

令和 7 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

研究課題名：Ames/QSAR の化審法新規審査への実装に関する研究

研究代表者： 杉山圭一 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
ゲノム安全科学部

研究要旨

本研究では、化審法新規審査における遺伝毒性評価に使用されている Ames 試験と in vitro 染色体異常試験に関して、Ames 試験については in silico 手法となる Ames/QSAR への移行性、in vitro 染色体異常試験についてはその必要性について検討することを目的としている。

Ames/QSAR ツールの予測性の評価、化審法への実装に向けた改良と戦略に関する研究に関しては、Ames/ QSAR チャレンジプロジェクトで利用した 12,140 化合物からなる Ames 試験データベースを改良し、TA100、TA98 の結果のみからなる新規データベースを構築し、その Ames 変異原性を CASE Ultra（統計ベース）と、DEREK Nexus（知識ベース）の 2 つの QSAR モデルで予測した。2 つの QSAR をバッテリーとした場合、新規データベースでその陽性予測性が顕著に向上した。また、Ames 変異原性に関与する新たなアラート構造も示唆された。Ames/QSAR の予測精度の向上には QSAR モデルの改良だけでなく、Ames 試験法、評価方法の見直しも重要であり、試験結果の再評価と QSAR モデルの改良のクロストークが、科学的かつ現実的な変異原性評価とに繋がるものと考えている。

化審法において Ames 試験を QSAR に代替するための問題点の整理と、その克服法に関する研究については、本年度は化審法の審査シート（2001 年 9 月～2024 年 3 月）から Ames 試験結果を有する 3,225 物質を抽出し、構造情報を整備したうえで、知識ベース型の Derek Nexus および統計ベース型の CASE Ultra を用いて QSAR 評価を行った。その結果、知識ベースと統計ベースの QSAR を併用することで単独使用に比べて感度が向上することが確認された。

化審法における染色体異常試験の整理とその妥当性に関する研究については、本年度は、国内外における染色体異常試験の行政利用の状況を調査し、染色体異常試験とげっ歯類がん原性試験の両方の結果がある医薬品の情報を収集した。染色体異常試験は日米欧の様々な規制で利用されており、リスク評価項目として重視されている現実が確認できた。一方で、げっ歯類発がん性の予測については感度が低く擬陽性も多い様子が見えたが、哺乳類細胞における評価はやはり重要と思われるため、細菌と哺乳類の違いを埋めるには何をすべきか、慎重に考えていく必要がある。

研究分担者

本間正充：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部・客員研究員、国立医薬品食品衛生研究所 名誉所長

三島雅之：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター ゲノム安全科学部・研究助手

研究協力者

正田卓司：国立医薬品食品衛生研究所 有機化学部・室長

山田隆史：国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部・部長

松村奨士：医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 安全性予測評価部・室長

A. 研究目的

Chemical Abstracts Service によると、現在登録されている化学物質は約 3 億種類に達し、毎日約 6 万種類の新規化学物質が登場している。これらの化学物質が環境や人に与える影響を従来の試験法で評価することは現実的に不可能であり、IT 技術や *in silico* 評価手法の活用が不可欠であることは明白である。我が国では、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」（以下、「化審法」という。）の新規化学物質の判定に際して、10 年以上前から *in silico* 評価手法の 1 つである QSAR の導入が検討されており、予測結果が参考データとして提供されてきた。しかし、現時点では実試験の完全な代替には至っていない。一方、2014 年に制定された ICH-M7 では、医薬品不純物の変異原性評価に Ames 試験の代替法として QSAR の利用が認められた。これを契機

に Ames/QSAR ツールの開発や改良が急速に進み、その予測性は遙かに向上した。また、ICH-M7 では Ames/QSAR の利用が定着している。

本研究では化審法においても、QSAR が Ames 試験の代替法として利用可能かを検証する。そのために、現在、化審法で Ames 試験結果の予測に用いられている 2 つの主要な QSAR ツール (DEREK NEXUS、CASE ULTRA) の予測性能を化審法で審議された化学物質のデータベース及び外部データベースにより評価し、利用可能であることを検証する。

一方で、QSAR 結果と Ames 試験結果の不一致を最小化するため、Ames 試験結果の見直しを行い、新たな評価法の提案も行う。標準的な Ames 試験は TA100、TA1535、WP2 *uvrA*、TA98、TA1537 の 5 菌株で実施されているが、TA1535、TA1537、および WP2 *uvrA* 株の結果には生物学的妥当性を欠く陽性反応が見られるとの報告から、TA100、TA98 株のみ評価された新規データベースを構築し、2 つの QSAR モデル (DEREK NEXUS、CASE ULTRA) でその Ames 変異原性を予測し、予測精度の向上を検証する。このように QSAR の予測精度の向上と、Ames 試験結果判定法の見直しの双方向のアプローチが、Ames 試験結果の信頼性と QSAR の予測性の向上に繋がるものと考ええる。

化審法において人健康影響の観点で有害性を判断するための実試験のうち、変異原性試験としては、Ames 試験のほかに染色体異常試験も要求される。しかしながら、染色体異常試験は擬陽性率が高いことや、染色体異常誘発のメカニズムは依然とし

て不明であることも多く、実用化に耐えうる QSAR も開発されていない。医薬品の分野においては ICH-S2 では染色体異常試験を必要としないオプションも提案されているなど、その重要性は低下している。本研究では、化審法の新規化学物質の判定時で染色体異常試験が行われた化学物質をデータベース化し、その陽性結果の生物学的妥当性を Ames 試験や他の毒性試験の結果から再評価し、最終的には、染色体異常試験を再評価し、化審法の新規化学物質届に対して染色体異常試験結果を活用せず評価する場合の影響について検証する。

B. 研究方法

Ames/QSAR ツールの予測性の評価、化審法への実装に向けた改良と戦略に関する研究：2017 年に開催された International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) の Ames 試験グループの報告では TA1535、TA1537、および WP2 uvrA 株の結果には生物学的妥当性を欠く陽性反応が見られ、TA100、TA98 株のみでほとんどの変異原物質を検出するのに十分であるとされた。この報告を受け、Ames/ QSAR チャレンジプロジェクトで利用した 12,140 化合物からなる Ames 試験データベースを改良し、TA100、TA98 の結果のみからなる新規データベースを構築した。データベースには強い陽性(A 物質)、それ以外の陽性(B 物質)が含まれる。今年度は A、B 物質の Ames 変異原性を CASE Ultra (統計ベース) と、DEREK Nexus(知識ベース)の 2 つの QSAR モデルで計算し、その陽性予測性能を評価する。また、2 つの QSAR で陽性予測できない A 物質 (偽陰性) についてその特徴を

明らかにする。

化審法において Ames 試験を QSAR に代替するための問題点の整理と、その克服法に関する研究：化審法での Ames 試験データベースを整備し、陰性、陽性、強い陽性物質の出現頻度を調査した。Ames 試験と QSAR 予測結果と比較した。

化審法における染色体異常試験の有用性に関する研究：本研究では、化審法の新規化学物質の判定時で染色体異常試験が行われた化学物質をデータベース化したが、発がん性に関する情報が無いため、染色体異常試験の発がん性予測に関する評価ができなかった。

染色体異常試験法については、ICH S2(R1)では2011年に、OECDガイドラインも2014年に改定が行われたため、旧来の試験法で実施された公共データベース等の登録データは、現在の試験法の性能評価には適さない。そこで、本年度は、2018年以降に承認申請された新成分医薬品の情報を調査し、染色体異常試験 (またはin vitro小核試験) とげっ歯がん原性試験 (ラット2年間、マウス2年間、rasH2マウス試験のうち1試験以上) の結果がある化合物を選択し、げっ歯類発癌性の予測性について検討した。

なお、背景データ内の異常増加については、陰性とした。げっ歯類発がん性予測についての検討を目的とするため、がん原性試験で増加した腫瘍のヒトへの外挿性については考慮せず、腫瘍の増加があれば発がん性陽性とした。また、国内外における、染色体異常試験の行政利用の状況について調査した。

(倫理面への配慮)

該当項目なし。

C. 研究結果

Ames/QSAR ツールの予測性の評価、化審法への実装に向けた改良と戦略に関する研究：第一回 Ames/ QSAR チャレンジプロジェクトで利用した 12,140 化合物からなる Ames 試験データベースを改良し、TA100、TA98 の結果のみからなる新規データベースを構築した。新規データベースは、A 物質 (強い陽性) : 574 (4.8%)、B 物質 (陽性) : 703 (5.9%)、C 物質 (陰性) : 10,655 (89.3%)、合計 11,932 化合物からなる。旧データベース (12,140) と新データベース (10,655) の化合物の Ames 変異原性を CASE Ultra と、DEREK Nexus の 2 つの QSAR モデルで予測した。A 物質の検出力に関しては、両 QSAR モデルとも新データベースでの検出力の差は顕著でなかったが、B 物質に関しては両 QSAR モデルとも約 5% の検出力の向上が認められた。また、2 つの QSAR モデルをバッテリーとして利用することにより、A 物質の 90%、B 物質の 63% を陽性と判定でき、総合陽性検出力 (A+B) は 75% であり、旧データベースでの 71% を顕著に上回るものであった。また、A 物質でありながら両 QSAR モデルで陽性と判定できない物質が 56 化合物あったが、その内 39 物質については試験報告書から強い陽性が確認された。

化審法において Ames 試験を QSAR に代替するための問題点の整理と、その克服法に関する研究：化審法の審査シート (2001 年 9 月～2024 年 3 月、全 8,598 物質) から Ames 試験結果が付与されている 3,225 物質を抽出し、ポリマーや混合物等を除外し

たうえで構造式から SMILES を作成した。最終的に、解析対象として 1,609 物質を選定した。Ames 試験結果の内訳は、陰性 1,457 物質 (90.6%)、陽性 152 物質 (9.4%) であった。

これらの物質について、代表的な商業 QSAR モデルである Lhasa Limited (UK) の Derek Nexus (ver. 6.2.1, Nexus 2.5.2、以下 Derek) および MultiCASE 社 (USA) の CASE Ultra (GT1_BMUT ver.1.9.0.2/1.8.0.1、以下 CASE Ultra) を用いて QSAR 予測を実施し、Ames 試験結果との比較を行った。その結果、単独使用時には、陰性的中率は Derek で 94.5%、CASE Ultra で 96.4% と高値であった一方、感度はそれぞれ 49.3%、64.2% にとどまった。一方で Derek の知識ベース QSAR と CaseUltra の統計ベース QSAR を併用することにより、陰性的中率は 97.1% を維持したまま、感度が 76.3% へと向上し、単独使用に比べて両指標が同時に改善単独使用に比べて両指標が同時に改善することを確認した。

化審法における染色体異常試験の有用性に関する研究：調査した化合物のうち Ames 試験陽性物質は 2 つのみであった。これらを除いて集計を行った。すなわち、本調査は Ames 陰性化合物についての、げっ歯類発がん予測性評価である。

合計 81 物質を調査対象とした。げっ歯類がん原性試験陽性物質 (1 試験以上で陽性) は 33 物質、陰性は 48 物質だった。染色体異常試験の感度 24%、特異度 77%、陽性適中率 42%、陰性適中率 40% だった。

陽性尤度比は 1.06、陰性尤度比は 0.98 と、いずれも 1 に近く、データの不均衡を補正した Matthews 相関係数は 0.015 と極めて 0

に近い値となり、実用上の有用性が低い可能性がある。

行政における染色体異常試験利用状況は、日米欧ではほぼ同様である。多くの化学物質規制で、Ames 試験と並んで染色体異常試験が利用されている。

D. 考察

Ames/QSAR ツールの予測性の評価、化審法への実装に向けた改良と戦略に関する研究：実際の Ames 試験は GLP で実施されているにも係わらず、その信頼性に疑問が持たれるものが多く存在する。これは、判定が陽性・陰性の定性的であり、そのボーダーラインにあるもの判定は equivocal、もしくは inconclusive とされることが多く、再現性が悪い。特に、TA1535、TA1537、TA102、および WP2uvrA 株の結果はその傾向が高い。その原因は明らかではないが、陽性判定には経験的に 2 倍法（少なくとも 1 用量で 2 倍を超える復帰突然変異体が観察された場合に陽性とする）採用されているため、陰性対照値が低いこれら菌株では容易に 2 倍を超えやすいことなどが考えられる。菌株の選定や、陽性判定法の変更が科学的妥当性の高い Ames 変異原性試験に繋がるものと考えられる。2017 年に開催された International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT) の Ames 試験グループの報告では TA1535、TA1537、および WP2uvrA 株の結果には生物学的妥当性を欠く陽性反応が見られ、TA100、TA98 株のみでほとんどの変異原物質を検出するのに十分であるとされた。この提案に従い、第一回 Ames/QSAR チャレンジプロジェクトで利用した 12,140 化合物からなる Ames 試験データベースを改

良し、TA100、TA98 の結果のみからなる新規データベースを構築し（11,932 物質）、CASE Ultra と、DEREK Nexus の 2 つの QSAR モデルで予測した。今年度は陽性物質（A；強い陽性、B；それ以外の陽性）に注目し（1,277 物質）、その陽性物質検出力（Sensitivity）を評価した。A 物質の検出力に関しては、両 QSAR モデルとも新データベースでの検出力の差は顕著でなかったが、B 物質に関しては両 QSAR モデルとも約 5% の検出力の向上が認められた。この結果は、A 物質の多くは明らかな変異原性物質であり、QSAR の陽性予測に影響を与えないのに対して、B 物質の陽性反応、特に TA100、TA98 以外の陽性結果は曖昧なものが多く、これらを除くことにより、QSAR の陽性予測が向上することを示している。2 つの QSAR をバッテリーとした場合、新規データベースでその陽性予測性が顕著に向上した（71%→75%）。また、陽性物質全体では 53% が両 QSAR で陽性を示し、CASE Ultra 単独では 12%、DEREK Nexus 単独では 10% が陽性を示した。このことは両 QSAR の陽性検出能力はほぼ同様であり、単独では検出できない部分を互いに補っており、2 つの QSAR のバッテリーがスクリーニングとして非常によく機能していることを示している。全体的な予測能力（Accuracy）は次年度に陰性予測率（Specificity）の解析結果を組み合わせる評価する予定である。

一方、A 物質でありながら 2 つの QSAR モデルで陽性と判定できない物質（偽陰性）が 56 物質あった。これら 56 物質の試験報告書を調査し、その陽性反応の強さ、菌株依存性、用量依存性、再現性などを確認した。

その結果、39 物質は明らかな陽性（A 物質は妥当）と判定された。これら物質の化学構造からアラート構造を抽出し、QSAR モデルに組み込むことが重要である。Ames/QSAR の予測精度の向上には QSAR モデルの改良だけでなく、Ames 試験法、評価方法の見直しも重要であり、試験結果の再評価と QSAR モデルの改良のクロストークが、科学的かつ現実的な変異原性評価とに繋がるものと考えらる。

化審法において Ames 試験を QSAR に代替するための問題点の整理と、その克服法に関する研究：Derek および CASE Ultra の単独 QSAR においても、正確度はそれぞれ 87.3%、89.9%と高く、陰性的中率も 94.5%、96.4%と高い値を示した。このことから、QSAR により陰性と判定された化合物の多くが、実験的にも非変異原性であることが確認され、陰性予測に関して一定の信頼性があると判断される。

さらに、2 系統の QSAR を併用すると、単独使用に比べて陰性的中率および感度が向上した。特に inconclusive (inc) および out of domain (OOD) を陽性側として扱う条件（+inc, OOD）では、感度が 76.3%に達し、陽性化合物を見逃す割合が大幅に減少した。一方で、陽性的中率や特異度はわずかに低下したが、これは陰性化合物の一部を陽性と過大に判定したためと考えられる。これらの結果から、2 系統 QSAR の併用により「陽性を見逃さない」方向へ予測が強化され、より保守的な（安全側）評価が実現されていることが分かる。この評価傾向は、化審法におけるリスク回避的な審査方針と整合しており、2 系統 QSAR の組み合わせが化審法における規制評価に有用であること

が示唆される。

化審法における染色体異常試験の有用性に関する研究：染色体異常試験の感度 24%は非常に低い、Ames 陰性化合物を調査対象としたものであり、Ames 試験によって多くの遺伝毒性発がん物質が除外されているはずなので、この数値をもって染色体異常試験の有用性を否定する決定的な材料にはならないと考えるが、Ames 試験が遺伝毒性評価のファーストスクリーニングになっている世間一般の実状を踏まえれば、Ames 試験陰性の場合に、さらに染色体異常試験を実施する意味について、議論が必要かもしれない。

一方で、染色体異常試験の偽陽性率 58%は、依然として高い数値である。発がん性陰性物質の半数以上が染色体異常試験で陽性と判定されてしまう状況は改善しなければならない。陽性尤度比は 1.06、陰性尤度比は 0.98 と、いずれも 1 に近く、データの不均衡を補正した Matthews 相関係数は 0.015 と極めて 0 に近い値となり、実用上の有用性が低い可能性がある。

日米欧では、多くの化学物質規制で、Ames 試験と並んで染色体異常試験が利用されている。Ames 試験菌株では、哺乳類と異なり DNA がクロマチン構造を取らず、細胞内の DNA 存在様式が哺乳類と大きく異なる。さらに、細菌の DNA 修復系は哺乳類とは違うこと、哺乳類細胞のみに遺伝毒性を有する化学物質が存在することが知られており、Ames 試験に加えて哺乳類細胞試験を実施することは理にかなっている。哺乳類細胞のデータなしに有害性を判断することにはかなりの抵抗感があろう。細菌と哺乳類の違いを埋めるにはどうすべきか、

慎重に考えていく必要がある。

E. 結論

Ames/QSAR ツールの予測性の評価、化審法への実装に向けた改良と戦略に関する研究：Ames/QSAR モデルの予測性の向上には信頼性の高い Ames 試験データベースの整備が重要である。 TA1535、TA1537、および WP2 uvrA 株の Ames 試験結果には生物学的妥当性を欠く陽性反応が見られることから TA100、TA98 の結果のみからなる新規データベースを構築した (11,932 物質)。新規データベースには、1,277 の陽性物質が含まれる。その陽性物質の Ames 変異原性を CASE Ultra (統計ベース) と、DEREK Nexus (知識ベース) の 2 つの QSAR モデルで予測した。2 つの QSAR をバッテリーとした場合、新規データベースでその陽性予測性は顕著に向上した。また、Ames 変異原性に関与する新たなアラート構造も示唆された。Ames/QSAR の予測精度の向上には QSAR モデルの改良だけでなく、Ames 試験法、評価方法の見直しも重要である。

化審法において Ames 試験を QSAR に代替するための問題点の整理と、その克服法に関する研究：本研究では、化審法審査シートの大規模データを基盤として 1,609 物質の Ames 試験結果と構造情報を整理し、代表的な QSAR ツール (Derek、CASE Ultra) による予測性能を体系的に評価した。Derek および CASE Ultra の単独 QSAR でも高い陰性的中率と正確度が得られ、陰性化合物の予測には一定の信頼性があることが確認された。さらに、2 系統 QSAR を併用することで感度が大きく向上し、特に

inconclusive および OOD を含めた条件では陽性化合物の見逃しを大幅に低減できた。

これらの結果から、知識ベースと統計ベースの QSAR を併用するアプローチは、化審法における「陽性を見逃さない」安全側評価と整合し、変異原性評価において有用な代替手法となり得ることが示された。今後は、偽陰性化合物の特徴解析や専門家レビュー指針への展開を通じて、QSAR を活用したリスク評価の高度化が期待される。

化審法における染色体異常試験の有用性に関する研究：発がん性ハザード調査において、染色体異常試験には Ames 試験を補完する役割が期待されてきたが、今回の調査では、染色体異常試験は Ames 試験を補完することができないとの結果だった。しかしながら、細菌と哺乳類の違いは大きく、有害性評価における哺乳類細胞の利用は重要と考えられる。染色体異常試験の偽陽性率が高い理由の解明や、細菌と哺乳類の違いを埋められる適切な代替法を提案していくことが、今後の課題である。

F. 健康危険情報

該当項目なし。

G. 研究発表

G.1. 論文発表

- Martus, H. J., Beevers, C., Dertinger, S., Froetschl, R., Godschalk, R., Gollapudi, B., Hashimoto, K., Kirkland, D., Libertini, S., McGovern, T., Sugiyama, K., White, P. and Zeller, A: Summary of major conclusions from the 8th International Workshop on Genotoxicity Testing (IWGT), Ottawa, Canada, *Environ. Mol. Mutagen.* 2025 Dec;66 Suppl 2:3-16..

別添 3

- ・ Masamitsu Honma, Guidelines for the Assessment and Control of Mutagenic Impurities in Pharmaceuticals. Genes and Environment (2025) 47:26.
- ・ Kei-ichi Sugiyama, Ayako Furuhashi, Katsuyoshi Horibata, Masataka Tsuda, Kazuki Izawa, Genichiro Tsuji, Yosuke Demizu, Kohei Matsushita, Takeshi Toyoda, Yoko Hirabayashi, Yoshiro Saito, Masamitsu Honma. Assessment of mutagenic potential of puberulic acid contaminated in red yeast rice (beni-koji) health food supplements. Mutagenesis, (2026) 41, 110-118.

G.2. 学会発表

該当項目なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当項目なし。

2. 実用新案登録

該当項目なし。

3. その他

該当項目なし