(91.1%)、一致率ではDEREK(86.4%)が最も高かった。ADMEWORKSは特異性が69.7%と低く、このことは多くのエームス陰性物質の約3割を間違えて陽性と判定する(False positive)ことを意味する。同様の傾向は、英国のKirklandが報告した703のエームス試験を含む*in vitro*遺伝毒性試験データベース(CGX database)での評価結果からも得られた^{7,8)}。一方、Snyderらは2002年~2004年のPhysicians' Desk Referenceに収載の医薬品からエームス試験データがある394品目を抽出し、DEREK, MultiCASE, TOPKAT(ADMEWORKSと同様の人工知能型QSARモデル)の3種類のSARモデルを用いて試験結果の予測を行ったところ、MultiCASE, TOPKATは比較的高い特異性を示したが、感度は50%以下であった⁹⁾。また、DEREKにおいては感度、特異性とも低く一致率は3つの中で最低であった。医薬品と工業化学物質では化学構造に含まれるSAに特徴があるため異なった結果になったものと予測される。いずれにせよここでのSAR利用の目的は遺伝毒性可能性物質のスクリーニングであり、できるだけ感度を上げ、偽陰性(False negative)を減らすモデルの構築、改良が重要である。

SARモデルの組合せによる予測率の向上と、化学物質の優先付けへの適用

DEREK, MultiCASE, ADMEWORKSの3つのSARモデルはそれぞれ異なる経験的、数学的、統計的アプローチが取り入れられており、そのエームス試験予測結果も時として異なることは先に述べた。Hayashiらは3つのSARモデルを組み合わせることにより、お互いの欠点を相補し、エームス試験の予測率の向上を図ることに成功した⁷⁾。また、彼らはこれまでの化学物質の安全性評価の経験から、分子量が3,000以上の高分子化合物の大部分はバクテリアの細胞壁を通過することができず、一般にエームス試験陰性であること、例外としてエポキシ基を持つ高分子ポリマーにはエームス陽性を示す化合物が存在することなどを、SARアプローチの前に考慮した決定樹を提唱した(Fig. 2)。これは実際の毒性試験を必要とする化学物質の優先付けや、絞り込みに有用である。3つのSARモデルにおいて2つ以上で陽性もしくは陰性の場合、3つ全てにおいて陽性もしくは陰性の

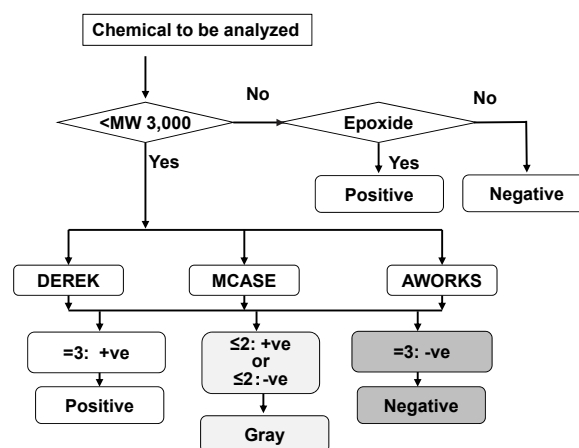


Fig. 2 Decision tree for prioritizing chemicals for consequent experimental verification. MCASE: MultiCASE, AWORKS: ADMEWORKS

Table 1 Performance of SAR models for the Ames test (Hayashi et al., 2005)

| | Ames Results | + | - | Total | Sensitivity (%) | Specificity (%) | Concordance (%) |
|--------|--------------|----|-----|-------|-----------------|-----------------|-----------------|
| DEREK | + | 19 | 7 | 26 | 73.1 | 88.3 | 86.4 |
| | - | 21 | 159 | 180 | | | |
| | Total | 40 | 166 | 206 | | | |
| MCASE | + | 13 | 20 | 20 | 65.0 | 91.1 | 88.0 |
| | - | 13 | 146 | 146 | | | |
| | Total | 26 | 166 | 166 | | | |
| AWORKS | + | 19 | 26 | 26 | 73.1 | 69.7 | 70.1 |
| | - | 54 | 178 | 178 | | | |
| | Total | 73 | 204 | 204 | | | |

MCASE: MultiCASE; AWORKS: ADMEWORKS

場合にカテゴリー化することにより予測率を向上させることができる。後者の場合、感度87%、特異性95%、一致率94%と予測率は格段に向上した (Table 2)。一方、すべての化学物質は予測結果の違いからこのようなカテゴリーの中に入るわけではない。当然適応される化学物質の割合 (Applicability) は低下し、先の場合には約半分程度 (55%) となる。しかしながら、現在、年間10トン以上生産されている既存化学物質は我が国で20,000種類以上も存在し、そのうち約90%である18,000種類の化学物質についてはエームス試験さえ実施されていない状況を考えて、9,900種類 (18,000×0.55) の化学物質の絞り込みには依然として重要である。

他の *in vitro* 遺伝毒性の予測

染色体異常試験はエームス試験と同様に化学物質の承認及び登録における安全性確認に重要な *in vitro* 遺伝毒性試験項目の一つである。染色体異常試験についても SARモデルが開発されているが、染色体異常は化学物質とDNAの直接的相互作用に加え、DNA複製に関する酵素 (トポイソメラーゼ等) や、染色体分配に関与する核タンパク質 (ヒストンタンパク質等) との相互作用などのメカニズムによっても誘発されるため、より複雑である。また、染色体異常自体も、分裂中期における染色体の構造的特性の結果として観察可能となるため、上記の全てのメカニズムが染色体異常として認識されるわけではない。従って、染色体異常を引き起こす化学物質の予測のためのモデル化には多様な計算的アプローチが必要である。また、エームス試験と比較して、SAの抽出に必要な実験データベースは少ない。

知識ベースのSARモデルであるDEREK (バージョン

11) には74種類の染色体異常試験陽性のSAが収録されている (エームス試験は87種類)。エームス試験と同様に209の既存化学物質に関する染色体異常試験の予測性を評価した (Table 3)。感度、特異性、一致性とも全てエームス試験に劣り、特に感度は64%であった。このことは36%の染色体異常誘発物質を予測できないことを示す (False negative)。染色体異常試験結果自体が、げっ歯類発がん性試験結果と相関性が低いことも指摘されており、一部の染色体異常陽性結果は遺伝毒性発がん性と無関係であるのかもしれない。染色体異常試験の予測性の向上にはSARモデルの改良と、染色体異常試験自体の改良の両者が必要である。

化学物質は薬物代謝によって活性化され遺伝毒性を発現するものが少なくない。 *In vitro* 遺伝毒性試験の場合、通常ラット肝臓から調製されたマイクロゾーム分画 (S9) を試験化合物と同時に加えることにより、予測される肝臓での代謝物の評価を同時に行っている。親化合物の化学構造と遺伝毒性作用との関連性が低い場合、薬物代謝による活性化体の関与が考えられる。代謝に起因する毒性発現の複雑さはSAR研究では厄介である。ブルガス大学のMekenyanらは、ラット肝S9での代謝反応、および非生物的反応の総合的ライブラリーと、代謝による変換確率の推定値を用いて妥当な代謝マップを創り出す帰納的アルゴリズムを開発した¹⁰⁾。これは組織代謝シミュレーター (Tissue Metabolite Simulator; TIMES) と呼ばれている。既存の文献データから得られた薬物代謝に関する変換率の情報を用いて、特定の基準条件に対して変換確率を較正することができ、また、データがない場合は組み合わせアルゴリズムを用い、既知の代謝マップを適合性が最も高い変換確率に書き換えることができ

Table 2 Performance of combined SAR model for the Ames test (Hayashi et al., 2005)

| Combination of 3 SARs | +++ | --- | Total | Sensitivity (%) | Specificity (%) | Concordance (%) |
|-----------------------|-----|-----|-------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ames | 13 | 2 | 15 | | | |
| | 5 | 94 | 99 | | | |
| Total | 18 | 96 | 114* | 86.7 | 94.9 | 55.3 |

*Among 206 chemicals, 114 chemicals were categorized into +++ or ---. Applicability 55.3% (114/206).

Table 3 Performance of DEREK for the chromosome aberration test

| DEREK | + | - | Total | Sensitivity (%) | Specificity (%) | Concordance (%) |
|-------|----|-----|-------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Chrom | 60 | 34 | 94 | | | |
| Ab | 29 | 86 | 115 | | | |
| Total | 89 | 120 | 209 | 63.8 | 74.8 | 69.9 |

Chrom Ab: Chromosome aberration test

る。実際のTIMESソフトウェアでは代謝物の予測だけでなく、彼らによって同じく開発されたQSARモデルであるOASIS (Optimized Approach Based on Structural Indices Set) との組合せによって、個々の代謝物のエームス試験、染色体異常試験結果まで予測することができる。

おわりに

(Q)SARモデルの*in vitro*遺伝毒性試験の予測に関して本稿で述べた。しかしながら、*in vitro*遺伝毒性試験自体が発がん性化学物質の予測を目的とするスクリーニング試験であることを考えると、スクリーニング試験の結果の予測を行うことにどれだけの科学的な価値があるか、疑問に思われるかも知れない。医薬品を始め、多くの化学物質の安全性評価のためにエームス試験、染色体異常試験が法律で義務づけられており、多数の候補化合物や、既存化学物質の中から優先度の高い物質を選択するツールとして(Q)SARは現実的に極めて有効である。しかしながら、(Q)SAR研究の本質はツールとしての利用ではない。始めに述べたように(Q)SARはMillerの唱えた発がん化学物質の求電子理論により、エームス試験というバイオアッセイの結果を証明することから始まった。この思想は分子レベルで生命現象、特に毒性メカニズム解明を試みた最初の例である。ほとんど全ての毒性はエームス試験のように単純では無く、極めて複雑であり、またメカニズムが不明である。2007年から米国EPAが中心となって開始したToxCastプログラムでは*in vitro*試験系から多くの毒性経路やメカニズムを抽出し、(Q)SARに組み入れる手法を開発する¹¹⁾。成功すれば、Millerのように様々の毒性を分子レベルで解明できるかも知れない。それが(Q)SARとコンピュータトキシコロジーの最終目標であり、その利用が科学的知見に基づく化学物質の真のリスク評価に通じるものであると信じる。我が国でも同様のプロジェクトを立ち上げ、毒性学の未来を切り開く努力が必要である。

参考文献

- 1) Schmit, O.: *Physik Chem B42*, 83 (1939)
- 2) Pullman, A. and Pullman, B.: *Rev Sci* 3, 117 (1946)
- 3) Miller, J.A. and Miller, E.C.: *Cancer* 47, 2327-2345 (1981)
- 4) Ames, B.N., *Cancer* 53, 2030-2040 (1984)
- 5) Ashby, J. and Tennant, R.W.: *Mutat Res* 204, 17-115 (1988)
- 6) Benigni, R. and Bossa, C.: *Mutat Res*, 659, 248-261 (2008)
- 7) Hayashi, M., Kamata, E., Hirose, A., Takahashi, M., Morita, T., and Ema, M.: *Mutat Res*, 588, 129-135 (2005)
- 8) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L., and Muller, L.: *Mutat Res*, 584, 1-256 (2005)
- 9) Snyder, R., Pearl, G., Mandakas, Choy, W., Goodsaid, F., and Rosenblum, I.: *Environ Mol Mutagen* 43, 143-158 (2004)
- 10) Mekenyan, O.G., Dimitrov, S.D., Pavlov, T.S., and Veith, G.D.: *Curr Pharm Des* 10, 1273-1293 (2004)
- 11) Schmit, C.W.: *Environ Health Perspect*, 117, A349-A352 (2009)