

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における  
(定量的) 構造活性相関((Q)SAR)に関する研究

総合研究報告書

1 / 2

主任研究者 本間正充

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関  
((Q)SAR)に関する研究

平成18年度～20年度 総合研究報告書

研究代表者 本間正充

平成21 (2009) 年4月

目 次

I. 総括・分担研究報告書	
化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)に関する研究	1
本間正充、林 真、江馬眞、鎌田 栄一、広瀬 明彦	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表(別添4)	63
III. 研究成果の刊行物・別冊	別紙2参照

厚生労働科学研究費補助金  
(化学物質リスク研究事業)

化学物質リスク評価における  
(定量的)構造活性相関((Q)SAR)に関する研究

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総合研究報告書

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)に関する研究

研究代表者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部	室長
研究分担者	林 真	(財)食品農医薬品安全性評価センター		技術総括部長
研究分担者	江馬 眞	(独)産業技術総合研究所	安全科学研究部門	招聘研究員
研究分担者	鎌田 栄一	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室	主任研究官
研究分担者	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室	室長
研究協力者	平田 睦子	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室	主任研究官
研究協力者	森田 健	国立医薬品食品衛生研究所	安全情報部	主任研究官
研究協力者	菅谷 芳雄	国立環境研究所	環境リスクセンター	主任研究官
研究協力者	宮地 繁樹	(財)化学物質評価研究機構	安全性評価技術研究所	主任
研究協力者	麻野間正晴	名古屋市衛生研究所		
研究協力者	秋山 浩子	㈱シーティシー・ラボラトリーシステムズ		
研究協力者	石和 俊	㈱シーティシー・ラボラトリーシステムズ		
研究協力者	茂木 邦夫	㈱シーティシー・ラボラトリーシステムズ		
研究協力者	スィロイ ホセ	㈱富士通九州システムエンジニアリング		
研究協力者	田中 仁	(財)食品農医薬品安全性評価センター	環境毒性試験室	
研究協力者	益森 勝志	(財)食品農医薬品安全性評価センター	環境毒性試験室	
研究協力者	古屋有佳子	(財)食品農医薬品安全性評価センター	環境毒性試験室	

**研究要旨：**

化学物質審査規制法(化審法)は2003年に改正が行われ、年間1tから10t未満の物質(低生産量物質)については、スクリーニング毒性試験の実施は不要とされた。しかし、低生産量であってもその毒性を把握することが望ましく、また、動物愛護の観点からも動物を使用せずに毒性の強さを把握できる最良な方法が望まれ、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)が理想的な評価手法であると考えられる。

(Q)SARに関する基礎的研究や国際比較を実施し、国際的に使用されているいくつかの(Q)SARモデルの中から3つのモデル(DEREK, MultiCase, AdmeWorks)を選択し検証を行い、化審法のスクリーニング試験として定められているAMES試験、染色体試験及び反復投与試験の内、AMES試験及び染色体試験の(Q)SARモデルを検討した結果、これら3つの(Q)SARモデルを組み合わせることにより、変異原性を予測するための決定樹を提案した。しかし、新規化学物質の予測を行う際には各モデルの信頼性向上が必須であることから、AMES試験では、DichlorotolueneとChlorobenzoyl chlorideについてAMES試験を実施し、構造異性体における各モデルの信頼性の確認を行った。実試験ではdichlorotolueneが共に陰性、Chlorobenzoyl chlorideも共に陽性結果であった。(Q)SARモデルの予測結果では、dichlorotolueneの場合、DEREKが共に陽性、MCASEが共に陰性、AWorksが陽性と陰性予測結果を示した。Chlorobenzoyl chlorideではDEREK、MCASEともに全て陽性を示したが、AWorksは陰性・陽性と異なった結果が見られたことより、今後はこの様な例を集積してアラートの改良を行う必要が



あることが判明した。新規化合物についてのアラート作製の為に、Hafnium 及び Boron の類似構造物質の AMES 試験を実施し、Hafnium に塩素が結合した 2 化合物とも陰性を示したが、ニトロ基を有した Hafnium 化合物では陽性となっていることから、更なる類似化合物の検索が必要と考えられた。また、ベンゼン核にホウ素が結合した 2 化合物とも陽性を示しており、更にフッ素が結合した化合物も陽性になっていることから、ベンゼン核にホウ素が結合した構造が新規のアラートとして考えられた。染色体試験モデルの信頼性向上の為に、DEREK については、8 つのアラートを追加して更なる精度向上を行った。また、6 つの化合物グループ (O-Allyl compounds, Episulphides, Azoxy compounds, Azoxy compounds, Allylbenzenes, N-Allyl compounds) に分類される 10 化合物について化審法ガイドラインに基づいて染色体異常試験を行い、新規アラート作製のための資料とした。AdmeWorks については ADA\_1、KNN\_1、KNN\_2 及び KNN\_3 の計 4 つのモジュールについて、単独及び組み合わせを行った場合の精度比較を行った結果、ADA と KNN\_3 のモジュールを使用して予測することが最良と考えられた。しかし、利用率は 68.1% であることから更なる精度の向上を行う必要が認められた。反復投与試験については、市販のモデルにはモジュールが無いことから、各モデルの開発元と協力して、反復投与毒性試験用のモジュールの開発を行うとともに、パターン分析手法を用いて個々の毒性指標に基づいた構造分類を行い、それらの情報を基に「反復投与毒性判定(QSAR モデル)」の作成を行った。その結果、DEREK に 34 個の肝毒性アラートと 35 個の腎毒性アラートが実装され、肝毒性は 61%、腎毒性は 62% の感度が得られた。AdmeWorks については、文献情報から肝に対するモデルを作製した結果、信頼性で比較的高い値が得られた。LeadScope を用いた相補的モデルの組み合わせにより、予測精度の高い肝毒性予測モデル構築の可能性が示された。

日本では年間約 10 万種の化学物質が生産されているが、安全性が明らかであるものは非常に少ない。これらの化学物質の安全情報を得るためには毒性試験を実施する必要があるが、全ての物質について試験を実施するには多大な時間と予算が必要である。そこで、類似した化学物質を一つのカテゴリに分類し、既存の毒性情報からカテゴリ全体の毒性学的特徴を推測する手法が検討されている。本研究はこのカテゴリアプローチ手法の開発を目的とする。本年度は、Japan チャレンジプログラムの候補物質の 2-sec ブチルフェノールについてカテゴリアプローチを行い、ヒト毒性以外のカテゴリ化が可能である事が示唆され、更にコンソシアム提案の 22 のカテゴリについて検討した。

## A. 研究目的

昭和48年10月16日に「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(化審法)が制定され、平成15年に化審法改正が行われた。それに関連して、衆参両議院の経済産業委員会は化審法改正に対する付帯決議で「既存化学物質の安全性点検については、・・・その有害性評価の計画的推進を図ること」と明文化された。しかし、1化合物のスクリーニング試験を実施するにあたり約1億8千～2億4千万円の費用が必要であり、時間的にも最低で半年を必要としている。未点検の既存化学物質を国内の委託ラボの総力を挙げて安全性試験を実施したとしても年間約100物質が限度である。従って、既存化学物質の全てについて試験を行うと、単純計算で200年かかることになる。

OECDの高生産量化学物質安全性点検計画(HPV)においては、生産量が多く、安全性情報が少ない既存化学物質の安全性点検を加盟各国の協力で行うもので、1993年度から3年間で154物質について安全性評価に必要な試験を各国の分担で行うことで開始された。その後、ICCA(国際化学工業協会協議会)もこの取り組みに参画し、2005年10月の時点で752の化学物質の評価を行うことを表明し、現在までに334物質しか評価が終了していない。この様に国際協力の下に既存化学物質の安全性評価済み物質を加算しても全ての物質の評価作業が終了するまでにはほど遠い時間と費用がかかる。この問題の解決策の一案として構造活性相関((Q)SAR)が考慮されている。信頼される(Q)SARモデルが開発されれば、多額の費用と時間がかかる安全性試験を行わなくても、その評価を行うことが出来る。また更に、これらの(Q)SARモデルを使用して、大量の物質数から安全性試験を実施しなければいけない物質選定も可能となる。更に、平成15年の化審法改正により、年間1t以上10t未満の物質(低生産量物質)については、スクリーニング毒性試験の実施は不要とされ、既存の毒性情報に基づき審査が行われることとな

った。しかし、この低生産量物質の申請数は、スクリーニング試験結果を行った物質を大きく上回っている。低生産量であっても、ヒト健康の上からはその毒性を把握することが望ましく、効率よく評価を行うことが期待される。また、動物愛護の観点からも動物を使用せずに毒性の強さを把握できる最良な方法として(定量的)構造活性相関((Q)SAR)が有力候補である。また、更に類似した化学物質を一つのカテゴリーとして分類し、既存の毒性情報からカテゴリー全体の毒性学的特徴を推測する手法が検討されている。カテゴリー手法を行う際に、毒性データが無い場合に、(Q)SARモデルを使用する事でデータギャップを補完する事が出来る。この手法によるグローバルな評価を行う事により、迅速な毒性評価が可能であり、動物福祉の面からも大きな福音となる。

本研究は、国際的に使用されているいくつかの(Q)SARモデルの中から3つのモデル(DEREK, MultiCase, AdmeWorks)を選択し検証を行い、化審法のスクリーニング試験として定められているAMES試験、染色体試験及び反復投与試験の内、AMES試験及び染色体試験の各モデルの信頼性向上を図ると共に、各(Q)SARモデルにモジュールが存在しない反復投与試験についてその((Q)SARモデルの開発及び検討を行う。また更に、すでに存在する膨大な実データを整理し、包括的にまとめ直すことにより、化学物質の毒性を効率的かつ効果的に検討する、カテゴリー評価手法の開発を目的とする。

## B. 方法及び結果

### 1. AMES試験における(Q)SAR精度向上の為の検討

#### 1.1. 構造異性体における信頼性の検討

##### 1.1.1. 目的及び方法

現在、AMES試験の(Q)SARモデルの信頼性はほぼ使用に耐えうる状態まで向上しているが、構造異性体に対しての信頼性に関しては確認をしていない。下記の4物質について実試験を行い、



(Q)SAR モデルの予測結果と比較した。

2,α-Dichlorotoluene, 3,α-Dichlorotoluene,  
3-Chlorobenzoyl chloride および 2-Chlorobenzoyl

chloride の4種類の化合物を被験物質とした。いずれも試薬として市販されているものを使用した。表1. に純度、購入先等を示す。

表1. 被験物質

被験物質名	CAS No.	純度	比重	Lot No.	購入先
2,α-Dichlorotoluene	611-19-8	>98.0%(GC*)	1.28	AGM01	東京化成工業
3,α-Dichlorotoluene	620-20-2	>95.0%(GC)	1.27	FGI01	東京化成工業
3-Chlorobenzoyl chloride	618-46-2	>98.0%(T**)	1.37	AX01	東京化成工業
2-Chlorobenzoyl chloride	609-65-4	>95.0%(T)	1.38	GK01	東京化成工業

\* : by Gas Chromatography

\*\* : by Titrimetric Analysis

試験は「新・微生物を用いる変異原性試験ガイドブック」<sup>1)</sup>に準じ、37℃、20分間のブレインキュベーション法を用いて行った。

### 1.1.2. 結果及び考察

#### ・2,α-Dichlorotoluene

用量設定試験で5菌株すべてにおいて、-S9 mix および+S9 mix のいずれの条件下においても(以下±S9 mix)各用量の平均値は溶媒対照の1.5倍未満であった。なお、すべて菌株において±S9 mix で、200µg/プレート以上の用量で細胞毒性が確認された。本試験の S9 mix 添加条件下(以下+S9 mix)で TA100 は 50µg/プレートの用量で、WP2uvrA/pKM101 は 100µg/プレートの用量で、ともに溶媒対照の1.7倍の復帰変異コロニー数を示し、用量依存性も認められた。また、WP2uvrA/pKM101 は S9 mix 無添加条件下(以下-S9 mix)においても、溶媒対照の1.5倍未満ながら、用量依存的な復帰変異コロニー数の増加を示した。これら以外の試験条件における各用量の平均値は溶媒対照の1.5倍未満であった。

確認試験を TA100 および WP2uvrA/pKM101 に対し±S9 mix で、用量を公差25µg/プレートとして確認試験を行った。その結果、TA100 は-S9 mix ではすべての用量において溶媒対照の1.5倍未満であった。+S9 mix では溶媒対照の1.5倍(100µg/プレート)を示し、用量依存的な復帰変異コロニ

一数の増加を示した。WP2uvrA/pKM101 は-S9 mix で溶媒対照の1.6倍(125µg/プレート)、+S9 mix で1.7倍(100µg/プレート)を示し、いずれも用量依存的な復帰変異コロニー数の増加を示した。しかし、本試験と同様、すべて溶媒対照の2倍未満であった。

以上の結果から、2,α-Dichlorotoluene の細菌に対する変異原性は陰性とした。

#### ・3,α-Dichlorotoluene

用量設定試験の5菌株すべてにおいて、±S9 mix で各用量の平均値は溶媒対照の1.5倍未満であった。なお、すべて菌株において、200µg/プレート以上の用量では±S9 mix で細胞毒性が確認された。

本試験の5菌株すべてにおいて、±S9 mix で各用量の平均値は溶媒対照の1.5倍未満であった。

確認試験では、-S9 mix で WP2uvrA/pKM101、+S9 mix で TA100 および WP2uvrA/pKM101 菌株に対し±S9 mix で、用量を公差25µg/プレートとして確認試験を行った。その結果、TA100 では±S9 mix で復帰変異コロニー数の増加は示さなかった。一方、WP2uvrA/pKM101 では本試験と同様に、±S9 mix で用量依存的な復帰変異コロニー数の増加を示した。しかし、いずれも溶媒対照の1.5倍未満であった。

以上の結果から、3,α-Dichlorotoluene の細菌に対する変異原性は陰性とした。



### ・ 2-Chlorobenzoyl chlorid

用量設定試験の-S9 mix では TA100 が 2.1 倍 (1000 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 2.4 倍 (200 $\mu$ g/プレート) を示し、用量依存性も認められた。+S9 mix では TA100 が 5.0 倍 (1000 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 3.4 倍 (1000 $\mu$ g/プレート) を示し、用量依存性も認められた。また、TA1535 は 1.6 倍 (1000 $\mu$ g/プレート)、TA98 は 1.7 倍 (1000 $\mu$ g/プレート) の復帰変異コロニー数を示した。これら以外の試験条件における各用量の平均値は溶媒対照の 1.5 倍未満であった。なお、-S9 mix では TA1535、TA98 および TA1537 は 1000 $\mu$ g/プレート以上の用量で、TA100 および WP2*uvrA*/pKM101 は 5000 $\mu$ g/プレートの用量で細胞毒性が確認された。+S9 mix では TA1537 は 1000 $\mu$ g/プレート以上の用量で、それ以外の菌株は 5000 $\mu$ g/プレートの用量で細胞毒性が確認された。また、5000 $\mu$ g/プレートにおいてプレート上に沈殿物が生じたが、判定に影響はなかった。本試験の S9 mix では TA100 が 3.2 倍 (500 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 2.5 倍 (125 $\mu$ g/プレート) および TA98 が 2.2 倍 (250 および 500 $\mu$ g/プレート) を示し、それぞれ用量依存性も認められた。+S9 mix では TA100 が 5.4 倍 (500 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 3.4 倍 (1000 $\mu$ g/プレート) および TA98 が 2.7 倍 (500 $\mu$ g/プレート) を示し、それぞれ用量依存性も認められた。また、TA1535 が 1.6 倍 (1000 $\mu$ g/プレート) を示した。これら以外の試験条件における各用量の平均値は溶媒対照の 1.5 倍未満であった。確認試験では TA1537 を除く 4 菌株について±S9 mix で試験を行った。その結果、-S9 mix では TA100 が 3.9 倍 (500 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 2.9 倍 (500 $\mu$ g/プレート) および TA98 が 2.1 倍 (375 $\mu$ g/プレート) を示し、それぞれ用量依存性も認められ、いずれも本試験と同様の結果が得られた。+S9 mix では TA100 が 6.9 倍 (1000 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 3.3 倍 (1000 $\mu$ g/プレート) および TA98 が 3.5 倍 (750 $\mu$ g/プレート) を示し、それぞれ用

量依存性も認められた。TA1535 は 1.98 倍 (750 $\mu$ g/プレート) で 2 倍未満であった。いずれも本試験と同様の結果であった。

以上の結果から、2-Chlorobenzoyl chloride の細菌に対する変異原性は S9 mix の有無にかかわらず TA100、WP2*uvrA*/pKM101 および TA98 に対し陽性であった。

### ・ 3-Chlorobenzoyl chloride

用量設定試験の-S9 mix では WP2*uvrA*/pKM101 が 2.5 倍 (200 $\mu$ g/プレート) を示し、用量依存性も認められた。また、TA100 は 1.9 倍 (200 $\mu$ g/プレート) を示した。+S9 mix では TA100 が 3.0 倍 (1000 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 3.8 倍 (1000 $\mu$ g/プレート) を示し、用量依存性も認められた。また、TA1535 は 1.8 倍 (1000 $\mu$ g/プレート) を示した。これら以外の試験条件における各用量の平均値は溶媒対照の 1.5 倍未満であった。なお、-S9 mix ではすべて菌株において 1000 $\mu$ g/プレートの用量で細胞毒性が確認された。+S9 mix では TA100、TA98 および TA1537 は 1000 $\mu$ g/プレート以上の用量で、WP2*uvrA*/pKM101 および TA1535 は 5000 $\mu$ g/プレートの用量で細胞毒性が確認された。また、5000 $\mu$ g/プレートにおいてプレート上に沈殿物が生じたが、判定に影響はなかった。

本試験の-S9 mix では TA100 が 2.2 倍 (250 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 2.4 倍 (250 $\mu$ g/プレート) を示し、ともに用量依存性も認められた。また、TA98 は 1.9 倍 (250 $\mu$ g/プレート) を示した。+S9 mix では TA100 が 5.8 倍 (500 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101 が 4.2 倍 (1000 $\mu$ g/プレート) および TA98 が 2.7 倍 (500 $\mu$ g/プレート) を示し、それぞれ用量依存性も認められた。また、TA1535 は 1.7 倍 (500 $\mu$ g/プレート) を示した。これら以外の試験条件における各用量の平均値は溶媒対照の 1.5 倍未満であった。

確認試験では TA1537 を除く 4 菌株について±S9 mix で確認試験を行った。その結果、-S9 mix では WP2*uvrA*/pKM101 だけが 2.0 倍 (250 $\mu$ g/プレート) を示し、用量依存性も認められた。TA98

は1.5倍(250 $\mu$ g/プレート)で、TA1535は1.5倍未満であった。これら3菌株においては本試験と同様の結果が得られた。しかし、TA100は1.6倍(250 $\mu$ g/プレート)となり、2倍以上を示した本試験の結果とは異なっていた。+S9 mixではTA100が8.2倍(1000 $\mu$ g/プレート)、WP2*uvrA*/pKM101が4.4倍(1000 $\mu$ g/プレート)およびTA98が3.4倍(1000 $\mu$ g/プレート)を示し、それぞれ用量依存性も認められ、本試験と同様の結果が得られた。しかし、本試験では2倍未満であったTA1535は3.1倍(1000 $\mu$ g/プレート)を示し、用量依存性も認められ本試験とは異なる結果となった。用量設定試験、本試験 および確認試験において結果の異なったTA100(-S9 mix)およびTA1535(+S9 mix)に対し再度確認試験を行った。また、確認試験で2.0倍(250 $\mu$ g/プレート)であったWP2*uvrA*/pKM101(-S9 mix)に対しても再度確認試験を行った。その結果、WP2*uvrA*/pKM101(-S9 mix)は2.3倍(250 $\mu$ g/プレート)でこれまでの試験と同様の結果が得られた。しかし、TA100(-S9 mix)は1.5倍(250 $\mu$ g/プレート)、TA1535(+S9 mix)は1.6倍(1000 $\mu$ g/プレート)であった。これらの各々について、4回の試験結果を平均すると、両者ともすべての用量において2倍未満となった。

以上の結果から、3-Chlorobenzoyl chlorideの細菌に対する変異原性は-S9 mixでWP2*uvrA*/pKM101に対し、+S9 mixではTA100、WP2*uvrA*/pKM101およびTA98に対し陽性であった。

### (Q)SARモデルとの比較

(Q)SARモデルの予測結果と厚生労働省が実質している既存化学物質安全点検事業で行ったAMES試験結果を加えてその試験結果の比較を表2に示す。実試験ではdichlorotolueneが共に陰性、Chlorobenzoyl chlorideも共に陽性結果であった。(Q)SARモデルの予測結果では、dichlorotolueneの場合、DEREKが共に陽性、MCaseが共に陰性、AWorksが陽性と陰性予測結果を示した。Chlorobenzoyl chlorideではDEREK、MCaseともに全て陽性を示したが、AWorksは陰性・陽性と異なった結果が見られた。

Dichlorotolueneでは、DEREKが実試験陰性に対して陽性結果が見られ、Alert027のAlkylating agentの為に陽性となっている。今後はこの様な例を集積してAlertの改良を行う必要がある。また、AWorksでは相反する結果が見られていることから、構造異性体についての相関式を考慮したモデルの開発が必要と考えられた。

表2. (Q)SARモデルとの比較

物質名	CAS No.	試験結果	(Q)SAR 予測結果		
			DEREK	Mcase	Aworks
2, $\alpha$ -Dichlorotoluene	611-19-8	陰性	陽性	陰性	陽性
3, $\alpha$ -Dichlorotoluene	620-20-2	陰性	陽性	陰性	陰性
4, $\alpha$ -Dichlorotoluene	104-83-6	陰性	陽性	陰性	陰性
2-Chlorobenzoyl chloride	609-65-4	陽性	陽性	陽性	陰性
3-Chlorobenzoyl chloride	618-46-2	陽性	陽性	陽性	陽性
4-Chlorobenzoyl chloride	122-01-0	陰性	陽性	陰性	陽性

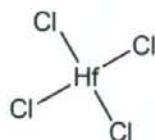
## 1.2. AMES 試験用(Q) SAR モデルの新アラートの作製

### 1.2.1. 方法

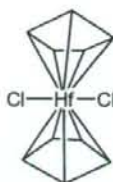
現在、化審法で届けられる化合物について、本プロジェクトで提案を行っている AMES 試験結果予測決定樹を用いて AMES 試験結果を予測しているが、新規化学物質であることから予測精度の上でアラートまたは Toxophore を作製する上で資料が無いか不足している。このことからハフニウム及びボロンについて、その類似構造物質について AMES 試験を実施した。

実施した化合物を下記に列挙する。

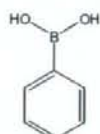
- a. Hafnium(IV) chloride [CAS No. 13499-05-3]  
(Sigma-Aldrich 製、純度 99.9%、Lot No. I5469EJ)



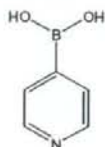
- b. Hafnocene dichloride [CAS No. 12116-66-4]  
(Sigma-Aldrich 製、純度 46.6%HF (燃焼酸化後)、  
Lot No. 14408BE)



- c. Phenylboronic acid [CAS No. 98-80-6]  
(Sigma-Aldrich 製、純度 100%(HPLC)、Lot No. 1350998)



- d. 4-Pyridineboronic acid [CAS No. 1692-15-5]  
(Sigma-Aldrich 製、純度 96.2% (滴定)、Lot No. 06512DH)



AMES 試験は、化審法の細菌を用いる復帰突然変異試験のガイドラインに基づいて実施し、次の 5 種類の菌株を使用した。

ネズミチフス菌	TA100 株	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA98 株	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
ネズミチフス菌	TA1535 株	(ヒスチジン要求性の塩基対置換型)
ネズミチフス菌	TA1537 株	(ヒスチジン要求性のフレームシフト型)
大腸菌	WP2uvzA 株	(トリプトファン要求性の塩基対置換型)



## 1.2.2. 結果及び考察

結果を表3に示す。

Hafnium(IV) chloride では、最高用量には生育阻害が認められると考えられる用量またはガイドラインに規定されている上限の 5000 µg/プレートを設定し、試験を行った。その結果、Hafnium (IV) chloride 処理群では、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) および代謝活性化系存在下 (+S9 処理) のいずれにおいても、陰性対照群の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。これら両処理法での用量設定試験または同追加試験における試験結果は、本試験において再現された。陰性対照群の平均復帰変異コロニー数は、無処理対照群と比較して明確な差が認められなかった。ことから、アセトニトリルの試験系への影響はないと考えられた。以上の結果から、当該試験条件下において、Hafnium (IV) chloride の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定された。

Hafnocene dichloride では、最高用量にガイドラインに規定されている上限の 5000 µg/プレートを設定し、試験を行った結果、Hafnocene dichloride 処理群では、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) および代謝活性化系存在下 (+S9 処理) のいずれにおいても、陰性対照群の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上の結果から、当該試験条件下において、Hafnocene dichloride の遺伝子突然変異誘発性は陰性と判定された。

Phenylboronic acid では、最高用量には、ガイドラインに規定されている上限の 5000 µg/プレートを設定し、試験を行った。その結果、Phenylboronic acid 処理群では、代謝活性化系非存在下 (-S9 処理) および代謝活性化系存在下 (+S9 処理) の TA1537 株においてのみ陰性対照群の 2 倍以上を示す復帰変異コロニー数の増加が認められた。これら両処理法での用量設定試験における試験結果は、本試験において再現された。以上の結果から、当該試験条件下において、Phenylboronic acid の遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定された。

4-Pyridineboronic acid では、-S9 処理の TA1537 株および+S9 処理の WP2uvrA 株において、最高用量の 5000 µg/プレートで陰性対照群の 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた。-S9 処理の TA100 および WP2uvrA 株においても復帰変異コロニー数の増加傾向が認められたが、どちらも陰性対照群値の 2 倍未満であった。(1.9 倍) これら両処理法での用量設定試験における試験結果は、本試験において再現された。変異原性強度の相対的比較値である比活性の最大値は、+S9 処理、WP2uvrA 株の 5000 µg/プレートで 11 (mg/プレート当たり) と計算された。以上の結果から、当該試験条件

下において、4-Pyridineboronic acid は遺伝子突然変異誘発性を示すもの(陽性)と判定された。

上記 4 化合物の内、Hafnium に塩素が結合した 2 化合物とも陰性を示したが、ニトロ基を有した Hafnium 化合物では陽性(私信)となっていることから、更なる類似化合物の検索が必要と考えられた。また、ベンゼン核にホウ素が結合した 2 化合物とも陽性を示しており、更にフッ素が結合した化合物も陽性になっていること(私信)から、下記の構造を持つ化合物について AMES 試験陽性のアラートとして考えられた。

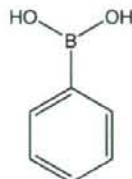




表3. AMES 試験結果

Chemicals	CAS No.	Purity	Result		Specific activity μ g/plate
			S9-	S9+	
Hafnium(IV) chloride	13499-05-3	99.90%	Neg.	Neg.	332
Hafnocene dichloride	12116-66-4	46.6%HF	Neg.	Neg.	
Phenylboronic acid	98-80-6	100%(HPLC)	Pos. TA1537	Pos. TA1537	
4-Pyridineboronic acid	1692-15-5	96.20%	Pos. TA1537	Pos. WP2uvrA	

### 1.3. AdmeWorks の改良

#### 1.3.1. 方法

ADMEWORKS モデルの改良として、VM 法、KNN 法および ADA 法の 3 つの手法を用いての Ames 変異原性予測モデルの改良を行った。Ames 試験結果データ（化学構造と実測値）の中から、以下の手順に従って、解析に相応しくないデータを除外して、データの整理を行った。

- ①実測値がない、あるいは実測値が明らかでないデータの除外
- ②金属系の原子、イオン、塩、壊れている構造の除外
- ③重複しているデータ、特に実測値が矛盾してるデータの除外
- ④検証用母集団と類似（99%以上）しているデータの除外
- ⑤検証用母集団と類似（95%以上）しているデータの除外
- ⑥検証用母集団と類似（90%以上）しているデータの除外

ADMEWORKS の開発 PKG である ModelBuilder を用いて 372 化学的パラメータと 1600 以上の部分構造パラメータを発生した。372 化学的パラメータの中から欠損値、ゼロ、高い相関のパラメータを除外してから、AdaBoost という手法によって、有効なパラメータ 6 件に絞った。また 1600 部分構造パラメータも、クラスの特異的パラメータ（片方のクラスにほとんどゼロ値しかない）を 28 件に絞った。28 件の部分構造パラメータのみを利用して、高 sensitivity と高 specificity、2 本ずつのモデルを下記アルゴリズムに対して作成した。また化学的パラメータと部分構造パラメータの両方を利用して、さらに SVM による 1 本のモデルを作成した (AMES\_SVM2)。モデルの検証としては、最終的に外部検証用母集団 (409 件) の中、NIHS 検証用母集団 (227 件) に対して最終的な外部検証を行った。

#### 1.3.2. 結果及び考察

外部検証結果を下記に示す

モデル手法	高 Specificity モデル	高 Sensitivity モデル
SVM	AMES_CL_SVM_191	AMES_SVM_FN
KNN	AMES_CL_KNN_2	AMES_KNN_FN
ADA	AMES_ADA	AMES_ADA_FN

## 1) Ames予測モデルの外部検証結果

	AMES_C L_KNN 2	L_SVM_1 91	AMES_A DA	AMES_S VM_FN	AMES_K NN_FN	AMES_A DA_FN	AMES_S VM2
TOTAL	227	227	227	227	227	227	227
OK	227	225	225	225	225	225	225
NG	0	2	2	2	2	2	2
MW=ALL							
TP	43	11	15	10	39	38	40
FP	0	13	17	26	126	133	133
TN	184	169	165	156	56	49	49
FN	0	32	28	33	4	5	3
ALL	227	225	225	225	225	225	225
GRAY	0	0	0	0	0	0	0
GRAY RA*	0	0	0	0	0	0	0
Concordance = (TP+TN)/ALL		0.80	0.80	0.74	0.42	0.39	0.40
Specificity = TN/(TN+FP)		0.93	0.91	0.86	0.31	0.27	0.27
Sensitivity = TP/(TP+FN)		0.26	0.35	0.23	0.91	0.88	0.93
MW<= 200							
TP	33	9	11	7	31	29	30
FP	0	6	9	21	103	105	106
TN	128	120	117	105	23	21	20
FN	0	24	22	26	2	4	3
ALL	161	159	159	159	159	159	159
GRAY	0	0	0	0	0	0	0
GRAY RA*	0	0	0	0	0	0	0
Concordance		0.81	0.81	0.70	0.34	0.31	0.31
Specificity		0.95	0.93	0.83	0.18	0.17	0.16
Sensitivity		0.27	0.33	0.21	0.94	0.88	0.91
MW> 200							
TP	10	2	4	3	8	9	10
FP	0	7	8	5	23	28	27
TN	56	49	48	51	33	28	29
FN	0	8	6	7	2	1	0
ALL	66	66	66	66	66	66	66
GRAY	0	0	0	0	0	0	0
GRAY RA*	0	0	0	0	0	0	0
Concordance		0.77	0.79	0.82	0.62	0.56	0.59
Specificity		0.88	0.86	0.91	0.59	0.50	0.52
Sensitivity		0.20	0.40	0.30	0.80	0.90	1.00

AdmeWorksの改良に関しては、まず、ModelBuilderを用いて372化学的パラメータと1600以上の部分構造パラメータを発生させ、モデル作成のためのクラスの特異的パラメータとして43件の部分構造及び化学的パラメータを選定した。これらを利用してSVM法、KNN法およびADA法の3つの手法に対して、高sensitivityモデルと高specificityになるように調整したモデルを各々作成し、さらに、分子量を200で区切った場合のモデルの精度の比較を検討した、その結果SVM法を用いた場合に比較的concordanceの高いモデルを作成することができるが示された。

## 2. 染色体試験における((Q)SARモデルの改良

### 2.1. Alert及びToxicophoreの改良

#### 2.1.1. 方法

既存化学物質点検品目選定の為のフロー作製に使用する(Q)SARモデルは、OECDのQSAR専門家会議(36<sup>th</sup> Joint Meeting, 4<sup>th</sup>-6<sup>th</sup> February 2004)において検討対象とされたSARモデル(DEREK, MultiCase)と、日本で開発しているモデル(AdmeWorks)の計3モデルについて、更なる精度の向上を行った。

DEREKについては、Ver.9バージョンに含まれるAlertに衛研で調査検討した下記の8つAlertを追加してVer.NIHS29を作製し、国内既存点検事業で行った染色体試験結果について精度を調べた。

- Alert 535 : isothiazolinones (CD22)
- Alert 536 : thymine, cytosine or derivatives (CD57)
- Alert 537 : purine bases (CD30, CD58 & CD95)
- Alert 538 : 5-fluoropyrimidines (CD24)
- Alert 539 : bipyridinium compounds (CD60)

- ・Alert 540 : aryl N-alkyl carbamates (CD46)
- ・Alert 541 : vinca alkaloids (CD56)
- ・Alert 541 : 4-hydroxystilbenes (CD103)

また、更に ClassPhermer で検討した Toxicophore を Ver.NIHS29 に追加して NIHS29+CP10 モジュールを作製し、その精度も合わせて検討した。

MultiCase については、NTP Chromosomal Aberration(A61)モジュールについて、厚生労働省の既存化学物質安全性点検事業で実施された 260 物質の染色体試験結果を用いて精度を検討した。更に、Kirkland らのデータ及び祖父尼らのデータを元にトレーニングセットを作製し、合わせて検討を行った。

AdmeWorks については、種々の染色体試験結果

を元に 4 つの染色体異常モジュールを作製し、各々のモジュールの精度を比較検討した。

### 2.1.2. 結果及び考察

DEREK については、Ver.9 に下記の 8 つの Alert を追加した場合の信頼性(Concordance)を比較した場合、Ver.9 では 64.8%が NIHS29 と NIHS29+CP10 では、66.8%、68.0%と上昇が見られた(表 4, 5, 6)。

感受性(Sensitivity)でも、信頼性と同様な結果が得られた。安全性の観点から、今後は偽陰性の化合物について更なる検討を加える必要性が考えられた。

表 4. DEREK Ver.9 の場合

		DEREK(Ver.9)		
		+	-	
試験結果	+	118	42	64.8% (Concordance)
	-	132	12	35.6% (Sensitivity)
		250	120	90.9% (Specificity)
			54	196

表 5. DEREK NIHS29 の場合

		DEREK(NIHS29)		
		+	-	
試験結果	+	118	62	66.8% (Concordance)
	-	132	27	52.5% (Sensitivity)
		250	105	79.5% (Specificity)
			89	161

表 6. DEREK NIHS29+CP10 の場合

		DEREK(NIHS+CP10)		
		+	-	
試験結果	+	118	75	68.0% (Concordance)
	-	132	27	63.6% (Sensitivity)
		250	105	72.0% (Specificity)
			89	161

MultiCase については、NTP のデータを元に Toxicophore が作製され市販されている A61 のモ

ジュールを検討した場合を表 6. に示す。



表6. A61 モジュールの場合

		MultiCase (A61)			
		+	-	判定不能	
					59.27% (Concordance)
試験結果	+ 118	47	71	1	39.83% (Sensitivity)
	- 130	30	100	1	76.92% (Specificity)
		250			99.20% (Applicability)

また、Kirkland らの報告を元にモジュールを構築した場合には、表7のように成った。

表7. Kirkland らの結果を元にモジュールを作製した場合

		MultiCase (Kirkland)			
		+	-	判定不能	
					64.11% (Concordance)
試験結果	+ 118	68	50	1	57.63% (Sensitivity)
	- 130	30	100	1	70.00% (Specificity)
		250			99.20% (Applicability)

また、祖父尼らの報告を元にモジュールを構築した場合には、表8のように成った。

表8. 祖父尼らの結果を元にモジュールを作製した場合

		MultiCase (Kirkland)			
		+	-	判定不能	
					56.05% (Concordance)
試験結果	+ 118	47	71	1	39.83% (Sensitivity)
	- 130	38	92	1	70.77% (Specificity)
		250			99.20% (Applicability)

更に A61 と Kirkland の両モジュールを併用して検討したところ、表9のようになった。これらの結果から両モジュールを組み合わせてもその精度の向上は認められず、Kirkland らのモジュールがやや実用性に近いことが分かった。しかし、信頼性で 50%強の値では日常の使用に耐えることが出来ないことから、信頼性の向上の為に、偽陰性を示した化合物について今後検討を加える必要

が考えられた。特に、A61 と Kirkland らのモジュールの偽陰性物質が 71 と 51 物質あったことから、この両モジュールに共通の化合物を表 10 に列挙する。今後、これらの物質を中心に類似物質を含めたデータベースを作製し、更なる Toxicophore を作製し、精度向上を行う事とした。

表9. A61 と Kirkland のモジュールを併用した場合


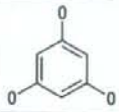
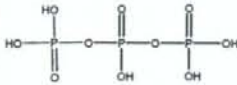

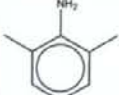



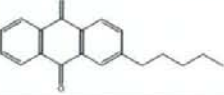


		MultiCase (A61+Kirkland)			
		+	-	判定不能	
					58.87% (Concordance)
試験結果	+ 118	30	88	1	25.42% (Sensitivity)
	- 130	14	116	1	89.23% (Specificity)



表10. A61 と Kirkland モジュールで共に偽陰性を示した化学物質

CAS No.	物質名	化学構造
78-97-7	2-ヒト <sup>+</sup> ロキシ <sup>+</sup> ロハ <sup>+</sup> ソニトリル	
88-53-9	2-アミノ-5-クロロ-4-メチルベンゼン <sup>+</sup> スルホン酸	
4461-52-3	メキシメタノール	
106-37-6	1,4-ジ <sup>+</sup> ブ <sup>+</sup> ロモ <sup>+</sup> ベンゼン	
105-99-7	ジ <sup>+</sup> ブ <sup>+</sup> チル <sup>+</sup> ジ <sup>+</sup> ビ <sup>+</sup> ン酸	
89-83-8	チモール	
1338-41-6	ソルビタンモノオクタデカノート	
111-41-1	N-(2-アミノエチル)エタノール <sup>+</sup> アミン	
3319-31-1	1,2,4-ベンゼントリカルボン酸 <sup>+</sup> トリス(2-エチルヘキシル)エステル	
3048-65-5	3a,4,7,7a-テトラヒド <sup>+</sup> ロ-1H-インデン	
103-83-3	N,N-ジ <sup>+</sup> メチル <sup>+</sup> ベン <sup>+</sup> ジ <sup>+</sup> アミン	
108-69-0	3,5-ジ <sup>+</sup> メチル <sup>+</sup> アニリン	

2403-88-5	2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシピペリジン	
101-83-7	ジシクロヘキシルアミン	
88-60-8	6-tert-ブチル-m-クレゾール	
118-79-6	2,4,6-トリブロモフェノール	
4189-44-0	チオウレア S,S-ジ'オキシド	
121-45-9	トリメチル亜リン酸	
38640-62-9	ビス(1-メチルエチル)-ナフタレン	
2416-94-6	2,3,6-トリメチルフェノール	
75-50-3	トリメチルアミン	
84-51-5	2-エチルアントラキノン	
95-50-1	o-ジ'クロロベンゼン	
26471-62-5	トリレンジ'イソシアナート	
108-39-4	3-メチルフェノール	
620-17-7	m-エチルフェノール	

88-09-5	2-エチル酪酸	
108-73-6	1,3,5-トリヒドロキシベンゼン	
13939-25-8	トリリン酸、アルミニウム塩	
97-39-2	1,3-ビス(2-メチルフェニル)グアニジン	
87-62-7	2,6-ジメチルアニリン	
298-06-6	ジチオリン酸 O,O'-ジエチル	
102-81-8	2-(ジ-n-ブチルアミノ)エタノール	
50957-96-5	ラウリルリン酸ナトリウム塩	
13936-21-5	2-ベンチルアントラキノン	
2579-20-6	1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサン	
1678-91-7	エチルシクロヘキサン	

AdmeWorks については、ADA\_1、KNN\_1、KNN\_2 及び KNN\_3 の計 4 つのモジュールが作製されたことから、このモジュールについて単独及び組み合わせを行った場合の精度比較を行った。

各モジュール単独の場合の信頼性(表 11)では、陽性を正しく陽性と示す Sensitivity では ADA が 61.2%を示し最も高い値であったが、全体の精度である Concordance では KNN\_3 が 65.4%と良好な値を示した。また、各モジュールを組み合わせるとその精度を比較したところ(表 12)、4 モジュー

ルとも同じ結果を示した場合では、その Sensitivity は 65.6%、Concordance では 72.9%であったが、その利用率(Applicability)は 56.0%と低値を示した。4 つの内 3 つが同じ結果を示した場合には、Sensitivity : 64.6%、Concordance : 65.1%であった。また、2 つのモジュールが同じ結果を示した場合は、ADA と KNN\_3 の組み合わせで Sensitivity が 65.8%、Concordance が 69.7%であった。これらの結果から現段階で染色体試験について予測する場合には ADA と KNN\_3 のモジュールを使用して

予測することが最良と考えられた。しかし、利用 が必要が認められた。  
率は 68.1%であることから更なる精度の向上を行

**表 1 1. AdmeWorks の各モジュールの予測結果**

	モジュール名			
	ADA_1(%)	KNN_1 (%)	KNN_2 (%)	KNN_3 (%)
Concordance	61.5	61.9	61.5	65.4
Sensitivity	61.2	53.7	57.9	60.3
Specificity	61.8	69.1	64.7	69.9
Applicability	100.0	100.0	100.0	100.0

Total:257 Chemicals

**表 1 2. AdmeWorks の各モジュールの組み合わせによる予測結果**

	モジュール名							
	4つ同じ	3つ同じ	ADA+ KNN1	ADA+ KNN2	ADA+ KNN3	KNN1+ KNN2	KNN1+ KNN3	KNN2+ KNN3
Concordance	72.9	65.1	67.7	65.9	69.7	64.4	65.9	65.6
Sensitivity	65.6	64.6	61.8	64.1	65.9	57.5	58.4	61.0
Specificity	78.3	65.6	72.3	67.3	73.1	70.2	72.3	69.4
Applicability	56.0	84.8	66.2	70.8	68.1	80.9	85.6	86.0

Total:257 Chemicals