

N-allylmethyl amine : ほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

(試験番号 IET 07-0086)

最終報告書

1. 要約

チャイニーズハムスター肺由来の CHL/IU 細胞株を用いて、ラット薬物代謝活性化系 (S9 mix) 存在下および非存在下で N-allylmethyl amine のほ乳類培養細胞に対する染色体異常誘発性の有無を検索した。

N-allylmethyl amine は生理食塩液に溶解させて用いた。短時間処理法による染色体異常試験では、S9 mix 存在下および非存在下で被験物質を 6 時間処理し、処理 18 時間後に染色体標本作製した。N-allylmethyl amine の用量は細胞増殖抑制試験の結果より、代謝活性化系の有無にかかわらず、178, 355, 710 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 3 用量を設定した (710 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は 10 mM に相当)。染色体観察の結果、いずれの用量においても異常細胞の有意な増加は認められなかった。また、倍数体の出現頻度も有意な増加は認められなかった。

連続処理法では、S9 mix 非存在下で N-allylmethyl amine を 24 時間連続処理した後、染色体標本作製した。細胞増殖抑制試験の結果より、88.8, 178, 355, 533 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 用量を設定した。染色体観察の結果、いずれの用量においても異常細胞の有意な増加は認められなかった。また、倍数体の出現頻度も有意な増加は認められなかった。

一方、マイトマイシン C またはベンツ(a)ピレンを処理した陽性対照群における異常細胞の出現頻度は、溶媒対照群に比べて有意に高かった。また、溶媒対照群における異常細胞の出現頻度は 5% 以下であった。よって、試験の有効性が確認された。

以上の結果から、チャイニーズハムスター CHL/IU 細胞株を用いた本実験条件下において、N-allylmethyl amine は代謝活性化系の有無にかかわらず構造的染色体異常を誘発しないものと結論した。

2. 試験目的

N-allylmethyl amine のチャイニーズハムスター培養細胞における染色体異常誘発性の有無を検索した。

3. 被験物質

名称：	N-allylmethyl amine
化学式：	C ₄ H ₉ N
CAS No.：	627-37-2
ロット番号：	01824BD
分子量：	71.12
純度：	96% (非GLP値)
性状：	透明液体
密度：	0.748 g/cm ³
引火点：	-8 °C
保存条件：	冷蔵暗所

4. 試験材料および方法

4.1. 供試細胞

チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 CHL/IU¹⁾ (1984年1月12日, 国立医薬品食品衛生研究所より11代目で入手, 染色体モード25本, 倍加時間は約15時間) を用いた。細胞株 CHL/IU は染色体異常試験で汎用されているほ乳類培養細胞で, 当研究所でも豊富な背景データを蓄積しているため本細胞を選定した。細胞は性状変化防止のために, 液体窒素中 (-196°C) で保存されており, マイコプラズマに汚染されていないことが確認された継代数14の細胞を解凍して試験に用いた。

4.2. 細胞培養条件

供試細胞は, 37°C, 5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガス恒温培養装置中で組織培養用60または100 mmプレート (FALCON[®], Becton Dickinson Labware, NJ., U.S.A.) を用いて無菌的に培養した。培地は, 10%の割合で非働化した新生仔牛血清 (Lot No. ASC29136, HyClone Laboratories, Inc., UT, U.S.A.) を含む MEM 培地 (Gibco[®], Invitrogen Corp., CA, U.S.A.) に, ペニシリン-ストレプトマイシン (100 IU/mL - 100 µg/mL, Gibco[®]) および L-グルタミン (2 mM, Gibco[®]) を添加したものをを用い, 継代時には 0.25% トリプシン溶液 (Gibco[®]) を用いて細胞をプレートより剥離した。

4.3. 被験物質溶液の調製

被験物質は水に易溶であるため, 生理食塩液 (大塚生食注, 株式会社大塚製薬工場, 徳島県)

を溶媒として用いた。試験の直前に最高濃度を調製し、それより低濃度の溶液は段階希釈法により調製した。溶解後、色、臭いの変化は認められなかったが弱い発熱（溶解熱）が認められた。なお、純度補正は行わなかった。また、被験物質溶液添加後の培地中における生理食塩液の最終濃度は1%(v/v)とした。

4.4. 陽性対照

非代謝活性化系における陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC, マイトマイシン注用 2 mg, 2 mg 力価/アンプル, Lot No. 480AEL, 協和醗酵工業株式会社, 東京都) を用い、生理食塩液に 10 µg/mL の濃度で溶解させた。代謝活性化系における陽性対照物質としてベンツ(a)ピレン (B(a)P, 特級, 99.8%, Lot No. ELE2013, 和光純薬工業株式会社) を用い、ジメチルスルホキシド (DMSO, 特級, >99.0%, 東京化成工業株式会社, 東京都) に 4 mg/mL の濃度で溶解させた。調製した陽性対照物質溶液は小分けして冷凍保存 (-80°C) し、処理直前に解凍して使用した。

4.5. S9 mix の調製

代謝活性化系として S9 mix を用いた。代謝酵素誘導物質であるフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボン投与されたラットの肝臓ホモジネート 9000×g 上清分画 (S9) をキッコーマン株式会社 (千葉県) より購入した。購入後、-80°C 超低温槽 (CL-422, 日本フリーザー株式会社, 東京都) に保存した。製造後 6 カ月以内の S9 分画 (Lot No. RAA-567) を試験直前に解凍し、直ちにコファクター (Lot No. 999702, オリエンタル酵母工業株式会社, 東京都) を加えて、以下の組成となるように S9 mix を調製した。

塩化マグネシウム	8 mM
塩化カリウム	33 mM
グルコース-6-リン酸	5 mM
NADH	4 mM
NADPH	4 mM
ナトリウム-リン酸緩衝液 pH 7.4	100 mM
S9 分画	30%

4.6. 染色体異常試験の種類

短時間処理法と連続処理法による染色体異常試験を行った。短時間処理法では、代謝活性化系 (S9 mix) 存在下および非存在下で 6 時間処理した。連続処理法では代謝活性化系非存在下で 24 時間処理した。試験に用いる用量は、本試験に先立って各処理法による細胞増殖抑制試験を行って決定した。

4.7. 細胞増殖抑制試験

溶解性検査を行ったところ、被験物質は生理食塩液に易溶であった。したがって、細胞増殖抑制試験の最高用量は $710 \mu\text{g/mL}$ (10 mM)²⁾ とし、公比 2 で 9 用量 (2.8, 5.5, 11.1, 22.2, 44.4, 88.8, 178, 355, $710 \mu\text{g/mL}$) を設定した。さらに被験物質処理群と同じ容量の生理食塩液を添加した溶媒対照群を設定した。試験は各用量あたり 2 枚のプレートを用いた。

4.7.1. 短時間処理法

CHL/IU 細胞を 1.5×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 60 mm プレート (培地量 5 mL) に播種した。約 48 時間培養後、代謝活性化系では、S9 mix を含む培地 (新鮮な培地 : S9 mix = 5 : 1) 3 mL と交換した後、各濃度の被験物質溶液を $30 \mu\text{L}$ 添加した。一方、非代謝活性化系では、新鮮な培地 3 mL と交換した後、各濃度の被験物質溶液を $30 \mu\text{L}$ 添加した。6 時間後に培地を取り除き、PBS(-)で細胞を洗浄後、新鮮な培地に交換してさらに 18 時間培養した。いずれの方法においても培養終了後、培地を捨て、10%ホルマリン液で 10 分間固定し、0.1%クリスタルバイオレット溶液にて 10 分間室温で染色した。染色後、単層培養細胞密度計 (オリンパス光学株式会社、東京都) を用いて細胞密度を計測し、溶媒対照群に対する細胞増殖率を求めた。

4.7.2. 連続処理法

CHL/IU 細胞を 1.5×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 60 mm プレート (培地量 5 mL) に播種した。約 48 時間培養後、各濃度の被験物質溶液を $50 \mu\text{L}$ 添加し、24 時間連続処理した。処理終了後、短時間処理法と同様に細胞を固定、染色し、単層培養細胞密度計を用いて細胞密度を計測した。

4.8. 染色体異常試験

4.8.1. 短時間処理法

CHL/IU 細胞を 1.5×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 60 mm プレート (培地量 5 mL) に播種し、約 48 時間培養した。代謝活性化系では S9 mix を含む培地 (新鮮な培地 : S9 mix = 5 : 1) 3 mL と交換した後、被験物質溶液を添加した。一方、非代謝活性化系では新鮮な培地 3 mL と交換した後、被験物質溶液を添加した。用量は、細胞増殖抑制試験の結果に基づき、両処理法ともに 178, 355, $710 \mu\text{g/mL}$ の 3 用量を設定した。溶媒対照群には被験物質溶液の調製に用いた生理食塩液を添加した (最終培地濃度 1%(v/v))。陽性対照群には MMC 溶液 (最終培地濃度 $0.1 \mu\text{g/mL}$, 非代謝活性化系) または B(a)P 溶液 (最終培地濃度 $40 \mu\text{g/mL}$, 代謝活性化系) を添加した。なお、培地への添加量は被験物質処理群、溶媒対照群、および陽性対照群のすべてのプレートにおいて $30 \mu\text{L}$ であった。

処理開始から 6 時間後に処理培地を取り除き、PBS(-)で細胞を 2 回洗浄した。新鮮な培地に交換してさらに 18 時間培養した後、染色体標本を作製した。試験は各用量あたり 2 枚のプレートを用いて行った。

同時に各用量における細胞毒性を評価するためサテライト群を設けた。サテライト群に用いたプレート、播種細胞数、培地量および処理方法などは本群と同一であった。固定から細胞増殖率の測定までは細胞増殖抑制試験の場合と同様の手順で行った。サテライト群も各用量あたり2枚のプレートを用いた。

4.8.2. 連続処理法

CHL/IU 細胞を 1.5×10^5 個/プレートの割合で組織培養用 60 mm プレート (培地量 5 mL) に播種し、約 48 時間後に被験物質溶液を添加した。用量は細胞増殖抑制試験の結果に基づき、88.8, 178, 355, 533 $\mu\text{g/mL}$ の 4 用量を設定した。溶媒対照群には被験物質溶液を調製した生理食塩液 (最終培地濃度 1%(v/v)) を添加した。陽性対照群には MMC 溶液 (最終培地濃度 0.1 $\mu\text{g/mL}$) を添加した。なお、培地への添加量は被験物質処理群、溶媒対照群、および陽性対照群のすべてのプレートにおいて 50 μL であった。染色体標本は投与液添加から 24 時間後に作製した。試験は各用量あたり2枚のプレートを用いて行った。

同時に各用量における細胞毒性を評価するためサテライト群を設けた。サテライト群に用いたプレート、播種細胞数、培地量および処理方法などは本群と同一であった。固定から細胞増殖率の測定までは細胞増殖抑制試験の場合と同様の手順で行った。サテライト群も各用量あたり2枚のプレートを用いた。

4.9. 染色体標本の作製および染色

染色体標本の作製は通常空気乾燥法に従って行った。細胞分裂を中期で止めるため、標本作製の2時間前にコルセミド(和光純薬工業株式会社)を最終濃度 0.2 $\mu\text{g/mL}$ で培地中に添加した。細胞は 0.25% トリプシン溶液で剥がした後、0.075 M 塩化カリウム水溶液で約 15 分間室温で低張処理した。カルノア固定液 (メタノール : 酢酸 = 3 : 1) を用いて固定した後、各プレートあたり2枚のスライドガラスに滴下し、空気乾燥させた。作製した染色体標本は、暗号化したコード番号を付し、2% ギムザ液 (メルク社製ギムザ液を pH 6.8 リン酸緩衝液で希釈) で 15 分間 (室温) 染色した。

4.10. 染色体異常の分析

染色体構造異常については、各プレートあたり 100 個、各用量あたり 200 個の良く広がった中期分裂像を顕微鏡下 1000 倍で観察した。観察対象細胞としては染色体数が 25 ± 2 本の細胞とした。染色体の数的異常については、各用量あたり 200 個の分裂中期細胞について観察し、倍数体の出現数を記録した。倍数体についてはその染色体数を記録した。

染色体異常は以下の基準に従って分類した。

4.10.1. 構造的染色体異常

① ギャップ (g)

姉妹染色分体上の同一部位または片方の染色分体上の非染色性部分の内、その長さが染色分体幅より短く、染色分体中軸線がずれていないもの。

② 染色分体型切断 (ctb)

染色分体中軸線がずれた異常、または片方の染色分体上の非染色性部分の長さが染色分体幅より長い異常。染色分体型の断片も含む。

③ 染色分体型交換 (cte)

異なる染色体間で複数の切断点が誤って再結合した異常 (染色体間交換)、または同一染色体内で複数の切断点が誤って再結合した異常 (染色体内交換)。

④ 染色体型切断 (csb)

姉妹染色分体上の同一部位における切断で、染色分体中軸線がずれた異常、または姉妹染色分体上の同一部位における非染色性部分の長さが染色分体幅よりも長い異常。染色体型の断片も含む。

⑤ 染色体型交換 (cse)

多動原体染色体および染色体型環。

⑥ 断片化 (fragmentation)

1 個の中期分裂像に多数の切断やギャップが存在する異常。便宜上、異常数 1 として記録。

⑦ その他 (others)

複合型染色体異常など。

4.10.2. 数的染色体異常

数的染色体異常のうち倍数性についてのみ観察対象とした。CHL/IU 細胞の染色体数のモードは 25 本であるため、その半数性の 3 倍以上の染色体数 (37 本以上) を有する中期分裂像を倍数体として記録した。倍数体の一つに核内倍加も含めた。

4.11. 試験の有効性

被験物質の染色体異常誘発性の判定を行う前に、各試験の有効性の確認を行った。試験成績が以下の基準に合致していれば、その試験は有効とした。

- ① 溶媒対照群において、構造的および数的染色体異常を有する細胞の出現頻度が 5%以下である。
- ② 陽性対照群において、構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度が溶媒対照群と比べて有意に高い。

4.12. 統計学的解析

構造的染色体異常を有する細胞の出現数（ギャップを除く）および倍数体の出現数について、被験物質処理群と溶媒対照群との間でカイ二乗検定を行った。有意水準は5%以下に設定した。

4.13. 結果の判定

染色体異常誘発性の判定は構造的染色体異常と数的染色体異常に分けて行った。被験物質のいずれの用量においても、染色体異常を有する細胞の出現頻度（構造的染色体異常の場合はギャップを除く）に有意な増加が認められない場合、陰性と判定した。一方、染色体異常を有する細胞の出現頻度に統計学的に有意な増加と用量相関性が認められた場合、陽性と判定した。最終的な評価は、試験責任者が細胞毒性、異常誘発頻度等を参考に生物学的意義を十分考慮した上で総合的に行った。

5. 試験結果および考察

5.1. 細胞増殖抑制試験

細胞増殖抑制試験の結果を Table 1 に示し、被験物質の用量と細胞増殖率との関係を Figure 1 に示す。

短時間処理法では両処理法ともに高用量群で弱い細胞毒性が見られたが、溶媒対照群に対して 50%を超える細胞増殖抑制は認められなかった。一方、連続処理法では最高用量 (710 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 50%以上の細胞増殖抑制を示した。

以上の結果から、各処理による染色体異常試験の用量を次のように設定した。

短時間処理法 (非代謝活性化系) :	178, 355, 710 $\mu\text{g}/\text{mL}$
短時間処理法 (代謝活性化系) :	178, 355, 710 $\mu\text{g}/\text{mL}$
連続処理法 (24 時間) :	88.8, 178, 355, 533 $\mu\text{g}/\text{mL}$

なお、178 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量では被験物質溶液添加後、培地の色が濃いピンク (pH の上昇) に変化した。6 時間後 (短時間処理法) または 24 時間後 (連続処理法) には培地の色は溶媒対照群と同様の色に戻っていた。

5.2. 短時間処理法による染色体異常試験

短時間処理法の非代謝活性化系における結果を Table 2 に示し、代謝活性化系における結果を Table 3 に示す。

両処理法ともに、すべての用量において被験物質溶液添加後、培地の色が濃いピンク (pH の上昇) に変化した。6 時間後には培地の色は溶媒対照群と同様の色に戻っていた。

非代謝活性化系および代謝活性化系における構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度は、それぞれ 0%~1.0% および 0.5%~1.0% (ギャップを除く) の範囲であり、いずれの用量においても有意な増加は認められなかった。また、倍数体の出現頻度に関しても両処理法ともに有意な増加は認められなかった。

一方、MMC または B(a)P を処理した陽性対照群では、構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度が溶媒対照群と比べて有意に高かった。また、溶媒対照群における構造的および数的染色体異常を有する細胞の出現頻度は 5%以下であった。したがって、短時間処理法による本試験の有効性が確認された。

5.3. 連続処理法による染色体異常試験

連続処理法による結果を Table 4 に示す。

178 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の用量において被験物質溶液添加後、培地の色が濃いピンク (pH の上昇) に変化した。24 時間後には培地の色は溶媒対照群と同様の色に戻っていた。

構造的染色体異常を有する細胞の出現頻度は 0%~3.0% (ギャップを除く) であり、いずれの用量においても溶媒対照群に比べて有意な増加は認められなかった。また、倍数体の出現頻度に

関しても、有意な増加は認められなかった。

一方、MMC を処理した陽性対照群では、構造的染色体を有する細胞の出現頻度が溶媒対照群と比べて有意に高かった。また、溶媒対照群における構造的および数的染色体異常を有する細胞の出現頻度は5%以下であった。したがって、連続処理法による本試験の有効性が確認された。

6. 結論

以上の結果より、チャイニーズハムスター肺由来の CHL/IU 細胞株を用いた本実験条件下において、N-allylmethyl amine は代謝活性化系の有無にかかわらず構造的染色体異常を誘発しないものと結論した。

7. 予見することができなかった試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある事態および試験計画書に従わなかったこと

試験期間を通じ、試験計画書からの逸脱は認められなかった。また、試験の信頼性に悪影響を及ぼした疑いのある諸要因（環境要因、予期しえなかった事態等）は認められなかった。

8. 参考文献

- 1) Koyama, H. et al., A new cell line derived from newborn Chinese hamster lung tissue. *Gann*, 61 : 161-167 (1970)
- 2) Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M. and Matsuoka, A., Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan, *Fd. Chem. Toxic.*, 22: 623-636 (1984)

Leadscope Prediction Data Minerを用いた肝毒性予測モデルの構築

CTCラボラトリーシステムズ株式会社
ライフサイエンス営業技術部
作成者： 石和 俊

目次

1. 作業目的	140
2. 対象化合物	140
3. 作業報告	141
3-1. 毒性試験データに連続値を用いた場合の予測モデル構築	141
3-1-1. トレーニングデータセットの準備	141
3-1-2. トレーニングデータセットの読み込み	141
3-1-3. 予測モデル構築手順	145
3-1-4. 予測モデル構築結果	146
3-1-5. 肝毒性が陰性の化合物のみを除いたデータセットに基づく予測モデルの構築	148
3-1-6. 予測モデル構築結果	148
3-1-7. 予測モデル適用方法の検討	151
3-2. 毒性試験データにバイナリ値を用いた場合の予測モデル構築	154
3-2-1. トレーニングデータセットの読み込み	154
3-2-2. 予測モデルの構築	157
条件1: Default条件でのモデル構築結果 (Liver_conv) :	157
条件2: Featuresを選択した条件でのモデル構築結果 (Liver_conv) :	158
条件3: Default条件でのモデル構築結果 (Liver_conv2) :	160
条件4: FeaturesをManualで取捨選択した条件でのモデル構築結果 (Liver_conv2) :	161
条件5: 条件4に対してMean liver_convが0.1~0.6となるFeaturesを削除(Liver_conv2)	162
3-2-3. 予測モデルのまとめ 1	165
3-4. GOT/GPT、肝重量のバイナリデータも考慮に入れたモデルの構築	166
3-4-1. Liver、GOT/GPT、肝重量のバイナリデータファイルの作成	166
3-4-2. トレーニングデータセットの読み込み	166
3-4-3. 予測モデルの構築	167
条件6: Liver, GOT/GPT, Weight_Liverデータの組み合わせ	167
条件7: 条件6に対してMean LGWが0.3-0.6となるFeaturesを除外	169
条件8: LiverとGOT/GPTデータの組合せ	171
条件9: LiverとGOT/GPTデータの組合せ	172
条件10: LiverとGOT/GPTデータの組合せ	173
条件11: LiverとGOT/GPTデータの組合せ	175
条件12: LiverとWeight_Liverデータの組合せ	177
条件13: LiverとWeight_Liverデータの組合せ	177

条件14: LiverとWeight_Liverデータの組合せ.....	180
条件15: 条件7のモデルで陽性と予測された化合物群からの予測モデルの作成.....	181
3-4-4.予測モデルのまとめ 2	184
3-5. 条件4のモデルと条件7のモデルとの組合せモデルの予測精度の検討.....	185
3-6. モデル適用範囲の検討.....	187
3-6-1. 条件4のモデル(Run#4)のLiver_conv2に対する適用範囲の検討 :	188
3-6-2. 条件4のモデル(Run#4)のLGWに対する適用範囲の検討	189
3-6-3. 条件7のモデル(Run#15)の適用範囲の検討 :	190
3-6-4. 条件4 のモデル(Run#4)の適用範囲の検討 :	191
4. 総括と今後の作業.....	192

1. 作業目的

Leadscope及びLeadscope Predictive Data Minerを用いて、28日間反復投与毒性試験のデータセットから、肝毒性・腎毒性のように各エンドポイントに対するQSAR予測モデルを構築する。

2. 対象化合物

◆ トレーニングデータセット

新規化合物 (808化合物)

化合物数	808	
データ	構造情報+毒性試験データ	
毒性試験データ	フィールド名	フィールドType
28日間済み	check_28day	Integer (1:28日間, 13:13週間, 26:26週間)
神経系	neuro	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
RBC/Hb	RBC/Hb	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
GOT/GPT	GOT/GPT	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
BUN/CRN	BUN/CRN	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
Cho/TG	Cho/TG	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
肝重量	Weight_Liver	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
腎重量	Weight_Kidney	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
肝臓	Liver	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
腎臓	Kidney	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
甲状腺	Thyroid	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
脾臓	Spleen	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
胸腺	Thymus	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
胃	Stomach	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
腸	Gut	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
精巣	Testis	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
心臓	Heart	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
副腎	Adrenal	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)
骨髄	bone	Real (高値=毒性強い、低値=毒性弱い)

- 前年度の作業で、808件の28日間反復投与毒性試験データの数値 (LOAEL値) をExcelに出力し、計算式「 $-\text{Log}(\text{数値})+4$ 」によりデータ値を変換した。
例) 1000 → 1、100 → 2
- データがブランクの場合は10000とし、変換後は0になるようにした。
- 変換後にISISデータベース「NIHS Ames database_New.db」を作成した。

3. 作業報告

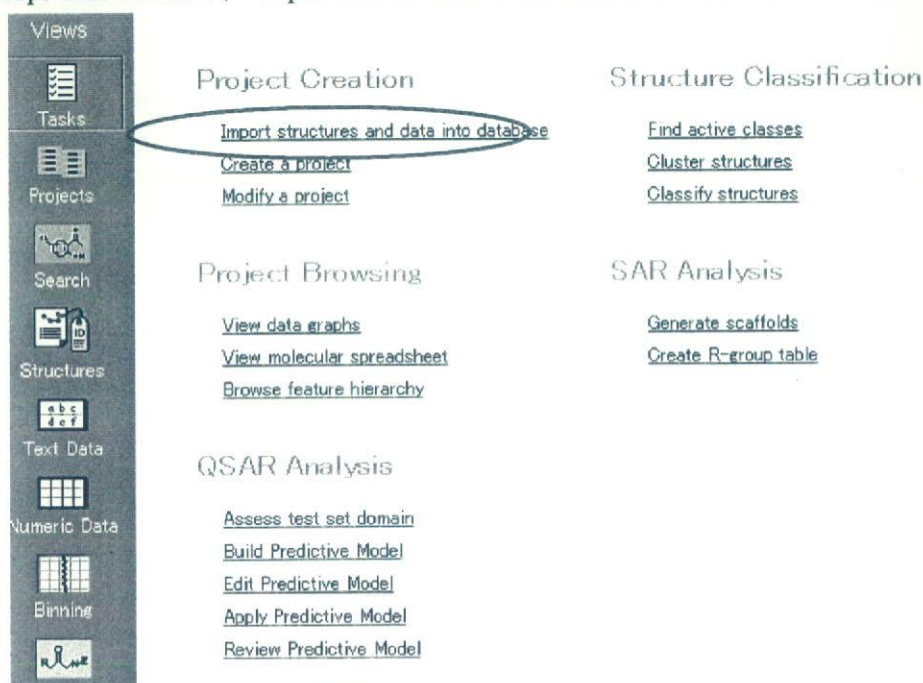
3-1. 毒性試験データに連続値を用いた場合の予測モデル構築

3-1-1. トレーニングデータセットの準備

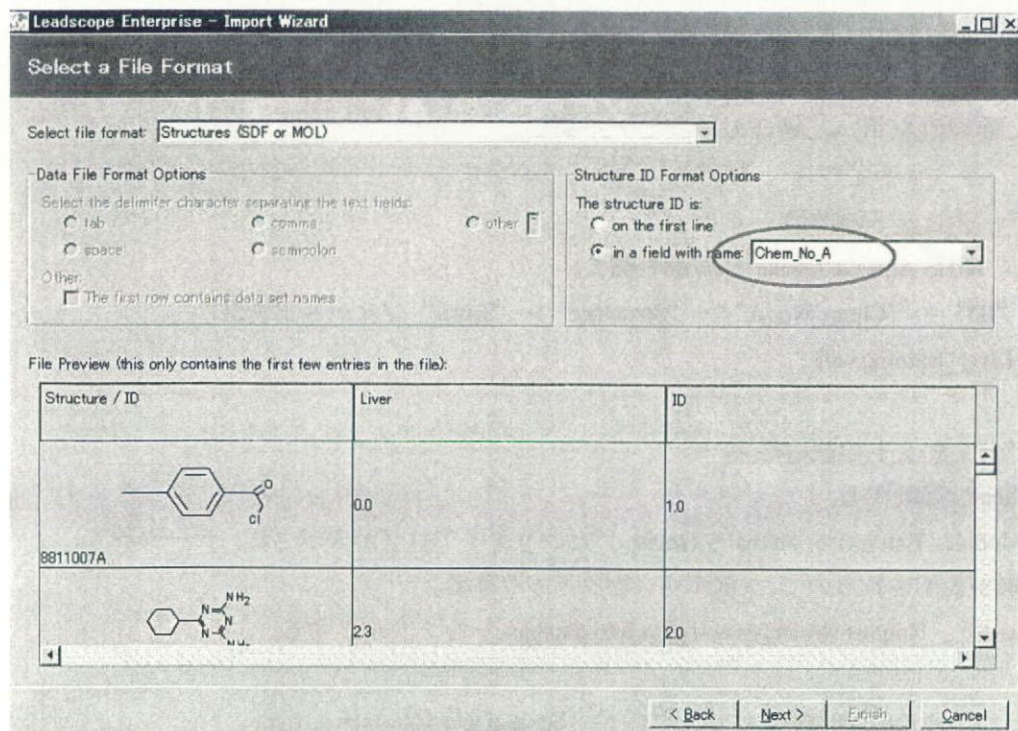
- (1) ISIS/Baseを起動し、NIHS Ames database_New.dbを開く。
- (2) 全件検索を行い、“ID”・“Chem_No_A”・“Structure”・“Liver”フィールドをSDファイルに出力した (Liver_training.sdf)。

3-1-2. トレーニングデータセットの読み込み

- (1) Leadscope Hosted Clientを起動する。
- (2) 起動中に“Content Modules Enterprise: animal:9 (secur...”というダイアログが表示され、データベース一覧の確認画面が表示されるので、**OK**ボタンをクリックする。
- (3) Leadscope Task Wizardで、“Import structures and data into database”をクリックする。



- (4) Welcome to the Import Wizard : **Next** ボタンをクリック。
- (5) Find the file or database you want to import, Import a file (SD file, Molfile, or text file) : Liver_Training.sdf を指定した。
- (6) Select a File Format : “Structure ID Format Options”にて”in a field with name”を選択し “Chem_No_A”をID番号として指定した。



(7) Select Content : インポートするデータ内容を確認し編集は行わずNextボタンをクリックした。

(8) Select Data Types : Liver=number, ID=numberに指定した。

(9) Edit Structure IDs : 編集は行わずNextボタンをクリックした。

(10) Edit Data : 編集は行わずNextボタンをクリックした。

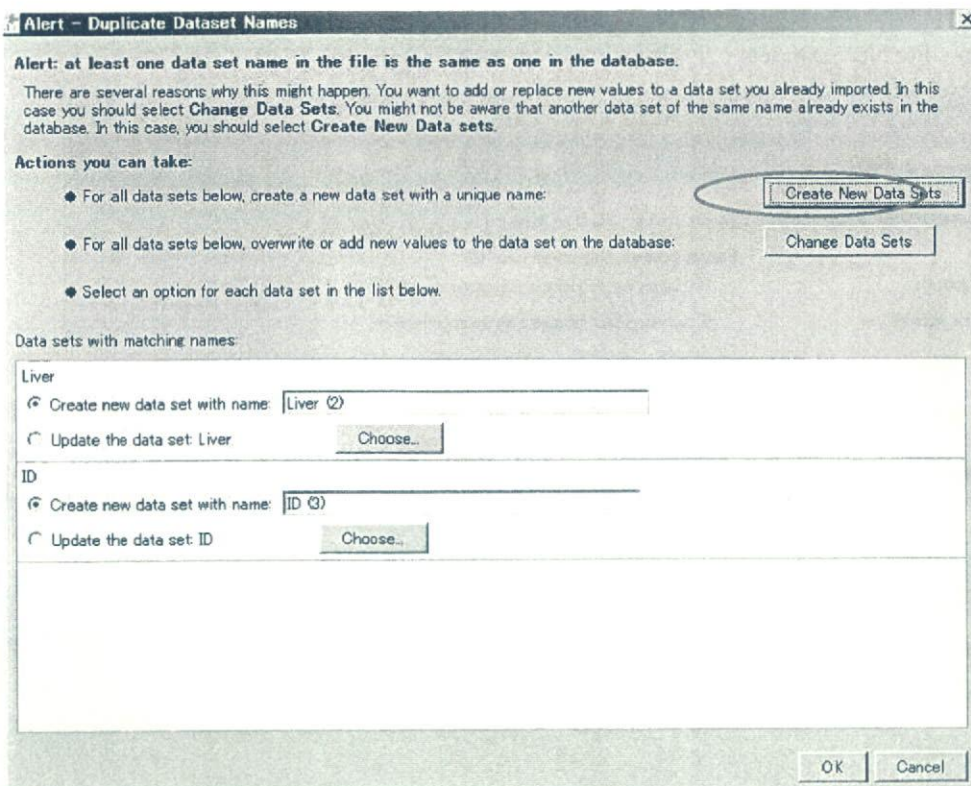
(11) Calculate New Numeric Datasets : 編集は行わずNextボタンをクリックした。

(12) Select a Database : Create a new Source ID:に “Liver_training” を指定した。

(13) Specify Target Folders : すべてuser defaultのまま、Nextボタンをクリックした。

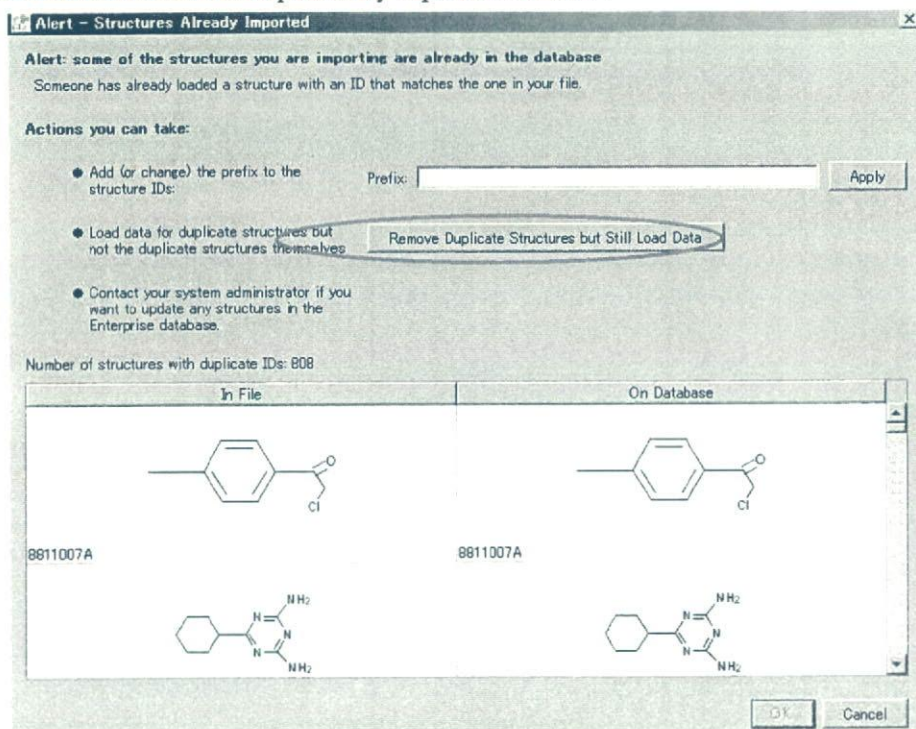
(14) Alert : conflicts with database :

At least one dataset name in the file in the same as one in the database. :



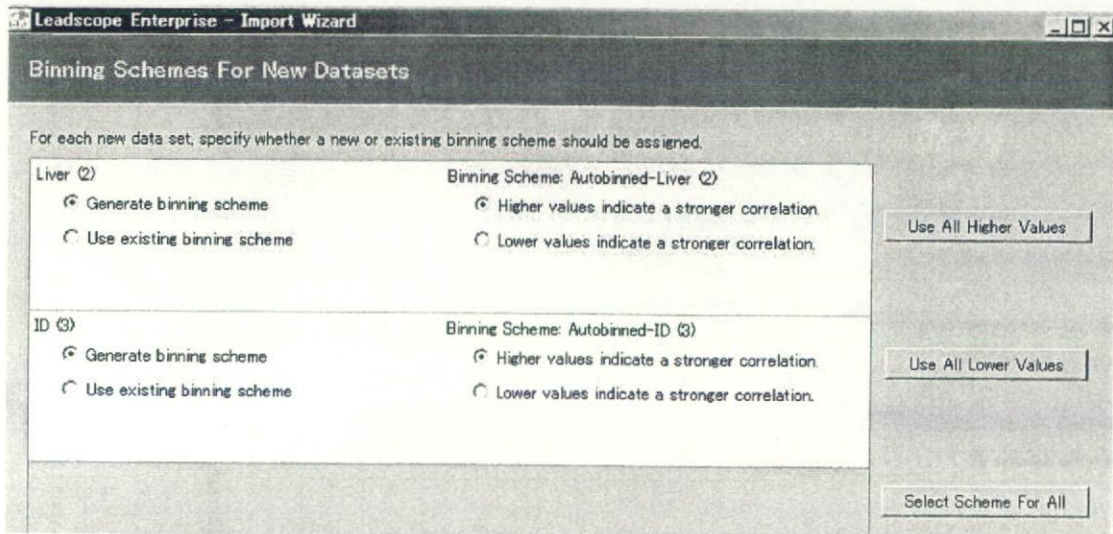
Create New Data Sets → **OK** クリック

Some structures in the file use IDs of previously imported structures :



Remove Duplicate Structures but Still Load Data → **OK**ボタンをクリック

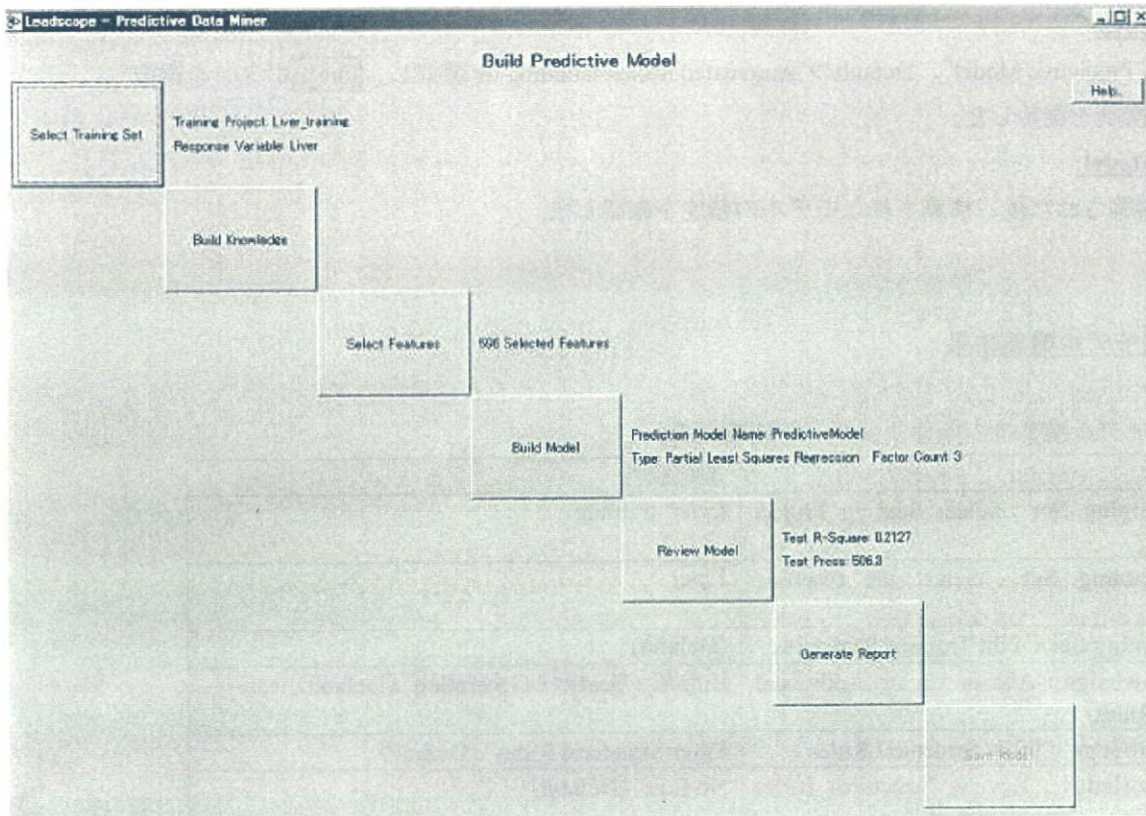
(15) Binning Schemes For New Datasets : 下記画面のように設定 (Default)



(16) Import Structures and Data : project名 “Liver_training” にして、**Finish**ボタンをクリックして、データのインポートを行った。

3-1-3. 予測モデル構築手順

- (1) Leadscope Task Wizardで、“Build Predictive Model” を選択した。
- (2) Predictive Data Miner画面で（下図）、各ステップにおいてモデル構築条件を選択してモデル構築を行った。



[手順]

① Select Training Set: (Scaffoldの作成)

Select Starting Project for Training: Projects -> Personal -> Liver -> “Liver_training” を選択。

Select Response Variable: Liver_training -> “Liver”を選択。

Edit Training Structures: Defaultのままで特に編集は行わずFinishボタンをクリックした。

Build Knowledge : Add or Create Additional Structural RulesでNewボタンをクリックした。

Enter Name for New Structural Rules: 作成するScaffoldの名称を“Scaffold Generation” (Default)として、Scaffoldの作成を開始した。

Filter Structural Rules: デフォルトの”Filter structural rules – Recommended (use Leadscope filter based on scaffold size, frequency, and z-score)”を選択した。

Review Structure Rule Templates: 編集は行わず、Finishボタンを選択。

②Build Knowledge:

Add or Create Additional Structural Rules: “Scaffold Generation”が追加されているのを確認して、ボタンをクリックした。

③Select Features:

Defaultの”Automated Feature Selection-Automatically select features”を選択。

④Build Model:

Model名 “Predictive Model”、Defaultの”Automated Model Building”を選択し、ボタンを選択してモデル構築を開始した。

⑤Review Model:

Modelが構築された後、構築されたモデルの精度を確認した。

3-1-4. 予測モデル構築結果

(1) 以下にモデル構築時の条件サマリーを記載する。

項目	選択条件
Select Training Set : Select Starting Project for Training	Liver_training
Select Training Set : Select the response variables	Liver
Select Training Set : Edit Training Structures	(Default)
Build Knowledge : Add or Create Additional Structural Rules	Rule名 : Scaffold Generation (Default)
Build Knowledge : Filter Structural Rules	Filter Structural Rules (Default)
Build Knowledge : Review Structures Rules Template	No Edit (Default)
Select Features :	Automated Feature Selection - Automatically select features (Default)
Build Model :	Automated Model Building (Default)

(2) 以下にModel構築の結果を記載した。

項目	選択条件
Build Knowledge	1 Rules (Scaffold Generation)
Select Features	596 Selected Features
Prediction Model Name	PredictiveModel
Type	Partial Least Squares Regression
Factor Count	3
Training Set Statistics: R-squares	0.462
Training Set Statistics: Press	346.0
Test Set Statistics: R-squares	0.213
Test Set Statistics: Press	506.0
Test Set Statistics: Std. Dev.	0.797