

令和2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
研究分担者 古濱 彩子 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 主任研究官
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、定量的構造活性相関（QSAR）ツールの開発を手掛けている事業者は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）。令和元年度に Ames 試験報告書の入手が可能となったことから、本年度は陰性結果が報告されている物質について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、誤りや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。令和元年度に更新・精査したデータベースを用いて、第2回 Ames/QSAR 国際共同チャレンジプロジェクトを始動させた。1,589 物質の予測に挑戦するプロジェクトには、2021 年度末現在、10 か国 19 チームが参加している。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。その他、安衛法に基づき実施された Ames 試験の結果で、被験溶媒や構造に依存して判定が異なると考えられる物質の類似化合物について Ames 試験を実施し、Ames 予測に関する知見の充実を図った。

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*in silico*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*in silico*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*in silico*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*in silico*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。日本では労働安全衛生法（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）。

令和元年度より、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、令和2年度は試験結果の85%を占め、未着手部分が大半の陰性データを中心に、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、第2回Ames/QSARチャレンジプロジェクトを実施する際に提供することやQSAR予測精度向上に資する考察およびAmes実試験を実施した。以上の取り組みにより、更に予測性の高い*in silico*予測モデルの開発に寄与することを本課題の目的とする。

B. 研究方法

B.1. 詳細Ames試験データベースの整備

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 C：陰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。

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。なお、陽性物質1549と陰性物質16の結果は令和元年度に評価済である。

B.2. 第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトの始動

令和元年度評価したデータベースでは、12,140物質のうち6物質は、評価不能になったことから12,134物質のAmes試験結果と評価済のデータベースを学習データとして、新たに1589物質の予測に挑戦する第2回Ames/QSARチャレンジプロジェクトを始動した。2020年2月12日に国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部のホームページに第1報を掲載した (図1)。

ホームページには、QSARツールの開発を手掛けている事業者だけではなく、大学などのアカデミアなどからの参加を求める旨記載した。参加表明がなされたチームとは機密保持契約への署名を求めた。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署名が得られた参加チームに昨年度整備したデータベースを学習データとして、新

たに予測を実施する1589物質の情報 (構造SMILES、物質名称、CAS番号、SDFファイル) を提供した。予測結果の提出期限は令和2年12月31日に定めた。また、令和2年4月以降も参加希望をしたチームに対する受付を継続的に実施した。

B.3. Ames試験の実施による試験結果の確認と検証

ハンセンデータベースに記載の以下の3化合物についてAmes試験を実施した。

- ① *p*-nitrotoluene (CAS番号 99-99-0)
- ② 1-chlorobutane (CAS番号 109-69-3)
- ③ 2,5,8,11-tetraoxadodecane (CAS番号 112-49-2)

また、安衛法試験報告書で同じ構造を有するが、ナトリウム塩を形成し、互変異性体を取りうる物質 (図2) において、非イオン構造図2-(1)では陽性判定 (被験溶媒DMSO)、イオン構造図2-(2)では陰性判定 (被験溶媒 水) が存在する。置換基 (R_1 、 R_2 、 R_3) をすべて水素に置換した化合物について、溶媒依存性も考慮して、以下の3Ames試験を実施した。

- ④ 1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione (CAS番号 86-93-1 DMSO溶媒)
- ⑤ 1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione (CAS番号 86-93-1 アセトン溶媒)
- ⑥ Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate (CAS番号 15052-19-4)

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Class C陰性物質6149に上った。再評価物質のまとめを表1に示す。青枠内が令和元年度から更新された内容である。

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+/-)

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。Class Cの33物質の判定がClass B(陽性)に変更された(表1)。再判定結果と、判定結果の理由を表3に示す。

残り2980陰性物質の評価を令和3年度中に実施し、データベースの最終化を図る。

C.3. 第2回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクトの実施

本プロジェクトには10か国19チームが参加し、QSAR予測に取り組んだ。参加チーム名(所属)と国名は表4に示す。令和2年3月16日の始動の段階では、13チームが参画し、令和2年4月以降に6チームから新たにプロジェクトの参加表明があった。19チームのうち約半数の9チームが第1回Ames/QSAR国際チャレンジプロジェクト参加チームに該当し、第1回の成果との比較が可能であった。第1回と第2回プロジェクトの概要の比較は表5の通りであり、第1回プロジェクトではPhase IからPhase IIIまで3回のトライアルを実施したが、第2回プロジェクトでは1回のトライアル(Phase IVと呼ぶ)のみを実施した。なお、第1回よりも参加チーム数・国数も増加するとともに、QSARソフトウェアを開発する事業者以外のアカデミア・大学関係機関からの参加が増えた。

令和2年12月31日の予測結果提出期限に間に合わないチームがいくつか見られたが、令和3年3月末現在、全19チームからの回答が得られた。計算化学ソフトウェアMOEを用いて予測結果を解析中である。

C.4. 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6には令和2年度に行った3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ており、陰性の2化合物 (*p*-nitrotolueneと1-chlorobutane) は、Derek Nexusでは陽性、Case Ultraでは既存の陰性(Known negative)とされている。しかしながら、Case UltraでのQSARによる陽性率はそれぞれ、88.6%、85.1%と高く、陰性結果には疑問が残る。ハンセンデータベース陽性の2,5,8,11-tetraoxadodecaneは、Derek Nexusでは陰性、Case Ultraでは既存の陽性(Known positive)とされている。しかしながら、Case UltraでのQSARによる陰性確率は9.5%であり、陰性結果に疑念がある。

プレインキュベーション法によるAmes試験を実施したところ、3化合物全てにおいて陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加も見られなかった。このことから陰性が確認された。

C.5. 構造依存性と溶媒依存性の検討と実証に向けたAmes試験の実施

QSARによるAmes変異原性の予測精度は8割余に向上したことから、*in silico*評価の活用も実用化しつつあり、その精緻化が発がん性の予測にも寄与する。しかしながら、2次元構造に基づくQSARによるAmes予測では、被験溶媒や互変異性体構造の安定性、それらに起因する三次元立体構造の相違がAmes試験結果にどの様に影響するのかは議論が十分でない。通常、化合物の構造異性

体や塩形成物は、同じAmes判定を示すと考えられているが、例外もある。例えば、図2で示す互変異性体を形成する物質（ここでは、R₁、R₂、R₃の一部またはすべてが水素以外の置換基の物質）では、安衛法の試験結果で、塩を形成しない物質図2-(1)では陽性(被験溶媒 DMSO)、塩を形成し、水溶液中でイオン化する物質図2-(2)では陰性(被験溶媒 水)の報告がなされていた。構造の相違と溶媒がAmes試験に寄与することが考えられる。

表7には、置換基 (R₁、R₂、R₃) をすべて水素に置換した化合物である1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione と Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolateについて、それぞれの互変異性体でのAmes/QSAR予測結果を示した。前者は水に不溶な物質であり、後者は水に可溶であることから、それぞれ非イオン、イオン構造を入力構造とした。Derek Nexusの予測結果は非イオン・イオンで同一であるが、Case Ultraの予測では、非イオン構造の互変異性体の一部で陽性(Positive)を示し、陽性確率が65.1%であった。これはトリアジン様構造を有することで、S_N1求核反応によるDNA付加体形成を起こしてAmes陽性につながる(Enoch *et al.* 2012)ことで説明がつく。更に、非イオン構造は芳香族チオール構造をとりうることから、DMSO溶媒中で芳香族に結合したチオール基が酸化反応を起こし、ジスルフィド結合を結合して別の物質を形成(佐藤武雄, 1965)する可能性もあるため、溶媒を考慮に入れた試験も検討する必要があった。

構造及び溶媒の依存性を検証するために実施した1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione と Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate に対

する3試験の結果を表8にまとめた。DMSO、アセトン、水、いずれの溶媒のAmes試験も、プレインキュベーション法で実施され、被験物質の沈殿や生育阻害もみられず、2倍以上のコロニー数の増加と用量反応性も認められず、陰性と確認された。

この他、1-phenyl-2H-tetrazole-5-thioneとSodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate に対するMOPAC2016プログラムのPM7ハミルトニアンによる量子化学計算を実施したが、イオン・非イオン構造での比較は容易ではなく、更なる考察と検討が必要であった。

安衛法で実施された物質については置換基 (R₁、R₂、R₃) がAmes判定に影響を及ぼしたことが考えられることから、置換基効果を考慮した更なる検討と解析が必要である。

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。昨年度判定が変更された 60 物質に加え、33 物質について判定が陰性から陽性に変更された (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。詳細については昨年度報告書で考察したので割愛する。

本データベースでは陰性と判定された 3000 物質弱の再評価がまだ残っている (表 1) が、令和 2 年度の進捗状況から、令和 3 年度中に評価することが可能な範囲である。これらのデータベースは、今後実施が見込まれる Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトでの基礎データとして重要な役割を担い、Ames 試験の溶媒依存性の説明付けなどにも活用が期待される。例えば、QSAR 開発者には、被験物質の純度が低い物質を学習データから除外することで予測精度向上を目指す選択肢が与えられる。アシルハライドもしくはスルホニルハライドの試験では、DMSO 溶媒を用いると副反応で変異原性を有する物質が生成し、溶媒の種類によって Ames 試験結果が異なる (Amberg *et al.*, 2015) 懸念があるため、詳細なデータベース情報が学習データのキュレーションの一助を担うことが期待される。

昨年度精査した安衛法 Ames 試験データベースを学習データとして、第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトを始動させ、前回よりも多種多様なチーム (所属)・モデルによる QSAR 予測結果 (表 5) が得られた。また、前回参加したチームの 75% に相当する 9 チームから継続的な参加を受け、QSAR モデルの更なる改良が期待される。今後、各チームから受け取った予測結果データの解析を進め、モデルや学習データ構築方法などの改善点の提示を含め、QSAR モデルのボトムアップを図る提案を目指す。

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3化合物について Ames 変異原性を確認し、1化合物についてハンセンデータベースや Case Ultra に収集されたデータベースの結果とは異なる結果と詳細情報を得られた。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充を目指す。

また、詳細なデータベースで得られる情報を活用して、互変異性体を取りうる物質やその塩に関して、判定が異なる要因を考察し、溶媒を考慮した Ames 試験を実施し、要因解明の一助を担った。今後、実際に安衛法で試験された物質と比較検証を含めた量子化学計算による調査・研究を実施することで、Ames 判定の要因解明と予測の高度化が期待できる。

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成果を反映して第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトを始動した。さらに、他の既存の Ames 試験データベースの精緻化と構造および溶媒依存性に関する解析と評価も行った。将来的にはこれらデータベースや蓄積された知見は、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) Honma M. An assessment of mutagenicity

of chemical substances by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 2020; 42:23. doi: 10.1186/s41021-020-00163-1. PMID: 32626544.

- 2) Van Bossuyt M, Raitano G, Honma M., Van Hoeck E, Vanhaecke T, Rogiers V, Mertens B, Benfenati E. New QSAR models to predict chromosome damaging potential based on the *in vivo* micronucleus test. *Toxicol Lett.* 2020; 329: 80-84. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.04.016. PMID: 32360788.
- 3) Honma M., Kitazawa A, Kasamatsu T, Sugiyama KI. Screening for Ames mutagenicity of food flavor chemicals by (quantitative) structure-activity relationship. *Genes Environ.* 2020; 42:32. doi: 10.1186/s41021-020-00171-1. PMID: 3329276

2. 学会発表

- 1) Regulatory Science and Emerging Technology in Japan. Honma M. Global Summit Regulatory Science 2020 (2020年9月 Online, USA)
- 2) 化学物質の変異原性 *in silico* 評価の精緻化：第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 第6回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム (2020年11月 Online, 島根)
- 3) Assessment and Control of Mutagenic Impurities in Pharmaceuticals, Honma M. The 5th International Webinar Conference on Pharmaceutical Quality Regulatory

Sciences (2020年11月 Online, Korea)

- 4) 医薬品中に存在する変異原性不純物の評価と管理手法の最新動向, 本間正充, 第22回 インターフェックス ジャパン セミナー (2020年11月 幕張)
- 5) 異性体に対する Ames 予測の試みと 2nd Ames/QSAR International Challenge Project の状況, 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充, 日本環境変異原学会第49回大会 (2020年11月 沼津)
- 6) 生活環境で極低レベルで摂取する遺伝毒性発がん物質の安全性評価と管理, 本間正充, 日本環境変異原学会第49回大会基調講演 (2020年11月 沼津)
- 7) ICH-M7 ガイドラインの基本的事項、Q&A の解説及び最近のトピック, 本間正充, 令和2年度関西医薬品協会技術研究委員会研修講演会 (2020年12月 Online, 大阪)

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



The 2nd AMES/QSAR International Challenge Project

1st Announcement

February 12, 2020

Previously, we conducted the Ames/QSAR International Challenge Project with 12 QSAR vendors to validate and improve their QSAR tools for predicting Ames mutagenicity of chemical substances (<https://www.nihs.go.jp/dgm/amesqsar.html>). The outcome of the project was published in a special issue of *Mutagenesis* (Honma et al., *Mutagenesis* 34, 2-16, 2019). The paper is available [here](#). The paper got good reputation and was received the best paper award of *Mutagenesis* recently. We were convinced that this project was a great success and provided a lot of benefit to QSAR vendors, QSAR users, and regulatory authorities involved in the evaluation of mutagenicity of chemical substances.

Now, we announce to start the 2nd AMES/QSAR International Challenge Project. During recent 5 years, new Ames test results (about 1,600 chemicals) have been accumulated in our Ames database. Using these chemicals as challenge chemicals, we will start the 2nd AMES/QSAR challenge project shortly. If you are interested in participating the new project. Please contact with us as soon as possible. Not only QSAR vendors, but also researchers in academia are very welcome for the participation. Advanced *in silico* models using deep learning or AI are also welcome. We hope that a lot of *in silico* researchers will participate the new project.

Division of Genetics and Mutagenesis,
National Institute of Health Sciences

Kei-ichi Sugiyama (sugiyama@nihs.go.jp)
Ayako Furuhashi (ayako_furuhashi@nihs.go.jp)
Masamitsu Honma (honma@nihs.go.jp)

[変異遺伝部ホームページへ戻る / Back to DGM homepage](#)

Copyright © Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Sciences. All rights reserved.

図1 第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの第1報

http://www.nihs.go.jp/dgm/2nd_amesqsar.html

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

Class	A	B	C	計	Note
総化合物数：第1回プロジェクト直後 (A)	672	1085	10383	12140	
試験報告書が無いもの (B)	44	164	1238	1446	所在確認取れず
試験報告書があり評価が可能な物 (C=A-B)	628	921	9145	10694	
実際に評価した物 (D)	628	921	16	1565	
未評価化合物数 (F=C-D)	0	0	9129	9129	
専門家判断により評価結果が訂正された物 (E)	26	18	16		
専門家判断前後の評価Class増減 (E')	-23	15	2	-6	評価不能 (6)
令和2年3月地点での判定結果 (B+D+F+E')	649	1100	10385	12134	
総化合物数：第2回プロジェクト直前 (A')	12134				
評価物質数 (第2回プロジェクト開始～令和3年3月末)	0	0	6149	6149	
未評価物質数	0	0	2980	2980	
専門家判断による評価結果訂正数	0	0	33	33	
専門家判断前後の評価Class増減	0	33	-33	0	
2021年3月末地点での判定結果	649	1133	10352	12134	

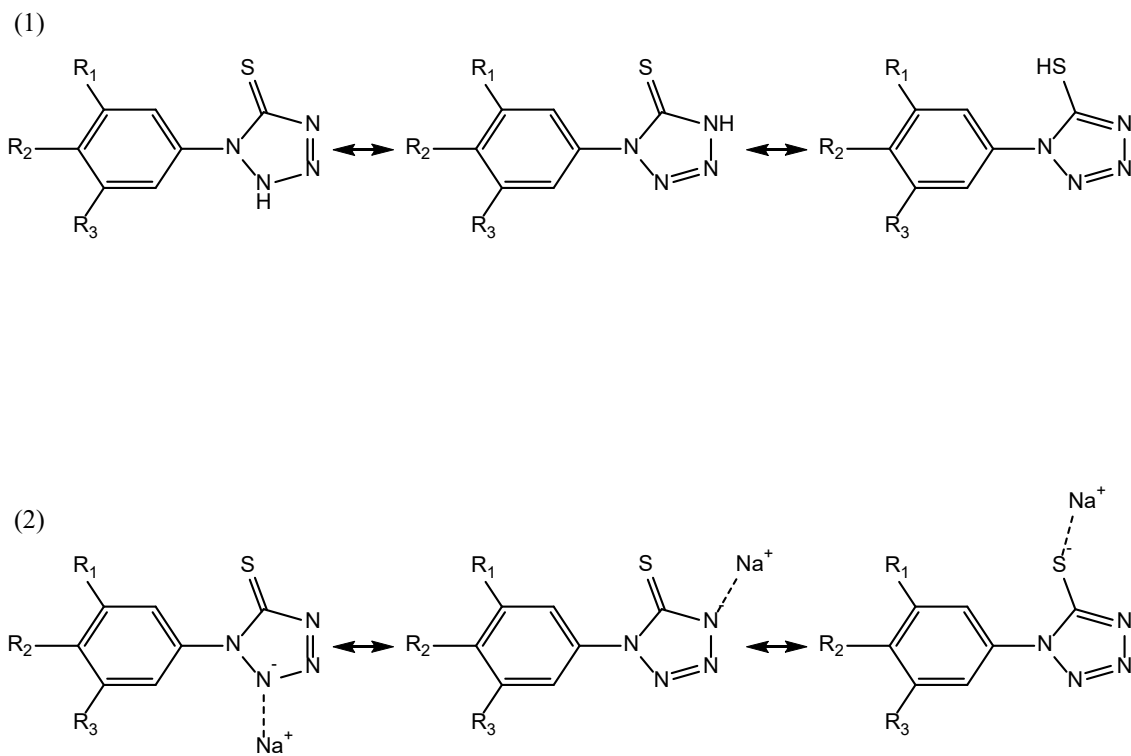


図2 1-Phenyl-2H-tetrazole-5-thione とそのナトリウム塩の互変異性体

表2 入力したデータ例

Serial Id	JNEI No.	Registration No.	Ames Result	CAS#	Chemical Name	Structure	Mol Weight	Formula	JNEI Ph asc	Purity (%)	Solvent	-S8				+S8					
												TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
2159	4-(4)-888	2285	A	97269-99-6	N-(2-benzoyl-1-ethoxycarbonylethyl)az...	<chem>*[*]C@([*])C(=O)NC(=O)C1=CC=CC=C1[*]</chem>	293.319	C15H19NO5	1	98.3	DMSO	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C
2228	4-(4)-992	2286	A	15121-89-8	3-benzoylacrylic acid ethyl ester	<chem>CCOC(=O)C=C(C(=O)C1=CC=CC=C1)</chem>	204.225	C12H12O3	1	95.1	DMSO	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C

表4 第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト参加チーム

No	チーム	国名	参加表明	備考
1	Shanghai Institute of Organic Chemistry	China	令和3年3月以前	
2	Alttox Ltd.	Brazil	令和3年3月以前	
3	Molecular Networks GmbH and Altamira, LLC (MN-AM)	USA	令和3年3月以前	前回参加
4	Leadscope, Inc.	USA	令和3年3月以前	前回参加
5	Institute di Ricerche Farmacologiche Mario Negri	Italy	令和3年3月以前	前回参加
6	IdeaConsult Ltd.	Bulgaria	令和3年3月以前	前回参加
7	MultiCASE Incorporated	USA	令和3年3月以前	前回参加
8	Lhasa Limited	UK	令和3年3月以前	前回参加
9	Istituto Superiore di Sanità (ISS)	Italy	令和3年3月以前	前回参加
10	Gifu University	Japan	令和3年3月以前	
11	Massachusetts Institute of Technology (MIT)	USA	令和3年3月以前	
12	Simulations Plus, Inc.	USA	令和3年3月以前	前回参加
13	Chemotargets	Spain	令和3年3月以前	
14	LMC (Laboratory of Mathematical Chemistry), Bourgas University	Bulgaria	令和3年4月以降	前回参加
15	The University of Sydney	Australia	令和3年4月以降	
16	Meiji Pharmaceutical University	Japan	令和3年4月以降	
17	Liverpool John Moores University	UK	令和3年4月以降	
18	Evergreen AI	Canada	令和3年4月以降	
19	Politecnico di Milano	Italy	令和3年4月以降	

表5 第1回と第2回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクトの比較

	第1回プロジェクト	第2回プロジェクト
時期	2014-2017	2020
参加チーム数	7か国12チーム	10か国19チーム
評価回数 (予測物質数)	3回 (Phase I:3902, Phase II:3829, Phase III:4409)	1回 (Phase IV:1589)
学習データ数	Phaseごとに異なる (Phase IIはなし、Phase IIIはI、Phase IIIはIとIIをトレーニングデータとして使 用)	12134 (Phase I-IIIの学習データのうち、6 物質は判定不能になったため12134 物質のAmes試験情報の提供)
参加者	半数は商業ソフトウェアを開発する QSARベンダー	アカデミアからの参加が増加
モデル	統計ベース、ルールベース、コンセン サスモデル	統計ベース、ルールベース、コンセン サスモデルに加え人工知能(AI)を用 いた予測手法を行うチームも参画

表 6 3 化合物の Ames 試験結果

CAS番号	物質名	構造	Hansen DBの結果	Derek MX result and Alert Nexus v220 Derekx v1	Inactive reason Nexus v220 Derekx v1	CASE ULTRA GT1_BMUT Results 1802 Probability (%)	Ames実施結果	溶媒	結果詳細
99-99-0	p-nitrotoluene		陰性	PLAUSIBLE #329 Aromatic nitro compound		Known Negative 88.6	陰性	DMSO	本試験用量を設定するため、122、488、195、701、313、1250、5000 μg/plateの複数濃度経用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において復帰変異コロニー数の増加が認められなかったため、全用量の認められた経用量の1250 μg/plateを最高用量として以下公比2で除した313、156、313、625、1250 μg/plateの5用量で本試験を実施した。 1) 試験物質による代謝、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生用阻害、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度の625 μg/plate以上の用量で認められた。 3) 復帰変異コロニー数：用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。以上の試験結果より、本試験条件下においてp-nitrotolueneは、細菌に対する遺伝子変異誘発剤とみなされず(陰性)と判定した。
109-69-3	1-chlorobutane		陰性	PLAUSIBLE #027 Alkylating agent		Known Negative 85.1	陰性	DMSO	本試験用量を設定するため、122、488、195、701、313、1250、5000 μg/plateの複数濃度経用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において復帰変異コロニー数の増加が認められなかったため、全用量の認められた経用量の5000 μg/plateを最高用量として以下公比2で除した150、313、625、1250、2500、5000 μg/plateの6用量で本試験を実施した。 1) 試験物質による代謝、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生用阻害、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度の2500 μg/plate以上の用量で認められた。 3) 復帰変異コロニー数：用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。以上の試験結果より、本試験条件下において1-chlorobutaneは、細菌に対する遺伝子変異誘発剤とみなされず(陰性)と判定した。
112-49-2	2,5,8,11-tetraoxadodecane		陽性	INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Known Positive 9.5	陰性	水	本試験用量を設定するため、122、488、195、701、313、1250、5000 μg/plateの複数濃度経用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において、復帰変異コロニー数の増加、生用阻害及び毒性が認められなかったため5000 μg/plateを最高用量として以下公比2で除した313、625、1250、2500、5000 μg/plateの5用量で本試験を実施した。 1) 試験物質による代謝、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生用阻害、代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの濃度においても認められなかった。 3) 復帰変異コロニー数：用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての濃度において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。以上の試験結果より、本試験条件下において2,5,8,11-tetraoxadodecaneは、細菌に対する遺伝子変異誘発剤とみなされず(陰性)と判定した。

表 7 互変異性体構造に依存した QSAR 予測結果*

CAS no. 86-93-1 1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione	Derek NX result v230	Derek Nx reasoning overview v230	CASE ULTRA GT1_BMUT Results 1802 (probability)	CAS no. 15052-19-4 Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate	Derek NX result v230	Derek Nx reasoning overview v230	CASE ULTRA GT1_BMUT Results 1802 (probability)
	INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Negative (16.3 %)		INACTIVE	No misclassified or unclassified features	Out of Domain (16.3 %)
	INACTIVE	Contains unclassified features	Inconclusive (41.0 %)		INACTIVE	Contains unclassified features	Out of Domain (10.8 %)
	INACTIVE	Contains unclassified features	Positive (65.4 %)		INACTIVE	Contains unclassified features	Inconclusive (41.2 %)

*Sodium salt (CAS no. 15052-19-4) では、水中での挙動を模倣して、イオンを入力構造として指定した。

表 8 溶媒を考慮にいれた Ames 試験結果

CAS番号	物質名	Ames実施結果	溶媒	結果詳細
86-93-1	1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione	陰性	DMSO	<p>本試験用量を設定するため、1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、復帰変異コロニー数の増加、生育阻害及び沈殿が認められなかったため5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$を最高用量として以下公比2で除した313、625、1250、2500、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$の5用量で本試験を実施した。</p> <p>1) 被験物質による沈殿: 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生育阻害: 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。 3) 復帰変異コロニー数: 用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において1-phenyl-2H-tetrazole-5-thioneは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発性を有さない(陰性)と判定した。</p>
86-93-1	1-phenyl-2H-tetrazole-5-thione	陰性	アセトン	<p>本試験用量を設定するため、1.22、4.88、19.5、78.1、313、1250、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$の被験物質処理用量で用量設定試験を実施した。その結果、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、復帰変異コロニー数の増加、生育阻害及び沈殿が認められなかったため5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$を最高用量として以下公比2で除した313、625、1250、2500、5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$の5用量で本試験を実施した。</p> <p>1) 被験物質による沈殿: 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの用量においても認められなかった。 2) 生育阻害: 代謝活性化の有無にかかわらず、いずれの菌株においても認められなかった。 3) 復帰変異コロニー数: 用量設定試験及び本試験において、代謝活性化の有無にかかわらず、すべての菌株において、陰性対照値の2倍以上となる復帰変異コロニー数の増加は認められず、用量反応性も認められなかった。</p> <p>以上の試験結果より、本試験条件下において1-phenyl-2H-tetrazole-5-thioneは、細菌に対する遺伝子突然変異誘発性を有さない(陰性)と判定した。</p>
15052-19-4	Sodium 1-phenyl-1H-tetrazole-5-thiolate	陰性	水	<p>本被験物質は、代謝活性化の有無に関わらずいずれの菌株、いずれの用量段階においても復帰変異コロニー数を用量反応的に増加させず、それぞれの陰性対照と比較して2倍以上の増加も示さなかった。被験物質処理の用量あたりの復帰変異コロニー数は、全ての用量において、背景データから算出したそれぞれの陰性対照の変動範囲の上限を超えなかった。また、用量設定試験及び本試験において、試験結果の再現性が確認された。陰性対照群は、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それぞれの陰性対照の2倍以上に増加させた。陰性対照及び陽性対照の復帰変異コロニー数の平均値は、用量設定試験及び本試験のいずれにおいても、背景データから算出した変動範囲の範囲内であった。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。これらの結果から、試験が適切に実施されたと判断した。</p> <p>以上の結果より、本試験条件下において本被験物質は遺伝子突然変異誘発性を有しないと判定した。</p>