

カテゴリーアプローチを用いた 化学物質の生物濃縮性予測手法の検討

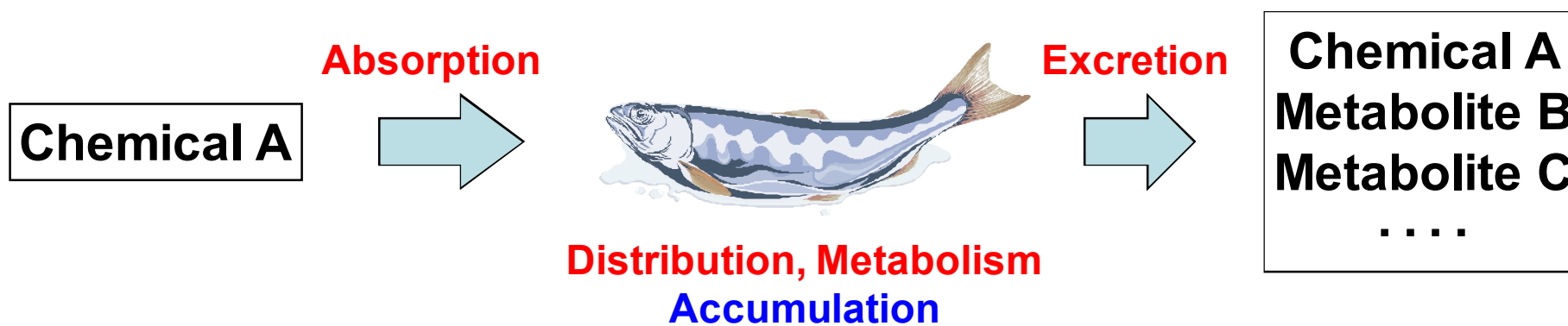
NITE化学物質管理センター成果発表会2011

化学物質管理センター
安全審査課 池永 裕

本日の発表内容

1. 背景と目的
2. カテゴリーアプローチとは？
3. 化学物質の生物濃縮性におけるカテゴリーの考え方及びカテゴリー分類
4. カテゴリーⅡ－A(p.7参照)に該当する物質の定義及び生物濃縮性予測手法の検討
5. まとめ

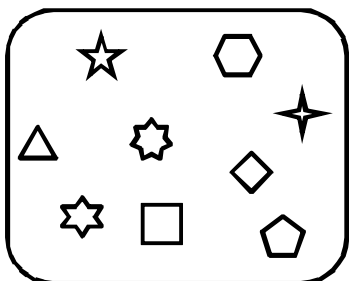
- ✓ 化学物質の安全性評価において、化学物質の生物濃縮性は、食物連鎖による人体への蓄積を考える上で、重要な指標です。また、濃縮度試験には多くの費用(約700万円)がかかるため、実測試験に替わる方法が求められています。
- ✓ その方法の1つとして、メカニズムに基づく予測根拠の明示や透明性の高い議論を行うことができる「カテゴリーアプローチ」の活用が国際的にも検討されています。



- ✓ (独)製品評価技術基盤機構(NITE)では、生物濃縮性の構造活性相関の利用方法を確立するために、化審法の既存化学物質安全性点検の濃縮度試験データ¹⁾を基に化学物質の生物濃縮性における「カテゴリーアプローチ」について検討を行っています。
- ✓ 本発表では、2009年10月に発表したカテゴリー I ^{2),3)}(p.7参照)に続いて、カテゴリー II - A (p.7参照)に該当する物質の定義と生物濃縮性予測手法及びエーテル、ケトン、ニトロ化合物のような極性の官能基が生物濃縮性に与える影響の検討結果について報告します。

- ✓ カテゴリーアプローチとは、分子構造、物理化学的性状及び有害性等が類似または規則的なパターンを示す化学物質をグループ化し、未試験物質を評価する手法です。この方法は、予測根拠の明示と透明性の高い議論を行うことができるため、国際的にも検討が進められています。OECDでは、カテゴリーアプローチの実施を支援するためのシステム [OECD (Q)SAR Application Toolbox (OECD Toolbox)⁴⁾] の開発が行われています。

有害性等が既知の化学物質

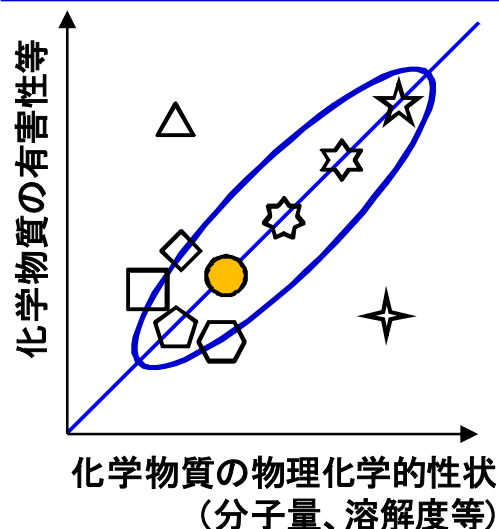


● : 未試験物質

化学物質の分子構造
(官能基、基本骨格) 及び有害性等の類似性に基づくグループ分け

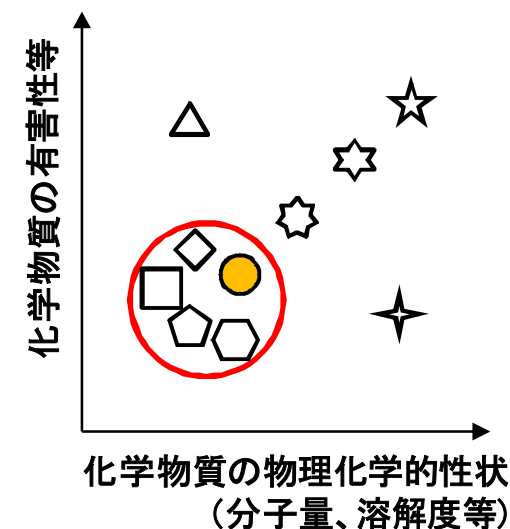


予測例(1):
物理化学的性状と有害性等との間に相関があるため、予測式を作成できる物質群



又は

予測例(2):
化学物質の構造と有害性等が類似な物質群



✓ 魚類における化学物質の生物濃縮性は、次の3つの観点から分類することができます。

- ① 生体内への取り込みのメカニズム^{5),6)}
- ② 水中及び生体中での分子間相互作用^{7),8)}(化学物質と水和している水分子及び生体分子との分子間相互作用)
- ③ 化学物質の生体内における反応性

生体膜透過のメカニズム

1. 受動拡散
2. 能動輸送
3. 傍細胞経由
4. 膜動輸送

水中及び生体中での 分子間相互作用

1. ファンデルワールス力
2. 双極子-双極子相互作用
3. 水素結合性相互作用
4. イオン性相互作用

生体内における反応性

1. 代謝
2. タンパク質結合性

受動拡散が生体への取り込み主要因である物質

カテゴリー

I

単純受動拡散カテゴリー³⁾：
生体膜透過において、
・ファンデルワールスカ
が主要な分子間相互作用として
働く物質
(例:脂肪族、芳香族炭化水素
およびそのハロゲン化物)

II -A

生体膜透過において、
・ファンデルワールスカ
・双極子-双極子相互作用
が主要な分子間相互作用として
働く水素結合アクセプターを持
つ物質
(例:エーテル、ケトン)

II -B

生体膜透過において、
・ファンデルワールスカ
・双極子-双極子相互作用
・水素結合相互作用
が主要な分子間相互作用として
働く水素結合ドナー (N、O、S
に結合したH) を持つ物質
(例:アミド、アルコール)

カテゴリー

III

水中(pH=7.0)でイオンとして
存在し、生体膜透過に
・イオン性相互作用
が主要な分子間相互作用として
働く物質
(例:カルボン酸、アミン)

生体内での反応性が高い物質

カテゴリー

IV

タンパク質結合性がある
物質(例:チオール)

V

生体内で代謝されることが
知られている物質
(例:エステル、
リン酸エステル)

生体への取り込み主要因が
受動拡散ではない物質

カテゴリー

VI

傍細胞経路または能動輸
送、膜動輸送で生体内に
取り込まれる物質
(例:糖、ペプチド、
アミノ酸)

分解物で生物濃縮性を
評価する物質

カテゴリー

VII

水中において容易に分解
する物質
(例:ハロゲン化ベンジル、
ハロゲン化アリル)

* 物質によっては複数のカテゴリー
に該当するものもある。

- ✓ カテゴリーⅡ-Aには、化学物質と生体分子との相互作用において、ファンデルワールスカ、双極子-双極子相互作用が主要な分子間相互作用として働く水素結合性アクセプターを持つ物質が該当します。データセット(付録1参照)に用いた化審法既存化学物質(373物質)では、以下の官能基を持つ物質群 i ~ ix が該当することを確認しました。

i .3級アミン及び3級アミド基

ii .エーテル基

iii .ケトン基

iv .ジアゾ基

v .スルフィド及びジスルフィド基

vi .スルホニル基

vii .ニトロ基

viii .ニトロソアミン基

ix .ピリジン、ピペリジン、モルホリン、
フラン、チオフェン、チアゾール
(ただし、Hと結合したNを持つ物質を除く)

- ✓ カテゴリーⅡ-Aに該当する物質は、生体膜透過においてファンデルワールス力、双極子-双極子相互作用の影響を受けます。
- ✓ 静電的相互作用の理論式(1)及び(2)(Table1)から、カテゴリーⅡ-Aに該当する物質の分子間相互作用には、分極率(α)、双極子モーメントの2乗(μ^2)が影響を与えるパラメータであると考えられます。

Table1 分子間相互作用における静電的相互作用と静電的相互作用エネルギーの関係^{5),6)}

分子間相互作用	分子間相互作用において 主に働く静電的相互作用	静電的相互作用 エネルギーの理論式	分子間相互作用 エネルギーの大きさ [kJ mol ⁻¹]
ファンデルワールス力	誘起双極子-誘起双極子	$V \propto \frac{\alpha\alpha'}{r^6}$ (1)	< 1
双極子-双極子相互作用	双極子-双極子	$V \propto \frac{\mu^2\mu'^2}{r^6}$ (2)	< 2
水素結合性相互作用	水素結合	不詳	10~30
イオン性相互作用	イオン-イオン	$V \propto \frac{qq'}{r}$ (3)	400~4000

- ✓ 生物濃縮性におけるエーテル、ケトン、ニトロ化合物のような極性の官能基の影響(ファンデルワールスカ、双極子-双極子相互作用の影響)について調べるために、カテゴリーII-Aに該当する67物質(logPowが実測されている物質)を μ^{2*1} とモル屈折率*2(Molecular Refractivity [MR]、 α と比例関係にある値)の大きさの違いに基づいて分類し、logPow*3(実測値)とlogBCF*4との関係について比較を行い、生物濃縮挙動の違いについて検討しました。

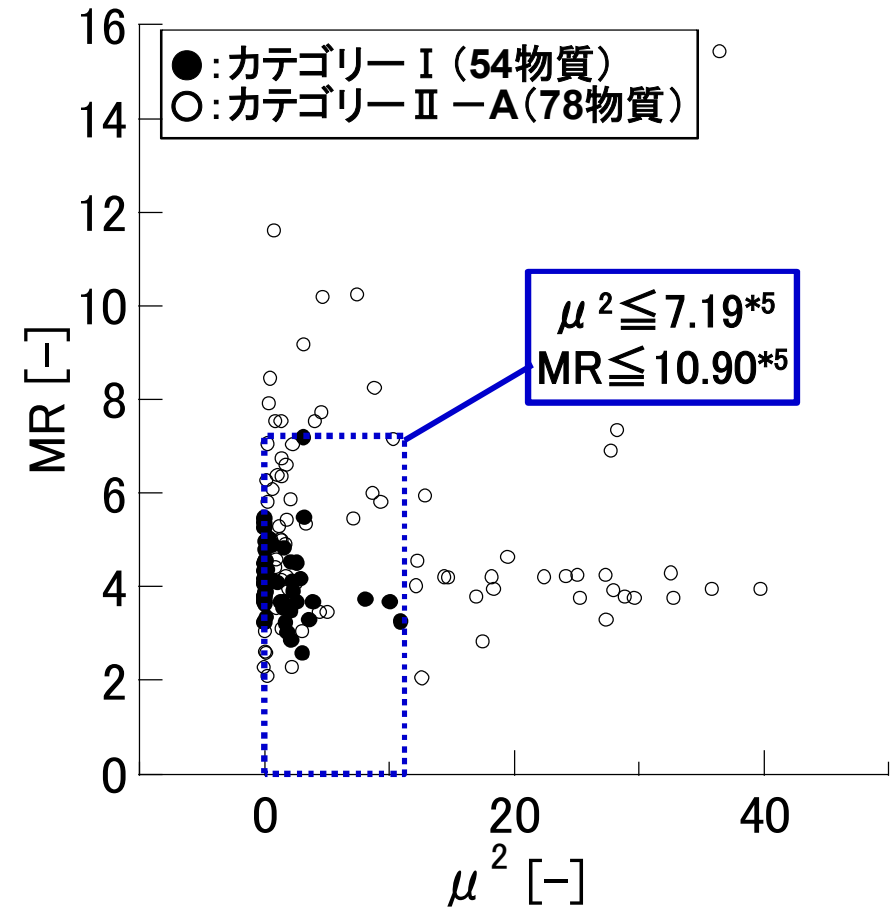


Fig.1 カテゴリー I 及び II に該当する物質の μ^2 vs. MRプロット

* 1 Database Manager ver.1.3を用いて算出

* 2 MOE ver.2009.10を用いて算出

* 3 1-オクタノールと水の2つの溶媒層に化学物質を加えて、平衡に達したときの濃度比

* 4 化学物質の[生体内濃度]と[水中濃度]との比

* 5 カテゴリー I における最大値

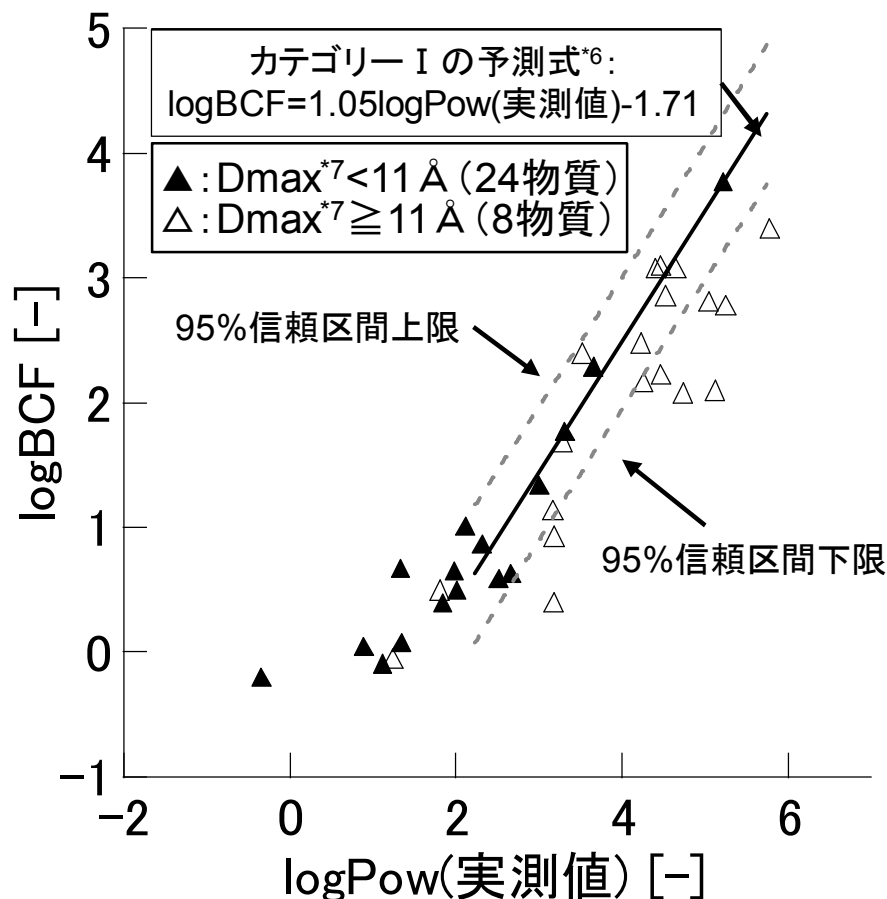


Fig.2 logPow(実測値) vs. logBCFプロット
 ($\mu^2 \leq 10.90$ かつ $MR \leq 7.19$ の32物質)

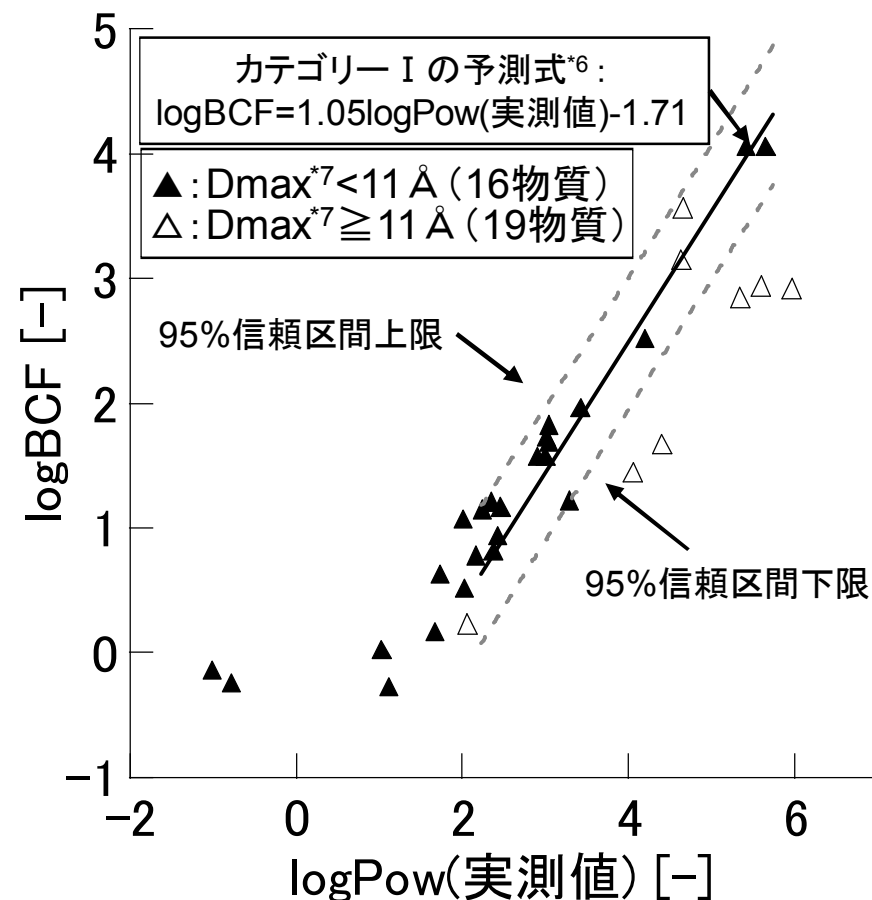


Fig.3 logPow(実測値) vs. logBCFプロット
 ($\mu^2 > 10.90$ または $MR > 7.19$ の35物質)

μ^2 、MRの値にかかわらず、logPow(実測値)とlogBCFとの間に良い相関を持つ

*6 $D_{max} \geq 11 \text{ \AA}$ または $\log Pow \geq 6$ の物質はカテゴリーIの予測式の適用範囲外 *7 分子を球に入れたとき最小となる直径の値

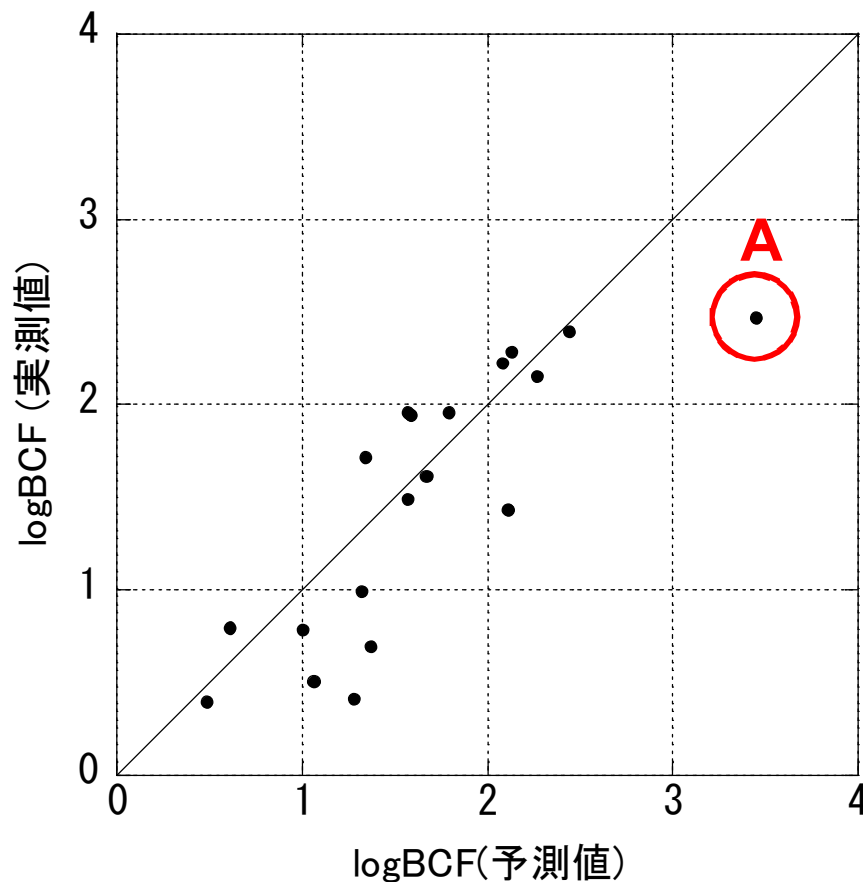


Fig.4 logBCF(予測値) vs. logBCF(実測値)プロット
(化審法新規化学物質29物質)

昭和50年度から平成19年度までに届け出られた化審法新規化学物質の中で、以下の条件を満たす物質の濃縮度試験結果をバリデーションに使用しました。

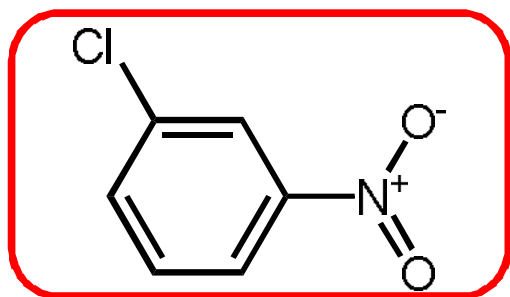
- 有機低分子量かつ濃縮度試験が化合物単体で試験が行われている物質
- 測定濃度が検出限界以下でなく、BCF値が明確に測定されている物質
- 濃縮度試験が対水溶解度以下で行われている物質

↓ **29物質**

フォールスポジティブ(予測式の95%信頼区間外)の物質Aは脂環式ケトン化合物

- ① KOWWINによるlogPowが過大に見積もられている可能性がある
- ② トレーニングセットに類似物質がないため、Read-acrossでは評価できない

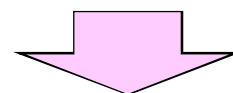
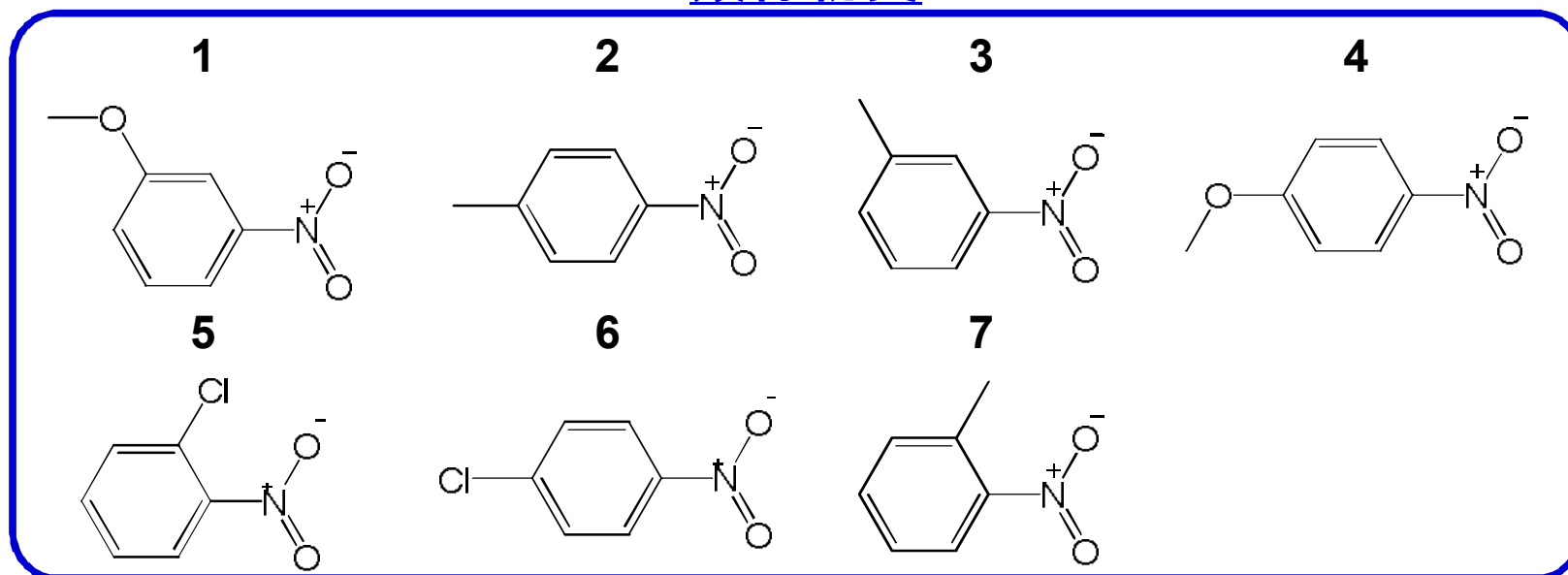
化審法新規化学物質に対しても良好な予測結果が得られています。

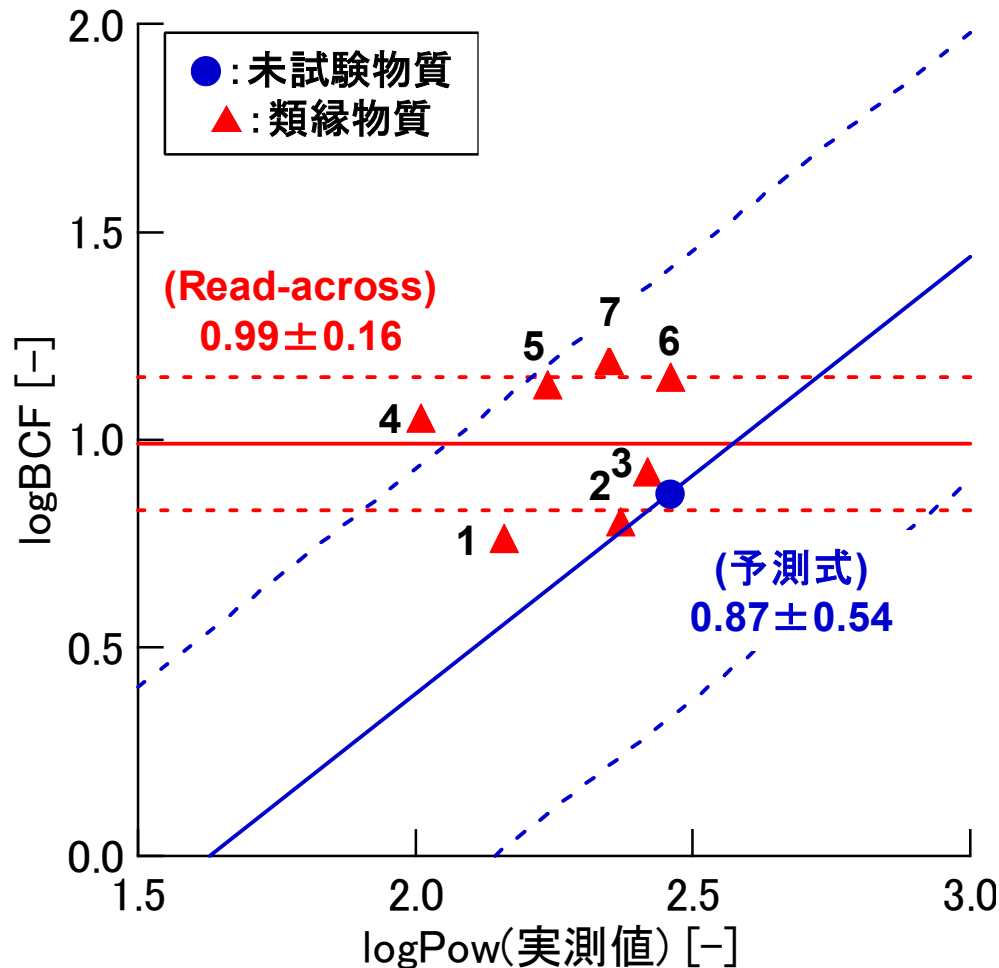
未試験物質(m-ニトロクロロベンゼン)

logPow(実測値) = 2.46, Dmax = 9.2 Å

生物濃縮性が既知の物質で、以下の条件に当てはまるものを類縁物質として選択した。

- ①ベンゼン2置換体
- ②置換基はニトロ基を1つ以上含む
- ③類縁物質のlogPow(実測値)が 2.46 ± 0.5

**類縁物質**



予測式、Read-across (類推)の両方の評価結果において、logBCFの最大値が3を超えないことから、この物質は「高濃縮性ではない」と評価します。

Fig.5 logPow(実測値) vs. logBCFプロット
(m-ニトロクロロベンゼン及び類縁物質7物質)

- ✓ 分子間相互作用に影響を与える分極率(α)、双極子モーメントの2乗(μ^2)の値に基づいてカテゴリーII-Aに該当する物質を分類し、logPowとlogBCFとの関係の比較を行いました。が、 μ^2 、MRの値に関わらず、logPowとlogBCF間に良好な相関が見られました。
- ✓ このことから、化学物質の生物濃縮性におけるエーテル、ケトン、ニトロ化合物のような極性の官能基の影響は弱く、カテゴリーII-Aに該当する物質はカテゴリーIと類似な生物濃縮挙動を持つことが示唆されました。
- ✓ カテゴリーII-AはカテゴリーIと同様の生物濃縮挙動を持つため、カテゴリーIと同様の方法(logPowを記述子とした予測式(予測式(1))と予測式(2))とRead-across(類推)を用いて、生物濃縮性を予測を行うことが可能と考えられます。
- ✓ 本手法による予測結果は、化学物質審議会の参考資料として活用されています。(平成23年5月から)

予測式(1): $\log\text{BCF} = 1.05\log\text{Pow}(\text{実測値}) - 1.71$ ($R^2=0.905$, $n=48$)

予測式(2): $\log\text{BCF} = 1.03\log\text{Pow}(\text{計算値}) - 1.48$ ($R^2=0.890$, $n=54$)

※ $D_{\text{max}} \geq 11 \text{ \AA}$ 、 $\log\text{Pow} > 6$ の物質は、予測式の適用範囲外

1. 化学物質総合情報システム(CHRIP):
<http://www.safe.nite.go.jp/japan/db.html>
2. 池永裕, 櫻谷祐企, 佐藤佐和子, 山田隼, 第37回構造活性相関シンポジウム要旨集, 85-86(2009)
3. NITE 化学物質管理センターHP(構造活性相関に関する取り組み):
http://www.safe.nite.go.jp/kasinn/qsar/category_approach.html
4. OECD (Q)SAR Application Toolbox :
http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html
5. Isaia J., The Journal of Physiology, 326(1), 297-307(1982).
6. 構造活性相関懇話会編, 薬物の構造活性相関 ドラッグデザインと作用機作研究への指針, 南江堂, 365-371(1979).
7. Israelachvili J. N., 分子間力と表面力 第2版, 朝倉書店, 393-400(1996).
8. 西尾元宏, 有機化学のための分子間力入門, 16-22(2009).

✓ 化審法既存点検による濃縮度試験結果1)が公表されている全783物質(平成20年8月12日まで)の中で、次の3つの条件を満たしている373物質を解析に使用した。

1. 有機低分子量(2~5類) かつ **単体化合物**
2. (**対水溶解度**) > (**濃縮度試験濃度**)
3. 測定濃度が検出限界以下でなく、**BCF値が明確に測定されている**(各物質のBCFの代表値は、最低濃度区における後半3回(6点)の平均)

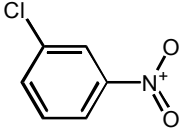
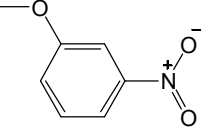
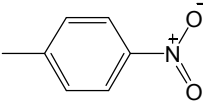
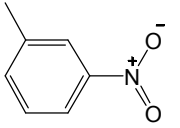
✓ データ解析

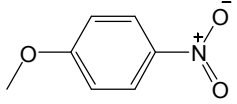
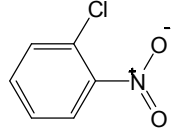
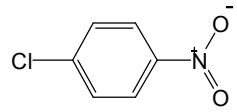
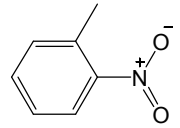
- Igor ver.5.05
- OECD (Q)SAR Application Toolbox ver.1.1

✓ 記述子の計算

- 分子屈折率(Molecular Refractivity)の算出:
MOE ver.2009.10 (Chemical Computing Group, Canada)
- μ (双極子モーメント)及び D_{\max} (分子を球に入れたとき
最小となる直径)の算出:
Database Manager ver.1.3 (Laboratory of Mathematical
Chemistry, Bulgar)

m-ニトロクロロベンゼンの類推表

No.	評価対象物質	1	2	3
CAS No.	121-73-3	555-03-3	99-99-0	99-08-1
物質名	m-ニトロクロロベンゼン	m-ニトロアニソール	p-ニトロトルエン	m-ニトロトルエン
分子構造				
分子量	157.6	153.1	137.1	137.1
対水溶解性[ppm]	-	100	442	100
Dmax [Å]	9.2	10.3	9.5	9.2
logPow	実測値	2.46	2.16	2.37
	KOWWIN	2.46	1.89	2.36
logBCF	実測値	-	0.75	0.79

No.	4	5	6	7
CAS No.	100-17-4	88-73-3	100-00-5	88-72-2
物質名	p-ニトロアニソール	o-ニトロクロロベンゼン	p-ニトロクロロベンゼン	o-ニトロトルエン
分子構造				
分子量	153.1	157.6	157.6	137.1
沸点 [°C]	-	-	-	-
対水溶解性[ppm]	590	440	453	652
Dmax [Å]	10.7	8.5	9.6	8.5
logPow	実測値	2.01	2.24	2.46
	KOWWIN	1.89	2.46	2.46
logBCF	実測値	1.04	1.12	1.14