

平成 31 年度 厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）

研究課題名：インシリコ予測技術の高度化・実用化に基づく化学物質の
ヒト健康リスクの評価ストラテジーの開発
(H30-化学-指定-005)

分担研究報告書

Ames/QSAR 予測性の向上と運用可能な Ames 変異原性予測の
スキームの確立に関する研究

研究分担者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 副所長
研究協力者 笠松 俊夫 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 研究員
研究協力者 北澤 愛莉 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部

研究要旨

これまで労働安全衛生法（安衛法）に基づき実施された Ames 試験の結果に基づく 12,140 物質より成るデータベースを作成し、QSAR ツールの開発を手掛けている事業者がこのデータベースを学習データとして提供し、QSAR による Ames 試験結果の予測性向上に寄与してきた（第 1 回 Ames/QSAR 国際共同チャレンジプロジェクト，実施期間：2014～2017 年）。しかしながら、これまでに提供できたのは化学構造と陰性陽性の結果のみであった。今回、試験報告書の入手が可能となったことから、陽性結果が報告されている物質についてはより詳細な試験条件（各菌株の陽性陰性結果，被験物質純度，媒体）をデータベースに追加入力すると共に、誤りがあれば訂正、曖昧な反応については複数の専門家が確認し、判定を確定させた。またこのプロジェクトで殆どのインシリコ予測モデルにて陽性と判定された陰性（偽陽性）物質についても、試験報告書を確認し、一部の判定を修正した。更新されたデータベースは、より信頼性が高く、情報量の多い学習データとして、第 2 回 Ames/QSAR 国際共同チャレンジプロジェクトに活用される。また、安衛法データベース以外の既存のハンセンデータベースの改定作業も行った。今回、2 つの QSAR モデルで結果が相反する 2 化合物について実際に Ames 試験を実施し、試験結果を確認した。

A. 研究目的

現在、人によって新たに作り出された化学物質は登録されているものだけでも 1 億 4 千万種類を超え、これは 1 日約 4000 種類のペースで増え続けている。これまでの調査で

は新規化学物質の約 5% は強い変異原性を有し、人間に対して発がん性を示すと推察されている。このような変異原性化学物質を効率的、且つ正確に検出し、規制の対象と

することは公衆衛生上重要な取り組みである。近年、IT（情報技術）の進歩により、化学物質の変異原性をインシリコで評価することが可能となっている。EU 各国および米国EPA においては、既存化学物質のリスク管理の目的で、安全性評価未実施の物質を対象にカテゴリーアプローチおよび、定量的構造活性相関（QSAR）の利用が検討されている。特に、医薬品における変異原性不純物の評価にQSARの利用を明文化したICH-M7においてインシリコ手法を用いて医薬品不純物の変異原性の有無を評価することが受け入れられるなど、実試験に依らないインシリコ手法による安全性確認（Ames試験結果予測）が広がりつつあり、その予測モデルの性能と信頼性の向上は重要性を増している。

化学構造と試験結果のQSARに基づくこれらのインシリコ予測モデルは、既存のAmes試験結果を学習データとして開発されているが、多くの利用可能なAmes試験結果は質・量ともに限定されている。日本では安衛法に基づき、過去50年にわたり、国内の事業場で使用される年間100kg以上の新規化学物質については、Ames試験が実施され、登録されてきている。現行の安衛法試験ガイドラインはOECDのテストガイドラインTG471と実質同等であり、原則GLP条件下で実施されていることから、極めて信頼性の高いものである。このような登録数が数万に及ぶ信頼性の高いAmes試験のデータベースは世界でも稀であり、変異遺伝部では厚生労働省安全衛生部より得た登録物質の構造とAmes試験結果（判定によりClass A：強い陽性、Class B：陽性、Class C：陰性）のリストから、QSAR予測モデル開発に活用

できる12,140物質を抽出してデータベース化した。これをAmes/QSAR国際共同チャレンジプロジェクトとして12のQSARベンダーに3つのフェーズに分割して提供することで、それぞれのQSARベンダーが開発する予測モデル（計17モデル）の予測性能が向上した（Honma *et al.*, 2019）。

今回、厚生労働省安全衛生部から登録物質のAmes試験報告書が入手できるようになったことから、単に陽性陰性の結果だけでなく、予測モデル開発に役立つと思われる試験の詳細条件（被験物質の純度、媒体、試験菌株毎の判定結果と代謝活性化の有無）を試験報告書から抽出し、データベースに追加入力すると共に、試験結果のリストと試験報告書内容の整合性を確認、また曖昧なデータについては専門家の確認を得て再判定した。こうして更に信頼性を高め、かつ詳細なデータを整備し、提供することにより、更に予測性の高いインシリコ予測モデルの開発に寄与することを目的とする。

B. 研究方法

B-1 詳細Ames試験データベースの作成

厚生労働省安全衛生部から提供された試験報告書は、外部委託によりスキャンされPDF化されたものについて確認した。登録物質については、安衛法官報通し番号（Serial No.）や安衛法官報公示整理番号などが割り当てられているが、本業務においては受付番号（Registration No.）をベースに取り扱った。

追加入力項目として、1) 被験物質の純度、2) 試験に使用した媒体、3) 標準5菌株（TA100, TA1537, WP2uvrA, TA98, TA1537）それぞれの判定と代謝活性化の有無を設定、

データベース内のClass A：強い陽性（比活性>1,000 コロニー/mg）、Class B：陽性（Class A 以外の陽性）の受付番号から相当する試験報告書の該当箇所を確認し、データベースに入力した。但し各菌株の判定は基本的には通常報告書に記載されている比活性表に依った。古い年代（概ね平成2年度以前）の試験報告書など比活性表がないものについては、個々のデータから比活性を算出し判定した。

データベースのClass C物質（即ちAmes試験陰性物質）については、量的に膨大で確認には相当の時間を要すること、かつ上記追加入力項目の情報の有用性が低いことから基本的には今回確認対象としなかったが、前回の国際共同チャレンジプロジェクトにて評価した17のQSAR予測モデルの内、全て、あるいは1つ以外は全てのモデルが陽性と判定した陰性物質（偽陽性物質）については試験報告書を確認し、その判定が妥当であるかを検証した。

解釈が容易でない、リストと試験報告書の内容が合わない、その他、専門家の確認を仰いだほうが良いと判断したケースについては、Ames試験に精通した所内の専門家が参加する場を設けて、議論・確認をし、同意を得た上で、判定結果をデータベースに入力した。

B-2 Ames試験の実施による試験結果の確認
ハンセンデータベースに記載の以下の2化合物についてAmes試験を実施した。

- ① bis(methoxyethyl)phthalate (Cas# 117-82-8)
- ② 2',3',4'-trichloroacetophenone (Cas# 13608-87-2)

Ames試験は全て外部委託により受託試

験機関が実施した。OECD試験ガイドラインTG471 に準拠し、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames Test）を実施した。本試験はアミノ酸要求性のサルモネラ菌と大腸菌の株を用いて点変異を検出し、被験物質がDNAに影響を与えるか否かの判定する試験である。試験は、「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」（平成8年3月22日付、衛化第29号生活衛生局長通知）に準拠し、医薬品医療機器法施行規則第43条「申請資料の信頼性の基準」に基づいて実施した。

（倫理面への配慮）本研究は動物を用いた研究を行わないため対象外である。

C. 研究結果

C-1 試験報告書確認と詳細条件の入力

年度の古い受付番号2174以下の試験報告書（概ね昭和61年以前）は、厚生労働省安全衛生部に問い合わせたが所在が確認できず、入手不可であった。

入手できた試験報告書の内、確認したのは陽性物質1549（Class A: 628, Class B: 921）と、先に記した前回プロジェクトの偽陽性物質であった16物質について陰性との判定を見直した。再評価物質のまとめを表1に示す。

データベースに追加入力した内容を例示する（表2）。追加入力項目についての入力方針は以下の通りである。

① 被験物質の純度（Purity）

試験報告書記載の数値(%)を入力。但し、>と≥の区別をしなかった。

② 試験に使用した媒体（Solvent）

実質的に同一と考えられる媒体は試験報告書の記載に関わらず統一するよ

うにした(例:脱水DMSO等はDMSOに、注射用水、蒸留水等はH₂Oに)。

③標準5菌株それぞれの判定と代謝活性化の有無(S9+/-)

試験報告書記載の比活性表の値に基づき、どのClassに相当するか判定し、試験間でClassが異なる場合は試験間で一番高い比活性値に基づきClassを選択した。

当初は比活性表に数値の記載があれば、その菌株は陽性で見做し、該当するClassを入力していたが、作業を進める内に、例えば予備試験と本試験の2試験があり、どちらかの一方で陽性反応が確認された場合、比活性表には数値が記載されているが、確認試験にて再現性が確認されず、受託試験機関が最終的に陰性と結論付けているようなケースが散見された。このような場合、比活性表の記載そのままにClass分類するのは不適切であることから、以降は以下のスキームに従って判定するようにした(図1)。本スキーム確立前の入力箇所も後日再確認を行い、入力内容を見直した。

C-2 専門家による試験結果の再評価

試験報告書確認とデータ入力と合わせて、国立衛研のAmes試験に通じた専門家による試験結果の再評価を行い、判定を確定させた。対象はClass A化合物628物質、Class B化合物が921物質、Class C化合物が16物質であった。内、それぞれ26、18、16物質の判定が変更された(表1)。再判定結果と、判定結果の理由を表3に示す。

最終化されたデータベースは、令和2年3月16日に2回目のAmes/QSAR国際共同チャレンジプロジェクト実施のアナウンスと共

に参加を希望するQSARベンダーに学習データとして提供された。

C-3 Ames試験の実施とデータベースの改定

試験データが古く、その信頼性に疑義がある場合や、報告ではAmes試験陽性でありながら発がん性試験では陰性を示す化合物等については実際にAmes試験を実施し、試験データを検証し、データベースの修正・改良を行っている。表4は令和元年度に行った2つの化合物の特徴とAmes試験結果を示す。両化合物はハンセンデータベースに収載され、Ames試験陽性と評価されているが、詳細な試験報告書の入手はできなかった。2つともDerek Nexusでは陰性、Case Ultraでは既存の陽性(Known positive)とされている。この陽性はハンセンデータベースの結果を示しているものと推察される。しかしながら、Case UltraでのQSARによる陽性確率はそれぞれ、12.4%、11.3%と低く、陽性結果には疑問が残る。

Ames試験を実施したところ、bis(methoxyethyl)phthalate は *Salmonella typhimurium* TA98 及び TA1537 並びに *Escherichia coli* WP2 uvrAの-S9において用量依存的、且つ再現性の高い陽性反応が観察され、陽性と判定された。最大比活性値は33.8 (TA98, -S9)であった。2',3',4'-trichloroacetophenone は *Salmonella typhimurium* TA100及び*Escherichia coli* WP2 uvrAの+S9において、用量依存的、且つ再現性の高い陽性反応が観察され、陽性と判定された。最大比活性値は13,306 (TA100, +S9)であった。以上のことから両物質のAmes変異原性が確認された。

D. 考察

変異遺伝部で作成した 12,140 物質より成る安衛法 Ames 試験データベースについて、陽性が報告されている物質を中心に試験報告書を確認し、より詳細な試験条件をデータベースに追加入力した。確認の過程で誤りがあれば訂正、曖昧な反応については複数の専門家が確認し、判定を確定させた。最終的には 60 物質について判定が変更された (表 1)。

変更となった主な理由は、1) 単純な確認ミスに起因とすると思われ、これまでのデータベース記載のリストと試験報告書との食い違いがあったもの。2) 試験実施機関の判定基準が様々であるため、現在の判断基準に合っていないこと。3) 試験としての判定は陰性だが、QSAR 予測モデル開発の視点から陽性とするのが妥当と判断されたものがある。

1) は数多くのデータを取り扱う上でどうしても生じるものであり、多面的に確認していくことが重要である。当事者による確認には限界があり、継続的な (可能であれば第 3 者による) データのチェックが必要である。

2) については安衛法自体が 50 年に及ぶ歴史があり、試験に対する要求事項も変遷してきている。実際に昭和～平成初期の試験報告書を確認すると、データは 1 試験のみの記載で再現性や用量の妥当性がはっきりしないものが数多くあった。現行の安衛法ガイドラインは基本的には OECD TG471 と同等であるが、それでも試験機関毎に判定基準が異なることがしばしば認められ、特に欧米の試験機関はバックグラウンドのコロニー数が比較的少ない菌株 (*Salmonella typhimurium* TA1535 や TA1537 など) には、

日本で標準的な 2 倍よりも 3 倍以上のコロニー数増加でもって陽性と判断しているところが多い。もちろん安衛法の登録時に当局が審査し、日本の基準に基づいて判定しているが、改めて確認すると解釈が容易でないケースがしばしばあった。更にこれまでは (再現性と用量依存性を併せ) 概ね 2 倍以上のコロニー数増加の有無を陽性の判断基準としてきたが、近年の International Workshop on Genetic Toxicology Testing (IWGT) では、(例えば) 2 倍という基準を機械的に当てはめるのは必ずしも生物学的に妥当とは言えない、と議論されている (Levy *et al.*, 2019)。次に述べる QSAR 予測モデル開発の視点からも、より適切な陽性の判断基準は何かを絶えず自答していかなければならないと考える。

3) は、前回の国際共同チャレンジプロジェクトにて評価した 17 の QSAR 予測モデルの内、全て、あるいは 1 つ以外は全てのモデルが陽性と判定した陰性物質 (偽陽性物質) について試験報告書を確認し、陽性基準 (e.g. 2 倍以上のコロニー数増加) には達していないものの、再現性のある増加傾向が認められた場合は QSAR 開発の視点からは陽性と区分するのが妥当と判断したものである。近年の QSAR 予測モデルは、確かな根拠に基づいて開発され、予測性が大きく向上している。一方、実試験の Ames 試験は試験、あるいは実施機関によるバラツキがあり、必ずしも再現性が担保されたものではない。こうした背景を鑑みるに、QSAR 予測モデルの殆どが陽性と判断したことは妥当性の高い根拠があると考えられ、実試験においても一定の反応が認められれば、その物質を陽性と区分することに合理性が

ある。今後、更に QSAR 予測モデルのパフォーマンスが向上すれば、実試験よりも QSAR 予測結果が変異原性の判断において重要視される時代が来る可能性がある。本データベースでは陰性と判定された 9,129 物質の再評価がまだ残っている (表 1)。今後の課題である。

一方、安衛法以外のデータベースの整備も重要である。ハンセン、CGX、ECVAM 等の Ames 試験データベースが存在するが、多くのデータは古く、また詳細な試験報告書が無い場合も多くある。これらデータベースには基本的な化学構造を有する化学物質が多く収載されており、QSAR モデルの開発に重要である。今回、新たに 2 化合物について Ames 変異原性を確認した。更に試験化合物を増やすことによりケミカルスペースの拡大を目指す。

E. 結論

12,140 物質からなる安衛法 Ames 試験データベースを再評価し、詳細化と精緻化を行った。さらに、他の既存の Ames 試験データベースの精緻化も行った。将来的にはこれらデータベースは統合され、ベンチマークデータセットとして QSAR モデルの開発と改良に利用されることを期待する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 本間正充. 医薬品中の変異原性不純物の安全性評価と管理—ICH-M7 を踏まえた遺伝毒性物質の許容値の設定に関する科学— *PHARM TECH JAPAN*. 2019, 35, 1461-1469.
- 2) 本間正充. 化学物質の遺伝毒性評価と定量的構造相関 ((Q)SAR) . *ポリ衛協*

会報. 2019, 65, 5-25.

- 3) 本間正充. 毒性試験の未来を考える — (定量的) 構造活性相関による化学物質の変異原性評価 — *国立医薬品食品衛生研究所報告*. 2019, 137, 20-31.
- 4) Hasselgren C, Ahlberg E, Akahori Y, Amberg A, Anger LT, Atienzar F, Auerbach S, Beilke L, Bellion P, Benigni R, Bercu J, Booth ED, Bower D, Brigo A, Cammerer Z, Cronin MTD, Crooks I, Cross KP, Custer L, Dobo K, Doktorova T, Faulkner D, Ford KA, Fortin MC, Frericks M, Gad-McDonald SE, Gellatly N, Gerets H, Gervais V, Glowienke S, Van Gompel J, Harvey JS, Hillegass J, Honma M, Hsieh JH, Hsu CW, Barton-Maclaren TS, Johnson C, Jolly R, Jones D, Kemper R, Kenyon MO, Kruhlak NL, Kulkarni SA, Kümmerer K, Leavitt P, Masten S, Miller S, Moudgal C, Muster W, Paulino A, Lo Piparo E, Powley M, Quigley DP, Reddy MV, Richarz AN, Schilter B, Snyder RD, Stavitskaya L, Stidl R, Szabo DT, Teasdale A, Tice RR, Trejo-Martin A, Vuorinen A, Wall BA, Watts P, White AT, Wichard J, Witt KL, Woolley A, Woolley D, Zwickl C, Myatt GJ. Genetic toxicology in silico protocol. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019, Oct; 107:104403. doi: 10.1016/j.yrtph.2019.104403. Epub 2019 Jun 11. PubMed PMID: 31195068.
- 5) Petkov PI, Kuseva C, Kotov S, Honma M, Kitazawa A, Kulkarni S, Schultz TW, Mekenyan OG. Procedure for toxicological predictions based on mechanistic weight of evidences:

Application to Ames mutagenicity.

Computational Toxicology. 2019;12,
doi.org/10.1016/J.COMTOX.2017.02.004

- 6) 本間正充. 食品中に混在する微量な化学物質の安全性評価— 一定量の構造活性相関 (QSAR) による変異原性化学物質の同定— *日本包装学会誌*. 2020, 29, 27-42.

2. 学会発表

- 1) Improvement of Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) Tools for Predicting Ames Mutagenicity. Honma M. 第 47 回欧州環境変異ゲノム学会 (2019 年 5 月、フランス、レンヌ)
- 2) ICH-M7(医薬品中の DNA 反応性不純物の評価と管理)に関するガイドライン, 本間正充, 第 74 回 MMS 研究会定例会 (2019 年 6 月 京都)
- 3) 重大な発がん性物質は変異原性物質である。変異原性物質は *in silico* で予測できる。従って、発がん性物質は *in silico* で予測できる。本間正充, 第 46 回日本毒性学会学術年会 (2019 年 6 月 徳島)
- 4) Ames/QSAR International Challenge Project. Honma M. 第 6 回アジア環境変異原学会、第 48 回日本環境変異原学会 (2019 年 11 月 東京)
- 5) 化学物質のヒト健康リスク評価に対する *in silico* アプローチの開発動向, 山田隆志, 広瀬明彦, 石田誠一, 笠松俊夫, 本間正充, 第 47 回構造活性相関シンポジウム (2019 年 12 月 熊本)

G. 知的財産権の出願・登録状況

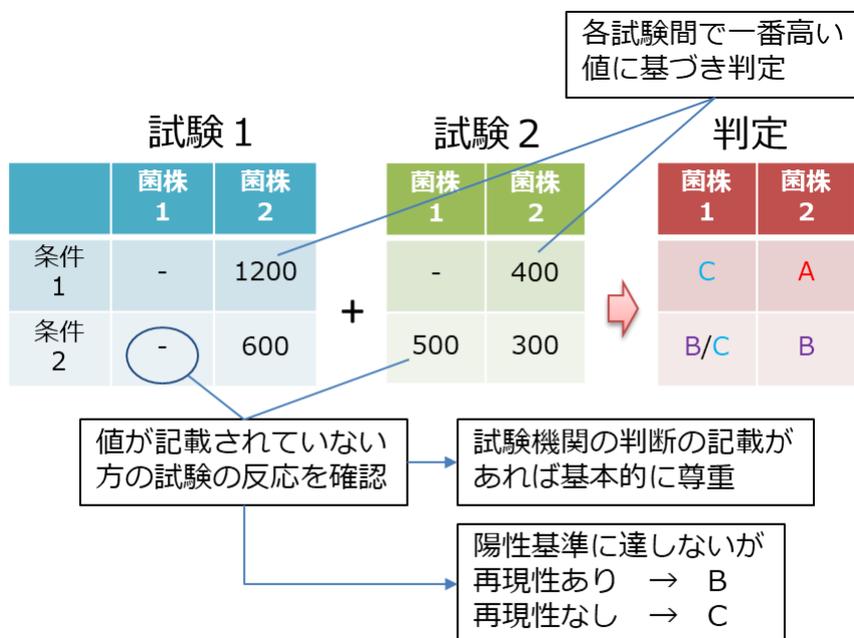
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 安衛法 Ames 試験データベースの再評価のまとめ (令和 2 年 3 月現在)

	A	B	C	Total	Note
Original chemicals (I)	672	1085	10383	12140	
Study report unavailble (II)	44	164	1238	1446	
Re-evaluation possible (III= I-II)	628	921	9145	10694	
Re-evaluation completed (IV)	628	921	16	1565	
Re-evaluation has not be done (III-IV)	0	0	9129	9129	Re-evaluation will be continued.
Corrected	26	18	16		
Increase or decrease by correction	-23	15	2	-6	Not Assingend:6
New training data set (March 11, 2020)	649	1100	10385	12134	

表 2 入力したデータ例

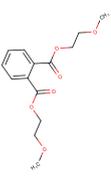
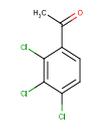
Serial Id	ANEI No.	Registration No.	Ames Result	CAS#	Chemical Name	Structure	Mol Weight	Formula	ANEL Phase	Purity (%)	Solvent	-SR								+SR				
												TA100	TA1535	WPZuvA	T468	TA1537	TA100	TA1535	WPZuvA	T468	TA1537			
21594 (4)-988		2285	A	87269-99-6	N-(2-benzoyl-1-ethoxycarbonyl)ethylamine	<chem>CC(=O)OCC(=O)N(Cc1ccccc1)C</chem>	293.319	C19H19NO5	1	98.3	DMSO	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	
22284 (4)-992		2286	A	15121-89-8	3-benzoylacrylic acid ethyl ester	<chem>CCOC(=O)C=C(C(=O)O)C1=CC=CC=C1</chem>	204.225	C12H12O3	1	95.1	DMSO	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C



上記による判断が容易でない場合 → 専門家による確認

図 1 比活性表による判定スキーム (例)

表 4 2 化合物の Ames 試験結果

Id	Structure	Mol Weight	CAS#	Chemical_name	Hansen Ames result	Derek NX result	reasoning overview	Case Ultra GT1_BMUT result	CASE Ultra BMUT Probability (%)	Ames結果	結果詳細
5864		282.292	117-82-8	bis(methoxyethyl)phthalate	Positive	INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Known Positive	12.4	陽性	<p>本被験物質は代謝活性化非存在下のSalmonella typhimurium TA98及びTA1537並びにEscherichia coli WP2 uvrAにおいて、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超え、かつ陰性対照の平均値の2倍以上に増加させた。また、その増加に用量反応性が認められ、用量設定試験及び本試験により、試験結果の再現性が確認された。最大比活性値は、本試験における代謝活性化存在下のSalmonella typhimurium TA98において、33.8 (5000 µg/plate)を示した。</p> <p>一方、陽性対照は、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、全ての試験において背景データの変動範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある要因についても、何ら認められなかった。</p>
6336		223.48	13608-87-2	2,3,4-trichloroacetophenone	Positive	INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Known Positive	11.3	陽性	<p>本被験物質は代謝活性化存在下のSalmonella typhimurium TA100及びEscherichia coli WP2 uvrAにおいて、用量あたりの復帰変異コロニー数の平均値が背景データの陰性対照の変動範囲の上限を超え、かつ陰性対照の平均値の2倍以上に増加させた。また、その増加に用量反応性が認められ、用量設定試験、本試験及び確認試験により、試験結果の再現性が確認された。最大比活性値は、本試験における代謝活性化存在下のSalmonella typhimurium TA100において、13306 (9.77 µg/plate)を示した。</p> <p>一方、陽性対照は、代謝活性化の有無に関わらず全ての菌株に対して、復帰変異コロニー数を陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の平均値は、全ての試験において背景データの変動範囲内であった。また、無菌試験の結果、雑菌の混入がないことが確認された。これらの結果は、試験が適切に実施されたことを示す。試験の信頼性に影響を及ぼす疑いのある要因についても、何ら認められなかった。</p>