

# QSAR を用いた内分泌攪乱化学物質の優先順位付け

ウェイダ・トン

米国 FDA 国立毒性学研究センター (NCTR)

Logicon ROW Sciences 計算科学グループ主任

ボブ、紹介をありがとうございます。講演を始める前に、まず、この重要なシンポジウムへ参加するようお願いいただいた菅野純博士に感謝したいと思います。また、米国 FDA 国立毒性学研究センターで行っている内分泌攪乱化学物質に関する我々の研究について話をする機会を与えてくださった環境省に感謝したいと思います。

内分泌攪乱化学物質は、ヒトや野生生物に多様な影響を及ぼすことがかなり明らかになってきています。米国では、米国 EPA に飲用水と食品添加物における数多くの化学物質の内分泌攪乱の可能性を検討するためのスクリーニングと試験の戦略を開発するよう命じた 2 つの法律が議会を通過しました。

米国では約 20 種の *in vitro* および *in vivo* アッセイで構成される 2 段階のスクリーニングと試験という方法が確立されています。1 つの化学物質にこれらのアッセイを実施するには時間と労力を要し、非常に費用がかかります。より効率的にこの 2 段階のスクリーニングと試験を実行するためには、どの化学物質を先に試験すべきかを明らかにするためのプレスクリーニング技術が必要です。

内分泌攪乱化学物質のスクリーニングと試験に関する諮問委員会 (EDSTAC) は、優先順位を設定する目的で、受容体結合などの生物学的活性に関する情報を提供する QSAR モデルをプレスクリーニングツールとして推奨しています。

およそ 5 年前に、米国 FDA 国立毒性学研究センターで、我々は内分泌攪乱化学物質知識ベースプロジェクトと称されるプロジェクトを開始しました。このプロジェクトでは、我々はエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、 $\alpha$ -フェトプロテイン、および SHBG の 4 種類の受容体について結合アッセイを行いました。これらの 4 つの受容体は、内分泌攪乱と関連しています。

我々は、それぞれの受容体につき約 200 種の化学物質を試験し、結合アッセイプロトコルを標準化しました。我々がこれらの分析に選択した化学物質は、広範囲にわたる構造的多様性と結合活性のものが含まれました。我々の研究室では、これらのデータを使用して QSAR モデルの開発を行いました。

何年にもわたりこの分野の研究を行い、多数の内分泌攪乱化学物質に関するデータを蓄積しました。これらのデータは、ウェブベースのデータベースとソフトウェアで構成される EDKB データベースにまとめました。<http://edkb.fda.gov> からこのデータベースへアクセスすると、内分泌攪乱化学物質データを検索することができます。

ほぼ 2 年前に、我々は優先順位付けの目的で我々の QSAR モデルを修正するという省庁間合意を米国 EPA との間で結びました。NCTR のモデルは EPA により妥当性の検討が行われ、約 250 種の化学物質について、予測結果が実験結果と比較されます。ER モデルの妥当性検討のプロセスは本年末までに完了する予定です。我々は AR モデルも開発しており、我々の研究室でのプロセスは完了に近づいています。

このスライドは QSAR の基本的な背景を示しています。QSAR の基本的な原理は、類似した構造の化学物質は類似した生物学的活性を示すだろうとの推定です。従って、我々は QSAR で化学構造と生物学的活性との関係を明らかにしようとしています。

化学構造は、いわゆる化学デスクリプタを使用して表すことができます。デスクリプタにより、化学物質の 2D と 3D による化学構造と共に物理的/化学的特性が表されます。QSAR に組み込まれた生物学的活性のデータは、受容体結合などの単一の生物学的イベントや急性あるいは慢性毒性などの生物学的に高度で複雑なエンドポイントが連動して表示されます。

本日のプレゼンテーションでは、エストロゲン受容体結合活性を予測するための QSAR モデルの結果をお話します。これらモデルは、我々の研究室で分析されている 230 種の化学物質に基づいて開発されました。これらモデルを使用して、試験が行われていない化学物質の ER 結合活性を化学構造だけをもとに予測します。それが、菅野純博士が述べておられる *in silico* 予測です。

優先順位付けに QSAR を利用するのは、薬物発見の分野では極めて一般的に行われるようになってきました。薬物の発見では、主に試験を課す化学物質の数を絞り込むために QSAR が使用されています。高い親和性を有する化学物質の同定に力が入っていますが、活性を持ついくつかの化学物質が見逃されているのではないかと少し懸念されています。

法規制の適用における優先順位付けに QSAR モデルが利用されていますが、薬物の発見で利用されているものとは異なります。我々は試験を課す化学物質の数をさらに絞り込みたいと考えていますが、親和性の高いものと低いものの両方を同定しようとしています。このような用途では、偽陰性がより大きな問題です。

偽陰性とは、不活性であると予測されたのに、アッセイでは実際に活性を持っている化学物質です。従って、偽陰性の化学物質については、さらに詳細な実験による検討の優先順位が低くなります。そのため、何年間も環境中で有害作用を発生させることになります。

我々が QSAR モデルを開発するために使った基準は 2 つあります。第一の基準は、QSAR モデルは試験を課す化学物質の数の絞り込みが効率的に行えなければならないということです。第二の基準は、最も重要な基準と私は思いますが、モデルは偽陰性を出してはならないということです。なぜなら、これは内分泌攪乱化学物質の同定の非常に初期の段階であるからです。

我々はこのような用途のために様々な QSAR の方法を検討しましたが、単一の QSAR モデルを使用してこれら 2 つの基準を満たすことはできないことが分かりました。そのため、NCTR ではいくつかの異なる QSAR モデルを組み合わせて、「4 相」法に統合しました。これは段階的に次の相へ進む手法で、各相は偽陰性を最小限にするための複数の相補的な QSAR モデルを含んでいます。前の相は、次の相で予測する化学物質の数を減らすためのスクリーンとして使用します。我々の予測は、イエスまたはノーの答えが得られる質的な予測を初めの相で行い、量的な予測を後の相で行います。計算にかかる時間と人間の専門的知識は、初めの相よりも後の相で多く要します。これまでのところ、我々はこの方法により試験を課す化学物質の 80%以上を排除できることを確認しており、この用途で偽陰性は発見されていません。

エストロゲン受容体結合活性の予測のためのこの 4 相法では、第 1 相において、エストロゲン受容体と結合する可能性が最も低い化学物質を排除するために 2 つの単純な排除フィルターを使用しました。これらの 2 つの排除フィルターは、分子量の範囲と環構造のインジケータです。すなわち、分子量が 94 未満または 1000 を超え、環構造がない化学物質はこの相から排除されます。

第 1 相を通過した化学物質は第 2 相に進み、活性の有無が検討されます。活性のない化学物質はこの相から排除され、活性を持つ化学物質は第 3 相に進んで量的な予測が行われます。

この統合化されたシステムの最終段階では、優先順位決定のための知識ベースシステムまたはエキスパートシステムとして一連の規則を構築する必要があると強く感じます。これまで蓄積された人間の知識と専門的意見（すなわち、規則）を組み込んで始めて、本システムは有用になります。システムは、その知識ベース中の規則に基づいて個々の化学物質に関する決定ができるようになります。規則の定義には、計算化学者、毒物学者、および規制当局が参加すべきです。QSAR モデルは人間の知識を組み込むことなく最高の能力を発揮することはできないと考えられます。

限られた時間しかありませんので、第 2 相と第 3 相の QSAR モデルについて簡潔にお話します。次に、このシステムの機能を示すためにいくつかの結果を紹介します。

先ほどお話した通り、第 1 相を通過した化学物質は第 2 相に進み、3 つの構造警告モデル、7 つのファーマコフォアモデル、および 1 つの分類ツリーモデルの合計 11 のモデルを用いて活性の有無が検討されます。各モデルは、イエスまたはノーの予測を提示するだけです。この相で活動無しと分類された化学物質は排除されます。活性有りと予測された化学物質だけが第 3 相に進み、さらに詳細な検討が行われます。

この相ではすべての活性を持つ化学物質の同定を試みますが、同時に、この相で使用されているモデルはデータサイズを軽減する機能を発揮する必要があります。これらの考察を基に、この相で使用することが選択された各モデルは、ER 結合活性のためのユニークかつ重要な構造的要件をコード化します。

これらはこの相における 3 つの構造警告です。構造警告は、ER 結合に重要な役割を果たす 2D 下部構造です。この構造警告を含んだ化学物質は活性有りと見なされます。例えば、エストラジオールは、黄色で強調表示し

たこのステロイド性の骨格を持っています。ゲニステインは2個の炭素で分割された2つのベンゼン環を有し、ノニルフェノールは複数のフェノール環を有します。

ファーマコフォアモデルについても同様の発想を基にしていますが、わずかな違いがあります。ファーマコフォアモデルは、3Dスペース上の構造的機能に基づいた活性を有する化学物質を同定します。さらに、我々は形状制約と称される手法も加えています。形状制約とは、活性を有する化学物質のサイズがこの形状に該当しなければならないというものです。

我々がこの相に使用している最近のモデルは、分類ツリーモデルと称されます。分類ツリーモデルは、一連の規則に基づいて、化学物質を活性の有無で分類します。日本のパチンコのように、logPが0.5未満である場合は、当該化学物質は活性無し、そうでない場合は、活性有りとなります。

これらの11のモデルにより、この相では2セットの予測が提示されます。まず、活性の有無についての予測です。この相における偽陰性の発生率を抑制するため、我々は、11のモデルの何れかにより活性有りとして予測される化学物質を活性化学物質と定義しました。すべてのモデルによって活性無しとして予測された化学物質のみを活性無しと見なすこととしました。このような方法を利用することにより、この相における偽陰性を減少させ、最小限にすることができます。また、ER結合活性の半定量的推定を行う際にもこれら11のモデルを利用することができます。その背景となっている理論的根拠とは、化学物質がより多くのモデルで活性有りとして予測された場合は、その化学物質はより活性が高いと推定されることです。活性を持つ化学物質を予測しているモデルの番号に基づいて、我々は結合活性を推定することができます。

先ほどお話ししました通り、第2相を通過した化学物質は第3相に進み、定量的予測が行われます。この相では、我々は古典的なQSAR、HQSAR、および菅野博士が言及されたCoMFAを含む多くの異なるQSARの方法を検討しました。これらのモデルのそれぞれは、内部および外部の妥当性の検討により完全な妥当性検査が行われました。内部の妥当性検査では、 $r^2$ と $q^2$ などの標準的統計学的方法を用いて、モデルの品質と安定性と予測性を評価しました。外部の妥当性検査では、我々は一連の試験をモデルに課しています。この一連の試験には、モデルを開発する際のトレーニングセットに含まれていなかった化学物質が含まれています。

これまでのところ、古典的なQSARおよびHQSARよりもCoMFAが最良の機能を発揮することを確認しました。現在、我々はこの相における定量的予測のためにCoMFAモデルを使用しています。ところで、CoMFAリサーチは、ACS-NCTR CRADAを介してAmerican Chemistry Counsel (ACS)が後援しています。

これは3D QSAR/CoMFAモデルの結果です。y軸はモデルによる計算結果を示しており、x軸は130種の化合物の実験結果です。モデルによる計算結果は、実験結果との良好な一致が見られることが分かります。相関係数は0.91です。重要なことは、このモデルの $q^2$ 値が0.7であることです。 $q^2$ 値はモデルの予測性を判断しており、一般に、0.5より大きい $q^2$ 値のQSARモデルは、予測性を備えていると見なされます。我々のモデルの $q^2$ 値は0.7です。

KuiperとWallerのそれぞれによる2つのデータセットの報告があります。これらの2つのデータセットは、我々のトレーニングデータセットには含まれていない約40種の化合物を含んでいます。従って、これらの2つのデータセットは我々のモデルを試験するためのデータセットとして用いることができます。

我々はこれら40種の化学物質の予測を行いました。予測された結果をこのスライドに示しています。黒の三角形はKuiperのデータセットに関する予測結果で、青い正方形はWallerのデータセットに関する予測結果です。予測結果はy軸に、実験結果はx軸に示されています。ご覧の通り、予測結果は実験結果との良好な一致が観察できます。

これらのデータセットでは、実験では活性無しと判断された6種の化学物質があります。そのうちの5種は我々の予測でも活性無しとされています。6つ目の化学物質は、実験では活性が-2.5未満であり、CoMFAモデルではlogRBAが-2.6と予測しており、実験結果と予測結果には整合性が見られます。

次に、複数のデータセットに使用するこの4相法のいくつかの用途についてお話します。実際に、我々の方法を多くのデータセットに適用しました。ただ今、5つのデータセットを見ていただきました。なぜなら、これら5つのデータセットは、環境中の化学物質や工業用化合物に関連した化学物質を含んでいるからです。

NishiharaのデータセットとSotoのデータセットは、合計約600種の化学物質を含んでいます。ER活性データはこれらの2つのデータセットに利用可能です。我々はこれらの2つのデータセットに第1相と第2相を適

用し、試験を課す化学物質の約 60~70%を排除することができました。重要なことに、我々はこれらの 2 つのデータセットで偽陰性を観察しませんでした。

我々は 4 相法をこれら 3 つのデータセットに適用しました。これらの 3 つのデータセットは、米国 EPA が準備したものであり、様々な *in vitro* および *in vivo* アッセイを実施する必要があるかもしれません。ご覧の通り、第 1 相と第 2 相を使用するだけで、試験を課す化学物質の 85%以上を排除できました。さらに第 3 相を実施すれば、試験を課す化学物質の 90%以上を排除できます。

次の数枚のスライドでは、この 4 相法を使用した HPV データセットの予測についてさらに詳しく説明します。HPV とは High Production Volume の略語です。それは、米国で大量に生産されている化学物質をデータセットに含んでいることを意味します。私が話の始めに言及したように、我々は内分泌攪乱化学物質と関係のあるデータをたくさん含む EDKB データベースを持っています。ER 活性データは、結合アッセイ、イーストリポーター遺伝子アッセイ、イースト 2 ハイブリッドアッセイ、MCF7 細胞増殖アッセイ、およびいくつかの *in vivo* データから収集されました。

我々はこれらの HPV 化合物を我々のデータベースと照合し、この HPV リスト中のいくつかの化学物質に利用可能な生物学的データがあるかを調査することができます。我々は過去に実験で試された 68 種の化学物質を確認しました。従って、どのように我々の予測結果がこれら 68 種の化合物の実験結果と対照をなすかをさらに詳細に観察することができます。

結果はこの表で要約しています。ご覧の通り、この 68 種の化合物では、27 種が不活性と予測され、この予測は実験観察と一致しています。

41 種の化学物質は第 2 相に進み、そのうち 24 種は不活性と予測されました。これら 24 種の化学物質については、4 つの異なるアッセイデータが利用可能であり、23 種の化学物質は我々の予測と一致しています。残りの 1 種の化学物質フタル酸ジブチルは 5 つの研究室が試験を行っており、4 つの研究室が不活性であると判断し、1 つが活性であるとしています。この化学物質に関する我々の予測は不活性です。第 3 相に進む 17 種の化学物質のうち 10 種は不活性と予測されました。これらの 10 種の化学物質も 4 つのタイプのアッセイデータが利用可能であり、そのうち 9 種が実験観察と一致しています。もう 1 つの化学物質フタル酸ブチルベンジルについては、我々は不活性と予測しています。この化学物質については、8 つの研究室が試験データを持っています。そのうち 6 つの研究室が不活性であることを示していますが、他の 2 つの研究室は活性であるとしています。このプロセスを通して、我々は第 3 相に進む 7 種の化学物質を同定します。

## 質疑応答

カブロック：急いで結論に進んでいただけますか？

トン：はい。これは、これら 7 種の化学物質のアッセイ結果と比較した我々の第 3 相の予測結果です。ご覧の通り、アッセイ結果は我々の予測と一致しています。

要約すると、このプレゼンテーションでご覧頂いたデータと研究は、QSAR を用いた優先順位設定ツールを開発するための米国 EPA との共同研究であり、我々が開発したシステムは 4 相法と称されます。このシステムは、複数のデータセットを適用するために使用し、極めて効率的であることが明らかにされています。

これらのモデルは、試験を課す化学物質の 90%以上を排除し、偽陰性の発生率のごくわずかです。システムの妥当性は、今年の終わりまで検討されます。結果は誰もが閲覧できるようインターネット上で公表されることとなっており、アンドロゲン受容体結合活性に関しては同じシステムが既に開発されています。ご清聴ありがとうございました。

カブロック：質問はございますか？

質問：モデルの第 3 相では、何を陰性と定義していますか？

トン：予測が-3 未満—log RBA が-3 未満—を活性無しと見なしています。

質問：つまり、それは 0.001%未満・・・。

トン：マイナス 3.0 です。そうですね、0.0001 です。

カブロック：質問はありませんか？ありがとうございます。