

## 定量的健康リスク評価のための有機リン化合物の QSAR モデルの開発

### Development of QSAR model of organic phosphorus compounds for quantitative health risk assessment

○小谷健輔\*, 益永茂樹\*

Kensuke KOTANI, Shigeki MASUNAGA

**Abstract.** Organic phosphorous compounds (OPCs) are known to have neurotoxic effect through the inhibition of acetylcholinesterase. Here, we tried to develop a preliminary toxic prediction model of OPCs based on quantitative activity structure relationship (QSAR). Toxicity values were obtained from dose response analysis of chronic neurotoxicity tests on rat. And structural values were taken from physical properties estimated by molecular orbital method. Predicted toxicity values were extrapolated to a common scale of DALY (disability-adjusted life year) for quantitative health risk assessment using epidemiological data. Then, the final relationship between DALY and physical property of OPCs were established.

**Key Words:** QSAR, Organic phosphorus compound, Cholinesterase inhibition, Quantitative health risk assessment, DALY

#### 1. はじめに

##### 1.1 QSAR の現状

毎年、2 万種以上の新しい化学物質が合成、登録されている。それらの内、市場化される物も少なくない。しかし、それらすべての物質に対して毒性試験を行うことは膨大なコストと時間が必要となる。また動物愛護の観点からラットやマウスを用いた毒性試験に対する反対もあり、動物を使用した毒性試験が忌避される傾向にある。そこで、毒性試験を行わずに有害性評価を行うことが可能な定量的構造活性相関 (Quantitative Structure Activity Relationship : QSAR) モデルの開発が望まれている。

既存の毒性影響に関する QSAR モデルでは、無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level : NOAEL) や最小影響用量 (Lowest Observed Adverse Effect Level : LOAEL)、半数致死量 (Lethal Dose, 50% : LD50) や半数影響濃度 (Effective Dose, 50% : ED50) が応答変数として利用されることが多い<sup>1,2)</sup>。しか

し、NOAEL や LOAEL は、実験の中で影響が観察されない最大濃度と観察される最小濃度であるため、実験時に採用された用量区に大きく依存し、毒性値として用量と影響の大きさが明確ではない。他方、現実の人の曝露レベルにおける定量的なヒト健康リスク評価に利用可能な毒性値を導出しようとするのであれば、軽微な慢性影響に対する値を考慮する必要があるため、LD50 や ED50 の値を利用することは難しい。このため、既存の QSAR モデルを用いて日常生活における慢性的な化学物質曝露による健康リスクの大きさを定量的に評価することは困難な状況である。そもそも QSAR モデル自体がそのような定量的なリスク評価を目的として開発されて来たと言うより、スクリーニング評価のためのツールとして開発されてきたと言える。

## 1.2 有機リン化合物のコリンエステラーゼ活性阻害

有機リン化合物は殺虫剤、農薬、難燃剤、可塑剤などさまざまな用途に使用されている。一方、有機リン化合物はコリンエステラーゼ阻害作用を持っていることが知られており、神経毒性影響が懸念されている。殺虫剤、農薬用途に比べ難燃剤、可塑剤用途の神経毒性は弱い<sup>3)</sup>。そのため、難燃剤用途では、ハロゲン系からの代替が近年多くみられる。しかし、難燃剤や可塑剤用途の有機リン化合物はコリンエステラーゼ活性阻害能力が小さいだけでゼロではない。そのため、ハロゲン系からリン系難燃剤への代替にはコリンエステラーゼ活性阻害による健康リスクというカウンターリスクが発生する。有機リン化合物への代替が真にリスクを下げるかどうかは評価してみなければわからないが、代替物質のような新規化学物質の毒性情報は多くの場合欠如しているのが実情である。

## 1.3 本研究の目的

そこで本研究では、既存の QSAR モデルを下敷きに、他の化学物質による健康リスクと同一尺度で比較可能な定量的健康リスク評価に活用できる有機リン化合物の有害性予測モデルを開発することを目的とする。リスク指標として障害調整生命年 (disability-adjusted life year : DALY) を用いた。DALY とは、疾病負荷を総合的に示すもので、公衆衛生と健康影響評価の分野で次第に一般的なものとなってきている。DALY は、死亡意外にも、損なわれた健康や障害のために失われた健康的な生活の年数も含めるため、さまざまな影響による健康リスクを同じ尺度で評価することが可能である。

本研究では毒性値の用量と影響の大きさの関係を明確にするため、毒性情報として利用する一つ一つの毒性試験の用量反応関係を数理モデルによって記述し、その用量反応関係とヒトの影響に外挿することで曝露とコリンエステラーゼ活性の関係、さらに曝露と重篤度との関係を数式で表現する。これは定量的リスク評価に必要な視点からの有害性予測である。このような QSAR モデルが完成すれば、有機リン化合物の健康リスクと他の化学物質リスクとの比較や毒性情報がないリン系化合物の使用や代替を事前に評価することが可能となる。

尚、本講演論文集において示す方法論は開発中の段階のものであり、示す結果も予備的なもので

あることに留意されたい。

## 2. 方法

本研究では QSAR モデルに基づく有機リン化合物のコリンエステラーゼ阻害に関する毒性予測モデルを開発するために以下の 4 段階の調査・研究を行った。

- ① 文献調査による毒性情報収集、および数理モデルを用いた用量反応関係の解析。(2.1)
- ② 分子軌道法等による化学物質の QSAR モデルに必要な物性パラメータの計算。(2.2)
- ③ 物性パラメータと毒性情報との間の多変量解析に基づく QSAR モデルの提示。(2.3)
- ④ 疫学情報を用いた動物試験結果のヒト健康影響への外挿方法の検討。(2.4)

### 2.1 文献調査による毒性情報収集、および数理モデルを用いた用量反応関係の解析

本研究ではコリンエステラーゼ阻害の毒性情報がある 13 種の有機リン化合物の慢性毒性試験情報を収集し、数理モデルを用いて用量反応解析を行った。物質ごとの慢性毒性値の整合性を図るために試験の動物種はラットに統一し、用量と血漿中のコリンエステラーゼ活性を計測した慢性毒性試験のみとした。

用いた数理モデルは以下の 4 つである。

Model 1:  $\text{response} = a \cdot \exp(b \cdot \text{dose})$

Model 2:  $\text{response} = a \cdot \exp(b \cdot \text{dose}^d)$

Model 3:  $\text{response} = a [c - (c - 1) \cdot \exp(-b \cdot \text{dose})]$

Model 4:  $\text{response} = a [c - (c - 1) \cdot \exp(-b \cdot \text{dose}^d)]$

(a: background level, b: slope or potency, c: high dose level, d: shape)

当てはまりの良さは赤池情報量基準 (Akaike's Information Criterion: AIC) で評価した。

### 2.2 分子軌道法等による化学物質の電子的性質等 QSAR モデルに必要な物性パラメータの計算

まず初期段階として毒性予測モデルの説明変数に有機リン化合物の分子量、モル体積、疎水性 (log Kow)、二面角に準ずる回転によって定義されるコリンエステラーゼのセリン残基との反応部位の柔軟性の 4 つを検討した。

疎水性は実測値のあるものは実測値を使用し、実測値のないものは物性予測シミュレーションソフト EPI suite を用いて算出した。

セリン残基との反応部位の柔軟性の計算は量子

化学計算ソフト Gaussian 03 を用いて非経験的分子軌道計算によって求めた。分子軌道法とは分子系の電子の状態に対するシュレディンガー方程式を近似的に解く方法である。Mastrantonio ら(2008)は有機リン化合物とセリン残基の結合親和性が二面角に準ずる回転によって定義される配座エネルギーの変化量と関係があると報告し、コリンエステラーゼ阻害定数と相関していることを見つけた<sup>4)</sup>。このパラメータを QSAR モデルに用いることができれば、分子軌道計算による算出が可能であるため、実験を必要せず、分子軌道法の知識と技術があれば比較的容易に得ることができる。

分子軌道計算において、初めに物性パラメータを計算するための安定構造を探すため構造最適化計算を行った。構造最適化計算の手順は以下のようなものである。初期構造を適当に配置し、構造最適化計算を行い、計算が収束した後に振動解析を行う。振動解析結果に負の値があればもう一度初期構造を変化させ、同手順を繰り返す。振動解析結果に負の値がないことを確認できればそれを安定構造とした。

配座エネルギーの変化量は安定構造の有機リン化合物のリン原子とリン原子に隣接する原子の二面角を変化させながらそのエネルギーの変化量を追うことによって算出することができる。本解析では計算コスト削減のため基底関数は最小基底系である STO-3G を用いた。

図 1 は農薬・殺虫剤用途に使用される有機リン化合物メタミドホスの構造である。リン原子と隣接する 3 つの原子の二面角 ( $\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3$ ) を回転させながら、その時の安定構造に対するエネルギーの相対値を算出し、プロットすると図 2 のようになる。ここで、二面角 ( $\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3$ ) の回転に準ずる相対エネルギーの合計を阻害時の活性部位の柔軟性を表すパラメータとした。つまりエネルギーが低いほど柔軟であり、回転が容易である。表 1 のように二面角  $\varphi_1$  の柔軟性が最も高く、反応活性が最も高いと考えられる。そして二面角 ( $\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3$ ) の相対エネルギーの和 (式(1)) を毒性予測モデルのためのパラメータとした。

以上のような方法で、毒性予測モデル作成のためのインプットデータとして使用するすべての物質の相対エネルギーの和を分子軌道法により算出した。

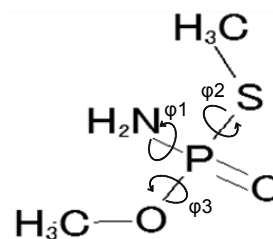


図 1 メタミドホスの構造と活性部位の二面角

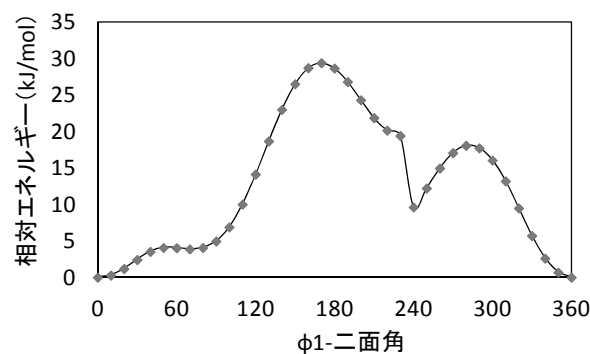


図 2 メタミドホスの二面角 ( $\varphi_1$ ) に準ずる相対エネルギーの変化

表 1 各二面角に準ずる回転時の相対エネルギーの合計

二面角	相対エネルギーの合計 (kJ/mol)
$\varphi_1$	103.4
$\varphi_2$	217.1
$\varphi_3$	463.8

$$\text{Flexibility} = \sum_{i=1}^{36} \text{Relative energy}_{\varphi_{1 \times i}} + \sum_{i=1}^{36} \text{Relative energy}_{\varphi_{2 \times i}} + \sum_{i=1}^{36} \text{Relative energy}_{\varphi_{3 \times i}} \quad (\varphi_1, \varphi_2, \varphi_3 = 10) \quad (1)$$

### 2.3 物性パラメータと毒性情報との間の多変量解析に基づく QSAR モデルの提示

本研究で開発する毒性予測モデルは物性パラメータと毒性情報との間の多変量解析に基づいている。応答変数である毒性値には用量反応解析から得られたラットの血漿中のコリンエステラーゼ活性 30%阻害用量の対数值とした。30%阻害レベルの選定理由は 2.4 節にあるとおり、ヒトの用量反応関係の閾値として設定したからである。応答変数と説明変数 (活性部位の柔軟性、疎水性 (log Kow)、分子量、モル体積) との間にどれだけの相関があるかを調べるため Kolmogorov-Smirnov 検

定において正規性の検定を行った後、ピアソンの積率相関係数による無相関検定を行い、説明変数間に相関がないかも調べた。また、すべての説明変数の誤差が正規分布であることが確認できたため（有意水準 5%）、最小二乗法を用いた直線モデルによる重回帰分析を行った。

## 2.4 疫学情報を用いた動物試験結果のヒト健康へ影響への外挿方法の検討

本研究で予測する毒性レベルは動物試験レベルである。これは疫学情報が非常に限られており、疫学情報から得られる毒性値を応答変数として採用することが困難だったためである。しかし、本研究の目的はヒトの健康リスクを定量化するための毒性値を算出することであるため、コリンエステラーゼ阻害に関する疫学情報から得られる毒性値と同物質の動物試験から得られる毒性値の比をとり、その比をラットと人の感受性の差とし、動物試験レベルの結果をヒト健康レベルの用量反応関係に外挿した<sup>5)</sup>。また、個人のコリンエステラーゼ活性と症状の関係を調べた疫学調査<sup>6)</sup>から症状と重篤度を結びつけ<sup>7)</sup>、用量反応関係として体重あたりの平均一日曝露量とその量の曝露を生涯続けた時の DALY との関係を示した。また、感受性の個人差を表現するため、非発がん影響の感受性の個人差のデフォルト分布を用いた<sup>8)</sup>。

## 3. 結果

### 3.1 毒性予測モデルの作成のための重回帰分析結果

AIC が最も小さいモデルは、説明変数を活性部位の柔軟性、疎水性 (log Kow) の二変数としたときであった ( $R^2=0.55$ )。

### 3.2 有機リン化合物曝露による用量反応関係

図 3 に 2.4 節の方法で外挿した農薬用途の有機リン化合物アセフェートの用量反応関係を示す。食品安全委員会農薬専門調査会はアセフェートの一日摂取許容量 (Acceptable Daily Intake : ADI) を 0.0024 mg/kg/day と設定した<sup>9)</sup>。もしこの ADI ぎりぎりの曝露量を摂取し続けたとすると、図 3 の用量反応関係からアセフェートによる健康リスクは  $1.1 \times 10^{-25}$  DALY であると計算できる。つまり、曝露量が ADI 以下であれば、健康を損なうことはほとんどないことがわかる。

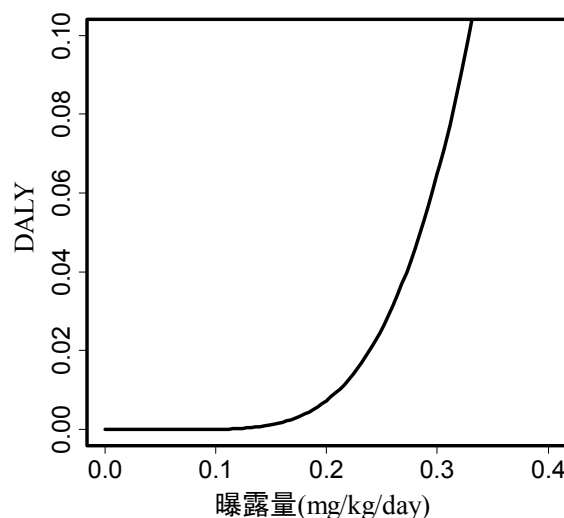


図 3 アセフェートの用量反応関係

## 4. まとめ

本稿では、定量的健康リスク評価のためのコリンエステラーゼ活性阻害に関する有害性予測モデルの開発の予備的な検討を行った。以下に本解析で明らかとなった結論と課題をまとめる。

### 4.1 分子軌道計算における結論と課題

本研究では Gaussian 03 を用いる前に、フリーソフトウェアである PC GAMESS を用いて同様の計算を行ったが、柔軟性を定量するための計算において回転時の座標変換に問題があり、途中で計算エラーを吐き出すことが多く見られた。また、同様の計算を行っても Gaussian の方が圧倒的に計算速度が速いため、回転時のエネルギー計算を行う際は Gaussian が推奨される。また、本解析では、計算コスト削減のため、基底関数に最小基底関数を採用したが、今後はさらに高い計算精度を得るため、基底関数の拡張を行う必要がある。

### 4.2 毒性予測モデルの結論と課題

活性部位の回転時のエネルギーの変化で表した柔軟性は慢性毒性値と良い相関があることがわかった。しかし、毒性値を精度よく予測できるほどではなく、さらなる説明変数の探索が必要である。本解析ではデータセットの数が少なく、説明変数の数を増やすことができなかった。今後、さらに毒性情報を収集することで、データセットの数を増やすことができれば、説明変数の数を増やし、予測精度をあげることができると考えられる。また、用量反応解析や多変量解析の不確実性も出来

る限り明示的に扱い、リスク評価に有用な毒性予測モデルの開発を行う予定である。

#### 4.3 有機リン化合物の曝露に伴うヒト用量反応関係の記述の結論と課題

有機リン化合物曝露によるヒト健康を調査した疫学情報を用いて動物実験レベルで予測される毒性値についてDALYを指標としたヒト健康レベルの用量反応関係に外挿した。本解析結果を利用すれば、毒性情報が未知の物質であっても、曝露情報と物性パラメータのみが得られれば、3.2節の結果のような定量的な健康リスク評価が可能である。

本解析ではラットからヒトへの外挿においてクロルピリホスの動物実験データと疫学データを用いた<sup>5)</sup>。今後は疫学情報をさらに収集し、ラットとヒトの感受性の差を明確する。また、コリンエステラーゼ活性低下によって観察されている症状と重篤度(QOLの低下)の関係の妥当性も詳細に検討する必要がある。

#### 謝辞

本研究は、平成24年度経済産業省・リスク評価に係る新規課題等の委託事業による助成を受けました。ここに記して感謝します

#### 参考文献

- 1) Sakuratani, Y. et al. (2008). "Category analysis of the substituted anilines studied in a 28-day repeat-dose toxicity test conducted on rats: Correlation between toxicity and chemical structure." SAR and QSAR in Environmental Research **19**(7-8): 681-696.
- 2) Guo, J.-X. et al. (2006). "Mechanistic Insight into Acetylcholinesterase Inhibition and Acute Toxicity of Organophosphorus Compounds: Molecular Modeling Study." Chemical Research in Toxicology **19**(2): 209-216.
- 3) 日本難燃剤協会 (2004). リン系難燃剤の相対的毒性の概要.  
URL: <http://www.frcj.jp/siryo/rin/data03.html>.
- 4) Mastrantonio, G. et al. (2008). "Interpretation of the mechanism of acetylcholinesterase inhibition ability by organophosphorus compounds through a new conformational descriptor. an experimental and theoretical study." Journal of Molecular Modeling **14**(9): 813-821.
- 5) U.S.EPA (2009). "CHLORPYRIFOS NONGUIDELINE STUDY TYPE: REPEAT DOSE ORAL TOXICITY - HUMAN." DATA EVALUATION RECORD-SUPPLEMENTAL-DRAFT 5/26/09.
- 6) Ohayo-Mitoko. et al. (2000). "Self reported symptoms and inhibition of acetylcholinesterase activity among Kenyan agricultural workers." Occupational and Environmental Medicine **57**(3): 195-200.
- 7) RIVM (2008). Health impact assessment of policy measures for chemicals in non-food consumer products. URL: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/320015001.pdf>
- 8) Huijbregts, M. A. et al. (2005). "Human-toxicological effect and damage factors of carcinogenic and noncarcinogenic chemicals for life cycle impact assessment." Integrated Environmental Assessment and Management **1**(3): 181-244.
- 9) 食品安全委員会農薬専門調査会 (2010). "農薬評価書アセフェート."