

構造相関活性(QSAR)ソフトによる皮膚感作性物質の
予知予測検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2011-04-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 一博, 日下, 幸則, 青山, 公治, 上田, 厚, 原田, 幸一, 大槻, 剛巳, 柴田, 英治, 竹下, 達也, 山下, 邦彦, 土橋, 邦生, 皆本, 景子, 梅村, 朋弘, 田村, 太郎, 宮川, 宗之, 鹿庭, 正昭, 亀尾, 聡美, 井戸, 敏子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/3178

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）
分担研究報告2

構造相関活性（QSAR）ソフトによる皮膚感作性物質の予知予測検討

- 分担研究者 佐藤一博（福井大学医学部環境保健学）
主任研究者 日下幸則（福井大学医学部環境保健学）
分担研究者 青山公治（鹿児島大学医学部衛生学）
分担研究者 上田 厚（熊本大学医学部衛生学）
分担研究者 原田幸一（熊本大学医学部保健学科）
分担研究者 大槻剛己（川崎医科大学医学部衛生学）
分担研究者 柴田英治（愛知医科大学医学部衛生学）
分担研究者 竹下達也（和歌山県立大学医学部公衆衛生学）
分担研究者 山下邦彦（ダイセル化学工業(株)評価解析センター）
分担研究者 土橋邦生（群馬大学医学部保健学科）
分担研究者 皆本景子（熊本大学医学部衛生学）
分担研究者 梅村朋弘（福井大学医学部環境保健学）
分担研究者 田村太朗（福井大学医学部環境保健学）
研究協力者 宮川宗之（労働安全衛生総合研究所）
研究協力者 鹿庭正昭（国立医薬品食品衛生研究所）
研究協力者 亀尾聡美（群馬大学医学部公衆衛生学）
研究協力者 井戸敏子（福井大学医学部皮膚科）

研究要旨：

我々は、定量的構造活性相関(QSAR)技術を用いて皮膚感作性の陽性・陰性を判別関数により予測するモデルを作成した。皮膚感作性物質は、ドイツ学術振興協会(DFG)の“Maximale Arbeitsplatz-Konzentration” (MAK) and “Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert” (BAT) values 2008から122物質、コントロール物質として製品評価技術基盤機構(NITE)のサイトにある化学物質の分類及び表示に関する世界調和分類(GHS)省庁連絡会議作成の非皮膚感作性物質169物質である(計291物質)。ADMEWORKS/ModelBuider software(富士通)を用いて、この291物質の二次元三次元構造から約800のパラメーターを創出し、特徴抽出により47パラメーターセットと32パラメーターセットを作成した。2つのパラメーターセットを用いて種々の線形及び線形の判別分析を行なった。32パラメーターセットを用いたSupport Vector Machine (SVM)とAdaBoostでは分類

率は100%であった。47パラメーターセットを用いたNeural Networkの交差反応(leave-one-out cross-validation)では、予測率は81.44%だった。これは、我国初の皮膚QSARモデルであり、皮膚感作性物質の初期予測に適応可能と思われるが、皮膚QSARソフトの改訂が必要である。

A. 研究目的

職業性皮膚疾患は接触皮膚炎、湿疹、皮膚がんなどがあり非外傷性の職業性疾患として最も頻度が高い(Fedorowicz et al., 2005)。その中でも接触皮膚炎が頻度が高い。米国では全職業性疾患のうち22%が皮膚疾患であり内、80%が接触皮膚炎である(Cherry et al., 2000)。接触皮膚炎は日本における医師の職業性アレルギーの中でも最も多く見られた(Sato et al., 2004)。

2003年国連は、化学物質の分類表示の国際調和基準(GHS)を出版し、2008年には世界中で実施が可能となっている(United Nations, 3rd rev. 2009)。GHSの皮膚感作物質の分類基準には動物実験の結果が取り込まれている。例えば、OECDガイドライン406であるモルモットによるmaximization testやBuhler testやOECDガイドライン429であるマウスを使ったlocal lymph node assay (LLNA)である。ドイツのDFGやEUの欧州化学庁(ECB)でも皮膚感作性の分実験の結果を取り入れている。しかし、日本産業衛生学会(JSOH)の皮膚感作性分類基準は動物実験の結果を考慮していない(Japan Society for Occupational Health, 2008)。現在、改訂中である。

EUにおける化学物質の登録、評価、認可及び制限(REACH)下では、年間1トンに以上、EUで生産または持ち込まれる全

ての化学物質は、環境影響や発がん性や感作性などの健康影響を評価しなければならない事になっている。REACHは動物実験に代わる*in vitro*のテストやQSARによる評価を推奨している。現在、感作性に関しては承認された*in vitro*のテストがないため、QSARによる皮膚感作性の評価が注目を集めている(Patlewicz et al., 2008)。更に、EUでは化粧品指令第7次改訂により、動物実験をした原料を用いた化粧品の販売が禁止された(Carrera et al., 2009)。新規化学物質に対する皮膚感作性のテストとしてOECDガイドラインなど妥当性のテストがあるが、時間と経費が掛かることが問題である(Golla et al., 2009)。この規制や動物愛護のため、QSARソフトなどコンピューターを用いて発がん性や感作性を評価する方法が近年開発されてきた。

今回、我々は皮膚感作性物質と非皮膚感作のコントロールの物質を用いてADMEWORKS/ModelBuider(富士通九州システムズ)により種々の判別分析を行ない分類率、予測率を計算した(Fujitsu Kyusyu Systems Limited, Japan)(Hayashi, 2005)。この皮膚感作性のQSARソフトは我国では初めての報告である。オクタノール/水分配係数で、この値が大きいと疎水性に富み細胞透過性が高く、小さいと親水性が高く細胞透過性が小さい。我々は、皮膚感作性にとってLog Pは重要で判

別関数の重みは大きいと予測した。しかし、Log Pの重みは47パラメーターセットで小さく32パラメーターセットでは残らなかった。今回の結果、皮膚感作性にとってLog Pは重要でない事が示唆された。

B. 研究方法

皮膚感作性物質は、ドイツ MAK の感作性物質リストの Sah と Sh の 190 物質である (Deutschen Forschungsgemeinschaft, DFG, 2008)。分類基準になっているのは、疫学研究、症例報告と妥当性の検証された動物実験 (モルモットの maximization テスト、Buhler テスト やマウスの LLNA) である。一方、コントロールは製品評価技術基盤機構 (NITE) のホームページにある GHS 省庁連絡会議が行なった皮膚感作性物質でないとの報告がある 'not classified' の 218 物質である (The Japanese GHS Inter-ministerial Committee)。しかし、コンピュータ化学では、無機物質・有機無機の金属化合物やポリマーは一般の有機化合物と一緒に扱えない。これら 117 物質を除いた皮膚感作性 122 物質とコントロール 169 物質を評価した。

計 291 化学物質の二次元三次元構造から約 800 のパラメーターを創出し、特徴抽出 (頻度の低いパラメーター、多重共線性やノイズパラメーターを除去) より 47 パラメーターセット、32 パラメーターセットを作成した。この 2 つのパラメーターセットを用いて、Neural Network (NN)、Support Vector Machine (SVM)、AdaBoost や最小二乗アルゴリズム (TILSQ) などの線形、非線形の判別分析を行なった。

分類率と (leave-ten-out) 交差検定による予測率を計算した。これらの解析は ADMEWORKS/ModelBuilder (富士通九州システムズ) 行なった。(Hayashi, 2005)。

C. 研究結果

1. パラメーターの重み

'secondary sp³ carbon count' (methylene groups (-CH₂-) の数) の重みは 0.290789、'environment molecular connectivity of substructure' (-O-C) の重みは 0.288673 であった。どちらも正の数で皮膚感作性を誘導する。一方、'all-path calc for substructure' (-C-) の重みは -0.265617、'count of substructure (DMPATH)' (-ester-) の重みは -0.233505 で負の数であり皮膚感作は誘導しないと考えられた。

2. 判別分析

291 物質 (122 皮膚感作性物質と 169 コントロール物質) を 47 と 32 のパラメーターセットを使って Neural Network (NN)、the Iterative Least Squares linear discriminant 最小二乗アルゴリズム (TILSQ)、Support Vector machine (SVM) や AdaBoost による判別分析と Leave-Ten-Out による交差検定 (CV) を行なった。

分類率は 90.38% から 100% で、100% の完全分類は 32 パラメーターセットを用いた SVM と AdaBoost で得られた。予測率は、Leave-Ten-Out による交差検定 (LTOCV) によった。予測率は 73.88% から 81.44% であった。47 パラメーターセットを用いた NN で 81.44% の予測率が得られた。分類率が 100% だった 32 パラメ

ーターを用いたSVMとAdaBoostの予測率は76.63%と79.04%であった。

D. 考察

1986年に動物愛護ガイドラインである86/609/ECが実施されて以来、EUでは化学物質のテストにおいて動物実験を置換・精練・削減(3R)する事代替法を支援することが政策となった。(Lillenblum et al., 2008)。しかし、現在皮膚感作性をテストするREACHに適合した*in vitro*の方法は無い(Grindon et al., 2007, Patlewicz et al., 2008)。

そのため幾つもの皮膚感作性のQSARソフトが開発された。例えば Toxicity Prediction Komputer-Assisted Technology, (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA; TOPKAT) や Multi Computer-Automated Structure Evolution (MultiCASE Inc., Cleveland, Ohio, USA; M-CASE)これらは統計を基本としたQSARである。Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge (Derek) for Windows (DfW, LHASA Ltd., Leeds, UK)は人工知能によるQSARでTimes Metabolism Simulator for Skin Sensitization (LMC, University of Bourgas, Bulgaria; TIMES-SS)は両者のハイブリッドである(Patlewicz et al., 2007a, Patlewicz et al., 2007b)。今回の解析はADMEWORKS/ModelBuilder(富士通九州システムズ)で行なったが、これは統計を基本とするQSARである。これらのQSARソフトの中で皮膚感作性に関して最も良く使用されているのはDerekであ

る(Grindon et al., 2007)。TOPKATとDerekを用いたモルモットのデータとの一致率は73.3%と82.9%で、DerekのLLNAとの一致率は73%だった(Fedrowicz et al., 2005)。我々の予測率は73.88%から81.44%でありほぼ同じである。QSARシステムは発展段階であり十分な信頼性は無いが、新規化学物質の皮膚感作性の初期予測にコンピューターを用いた方法が推奨されている(Grindon et al., 2007)。我々が作成したQSARシステムも実用可能と思われる。

我々は、皮膚透過性が化学物質の皮膚感作に重要でQSARモデルにおいてLog Pが重要な因子となると予測した。Barratt (1994)は分子量とオクタノール/水分配係数(Log P)が皮膚透過性に重要であると報告している。今回の解析では、水溶性はLog Pと相関性が高く(多重共線性)、水溶性のパラメーターを除いて解析した。Log Pの重みは小さく、分子量は32パラメーターセットでは抽出されなかった。実験データが限られていて透過性に関するパラメーターが創出されなかったのかもしれない(Golla et al., 2009)。今回のモデルでは、オクタノール/水分配係数が他の重要なパラメーターと置き換わったか、幾つかのパラメーターが相互に作用した可能性もある。多くの化学物質が溶剤に溶けて人間の皮膚に曝露するが、溶剤の皮膚透過性が化学物質のLogPよりも皮膚感作性に大きな影響を及ぼしているのかも知れない。更なる考察と追加研究が必要である。

我々の分類率と予測率は90.83%~100%と73.88%~81.44%であった。これら

の値を改善するには、実験データの拡大、確かな仮説によるパラメーターの特徴抽出の改良、パラメーターの追加、皮膚感作に適合した判別関数の選択など更なる研究が必要である。

E. 結論

平成 21 年度の研究計画を予定通り実施できた。我国初の皮膚感作性 QSAR ソフトを開発した。更に精度を上げるため、OECD の原則に基づき、外的妥当性の検証を行ない、化粧品、色素に限定した QSAR ソフトを改訂する予定である。

F. 研究成果発表

以上は、第 22 回日本動物実験代替法学会において発表し、日本実験動物代替法学会誌 *Alternatives to Animal Testing and Experimentation (AATEX)* 14(3): 940-946, 2009) に掲載された。

F. 引用文献

Barratt, M.D. (2000) Prediction of toxicity from chemical structure. *Cell Biol Toxicol*, 16, 1-13.

Carrera G.V.S.M., Gupta S. and Aires-de-Sousa J. (2009) Machine learning of chemical reactivity from databases of organic reactions. *J Comput Aided Mol Des*, 23, 419-429.

Cherry, N., Meyer, J.D., Adishes, A., Brooks, R., Owen-Smith, Y. and Beck, M.H. (2000) Surveillance of occupational skin disease: EPIDERM and OPRA. *Br J Dermatol*, 142, 1128-1134.

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). List of MAK and BAT Values 2008. p129-136. Weinheim Wiley-VCH, Weinheim

ECB (European Chemical Beuro) ;<http://ecb.jrc.ec.europa.eu/>

Fedorowicz, A., Singh, H., Soderholm, S. and Demchuk, E. (2005) Structure-activity models for contact sensitization. *Chem Res Toxicol*, 18, 954-969.

Golla, S., Madihally, S., Robinson R.L., and Gasem K.A.M. (2009) Quantitative structure-property relationship modeling of skin sensitization: a quantitative prediction. *Toxicol in Vitro*, 23, 454-465.

Grindon C., Combes R., Cronin M., Roberts D.W. and Garrod J.F. (2007) An integrated decision-tree testing strategy for skin sensitization with respect to the requirements of the EU REACH Legislation. *Altern Lab Anim*, 35, 683-697.

Hayashi M., Kamata E., Hirose A., Takahashi M., Morita T. And Ema M. (2005) In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat Res*, 588, 129-135.

Japan Society for Occupational Health (2008) Recommendation of Occupational Exposure Limits (2008-2009). *J Occup Health*, 50,

426-443.

Lillenblum W., Dekant W., Foth H., Gebel T., Hengstler J.G., Kahl R., Kramer P.J., Schweinfurth H. and Wellin K.M. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under European Chemical Legislation (REACH). *Arch Toxicol*, 82, 211-236.

Patlewicz, G., Aptula A.O., Uriarte, E., Roberts, D.W., Kern, P.S., Gerberick, G.F., Kimber, I., Dearman R.J., Ryan, C.A. and Basketter, D.A. (2007a) An evaluation of selected global (Q)SARs/expert systems for the prediction of skin sensitisation potential. *SAR QSAR*, 18, 515-541.

Patlewicz, G., Dimitrov, S.D., Low, L.K., Kern, P.S., Dimitrova, G.D., Comber M.I.H., Aptua A.O., Philips, R.D., Niemela, J., Madsem, C., Wedebye, E.B., Roberts, D.W., Bailey, P.T. and Mekenyan, O.G. (2007b) TIMES-SS —A promising tool for the assessment of skin sensitization hazard. A characterization with respect to the OECD validation principles for (Q)SARs and an external evaluation for predictivity. *Regul Toxicol Pharmacol*, 48, 225-239.

Patlewicz, G., Aptula, A.O., Roberts D.W. and Uriarte, E. (2008) A minireview of available skin sensitization (Q)SARs/Expert

systems. *QSAR Comb Sci* 27, 60-76.

The Japanese GHS Inter-ministerial Committee, Results of the classification, in NITE information about the status of the implementation of GHS in Japan

http://www.safe.nite.go.jp/english/ghs_index.html#results accessed on Nov. 4th, 2009

Sato, K., Kusaka, Y., Suganuma, N., Nagasawa, S. and Deguchi, Y. (2004) Occupational allergy in medical doctors. *J Occup Health*, 46, 165-170.

United Nations. (2009) Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS). 3rd rev., New York and Geneva.