

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）

*In silico*予測手法の高度化とNew Approach Methodologyの活用に基づく化学物質の
統合的ヒト健康リスク評価系の基盤構築に関する研究

令和3年度 分担研究報告書

遺伝毒性評価に資する Ames/QSAR の深化

研究分担者	杉山 圭一	国立医薬品食品衛生研究所	変異遺伝部 部長
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

研究要旨

行政での活用が進んでいる *in silico* 遺伝毒性評価手法のひとつである定量的構造活性相関（QSAR）を用いた Ames 変異原性予測（Ames/QSAR）の高精度化を目的として、国際共同研究の実施と Ames 変異原性データの精緻化を進めた。令和 3 年度は、2020 年に始動した第 2 回国際共同研究プロジェクト（Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト）の参加チームから得られた結果の概要を解析し、予測結果の傾向（低感度、高特異度）の考察を行った。更に、第 2 回同プロジェクトで学習データとして提供している労働安全衛生法安衛法に基づき実施された Ames 試験結果は、平成 31 年度に報告書が入手可能となった。平成 31 年度以降、継続して実施している Ames 試験結果の専門家判断を完了させ、QSAR に用いるためのデータベースにおける判定の精査を終えた。加えて、QSAR の構築に利用されている既存データベースの更新を図るため、Ames 試験を実施した。

A. 研究目的

本研究課題では、Ames 変異原性を対象とした定量的構造活性相関（QSAR）の高度化を行い遺伝毒性評価に資する *in silico* 予測手法の深化を目指す。Ames 変異原性については、これまで安衛法試験結果を新規データセットとして世界中の QSAR ベンダー等に提供することにより、QSAR モデルの改良を目指す第 1 回および第 2 回国際共同研究プロジェクト（Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト）を先導してきた。特に、完了した第 1 回同プロジ

ェクトの成果は予測精度の向上に貢献を果たしてきた。令和 3 年度は、第 2 回同プロジェクトの取りまとめを進めるとともに、新規データの追加と、専門家による既存試験データの再評価を実施することにより高信頼性のデータセットを完成させる。新規データの追加の一環として、QSAR 予測の向上に資する改良に必要な Ames 変異原性試験の収集の方針の決定と実試験実施を進めることとする。

B. 研究方法

QSAR による Ames 予測精度向上に必須となる高信頼性のデータセットを開発するため、B1.試験結果の再評価と B2.Ames 変異原性試験を実施し、B3.第 2 回 Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト（以下、第 2 回プロジェクトと記載）の概要の口頭発表を通して、プロジェクトを展開させた。

B1. 試験結果の再評価

再評価対象は 12140 物質の安衛法試験結果である。安衛法試験結果の詳細等については、厚生労働行政推進調査事業費（化学物質リスク研究事業）「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）」における平成 31 年度および令和 2 年度分担研究報告書「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」に記載されている。

精査に用いる結果報告書のうち、令和 2 年度末現在で入手可能なのは 10694 物質であった。また、平成 31 年度で、A 判定（Ames 試験における比活性値が 1,000 rev/mg 以上であり、強い陽性と判定される物質）および B 判定（Ames 試験における比活性値が 1,000 rev/mg 未満である陽性判定される物質）は全て評価を終えており、平成 31 年度以降は C 判定（Ames 試験における陰性判定される物質）の評価途中であった。令和 3 年度は、再評価が実施されていない C 判定の 2980 物質に対する精査を進めた。

B2. Ames 変異原性試験

本課題内で実施可能な Ames 試験数は限られていることから、変異原性・遺伝毒性の懸念が高い物質であり、医薬品不純

物の懸念からも注目されている N-ニトロソ化合物を研究対象とし、ローカル QSAR の構築や知識ベース QSAR の基盤となるアラート構造の精緻化に資する知見を得ることとした。令和 3 年度は特に、芳香環が直接 N-ニトロソと結合した芳香族 N-ニトロソ化合物に注目し、6 物質の Ames 試験を計画した。また、今回対象とした物質は、既存の QSAR モデルの構築に広く使用されている Hansen らの報告（Hansen データベース, K. Hansen, et al, *J. Chem. Inf. Model.*, **49** 2077-2081, 2009）にも Ames 変異原性情報（陽性・陰性）が存在した。

Ames（細菌を用いる復帰突然変異）試験は全て外部委託により「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」（平成 23 年 3 月 31 日付け、薬食発 0331 第 8 号厚生労働省医薬食品局長、平成 23・03・29 製局第 6 号経済産業省製造産業局長、環境企発第 110331010 号環境省総合環境政策局長通知）に適合する試験施設において、準 GLP で実施した。OECD 試験ガイドライン TG471 に準拠し、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を判定する試験を行った。

B3. 第 2 回プロジェクト

2020 年に始動し、現在進行中の第 2 回プロジェクトについて、参加チームから得られた結果の精査と共有を行い、国内外での学会発表を通じて構築したネットワークを基に、行政にかかわりのある所属に対し参加の窓口を開いた。

（倫理面への配慮）本研究課題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

C1. 試験結果の再評価

複数名の遺伝毒性専門家による Ames 試験結果の精査を実施したところ、令和 2 年度末の評価で C 判定であった 2980 のうち 17 物質について陽性 B 判定の専門家判定を下した。なお、15 物質の報告書については、一部欠落などで評価不能であり、C 判定のままとした。

最終的な専門家判断では、A 判定 649、B 判定 1150、C 判定 10335、合計 12134 (評価不能 6) の分類となった。評価前の A 判定 672、B 判定 1085、C 判定 10383、合計 12140 からは、A 判定 26 物質、B 判定 18 物質、C 判定 66 物質に対し、評価の変更が行われた。評価の変更理由については、表 1 に示した。

第 2 回プロジェクトの参加チームへの提供時および、今回取りまとめを終えた精査の最終結果を表 2 に示す。第 2 回プロジェクト始動以降、B 判定の物質が 50 物質増、C 判定の物質が 50 物質減となった。試験報告書が存在する 10679 物質のデータのうち 110 物質において判定の変更が行われ、全体として 1.03% の物質の判定が精査により変更となった。

C2. Ames 変異原性試験

表 3 に示した 6 物質の芳香族 N-ニトロソ化合物を Ames 試験の実施対象とした。n-nitrosodibenzylamine は N-ニトロソが直接フェニル基に結合した構造ではないが、N-methyl-N-phenylnitrous amide の類似構造として実試験対象とした。

対象とした 6 物質のうち Hansen データベースでは N-methyl-N-phenylnitrous amide 以外の 5 物質が陰性の報告であった。一方で、統計ベース QSAR である CASE ULTRA GT1_BMUT モデル (version 1.8.0.1)

における陽性の可能性の高さは全ての物質において 98% 以上であり、以下の 4 物質

- 3-nitrosomethylaminopyridine
- 4-nitrosomethylaminopyridine
- n-nitrosodibenzylamine
- N-methyl-N-phenylnitrous amide

は既知の陽性(Known Positive)、残り 2 物質は既知の陰性(Known Negative)の予測結果となった。ただし、6 物質全てで陽性確率(Probability)が 98% 以上であり、既知の毒性情報がなければ陽性予測に該当する物質となった。知識ベース QSAR である Derek Nexus (version 6.1, Nexus version 2.3.0) では N-methyl-N-phenylnitrous amide 以外の 5 物質が陽性 (PLAUSIBLE) の予測結果となった。5 物質において Hansen データベースの Ames 陽性・陰性と QSAR 評価結果が一致していなかった。令和 3 年度 Ames 試験の実施を終え、6 剤のうち 5 剤で陽性の結果であった。Hansen データベースに記載された根拠となる原著論文の精査等、結果の解析を進めおり、令和 4 年度以降考察を進めていく。

C3. 第 2 回プロジェクト

2020 年に参加した 19 チームの間では結果の概要に相当する予測精度の指標(感度 (Sensitivity) : 陽性物質を陽性と判定できる能力、特異度 (Specificity) : 陰性物質を陰性と判定できる能力、精度 (Accuracy): 総合判定能力、など)情報の共有は行ったが、2022 年 3 月末現在、参加チーム以外には指標の値を公開していない。第 48 回 日本毒性学会学術年会および 11th Annual Global Summit on Regulatory Science (GSR21)での第 2 回プロジェクトに関する口頭発表を通じ、変異原性予測システムの開発に取り組む国立研究開発法人お

よび海外の行政機関も 2021 年後期始動で 2022 年 3 月末に予測結果を国立医薬品食品衛生研究所・変異遺伝部に提出する条件で参加することとなった。第 2 回プロジェクトの参加チームは 2 チーム増え、11 か国 21 チームの構成となった。2021 年 10 月以降は第 2 回プロジェクトの参加者の追加を締めきり、21 チームの予測結果を用いた議論を深め、指標の概要などを学会や学術論文で公開することとした。

学習データとして提供した約 12000 物質の Ames 試験結果の陰性データと陽性データの比は 85 : 15 であり、陰性に偏っている。同様に第 2 回プロジェクトで予測対象とした 1589 物質のデータは、A 判定が 80 物質、B 判定が 156 物質、C 判定が 1353 物質であり、第 1 回プロジェクトと同様に陰性に偏ったデータであった。そして、第 2 回プロジェクトでの予測結果は感度が低く、特異度が高い予測結果の傾向が見られた。この様な感度と特異度の傾向は第 1 回プロジェクトの結果 (M. Honma et al., *Mutagenesis* **34**, 2-16, 2019) と類似していた。

D. 考察

第 1 回プロジェクトで予測対象とした 12140 物質に関し、入手可能な報告書情報に基づく精査を終了させた。本調査の範囲内では、少なくとも 1%の結果は疑似がありうる。ただし、今回の精査の結果は安衛法の判定を変えるものではなく、QSAR を構築する上で判定を修正したほうが適切な物質の提案に過ぎない。この提案を受け入れるか否かは Ames 変異原性に精通した QSAR 開発者の判断に委ねられる。

一方、第 2 回プロジェクトの結果における低感度の要因として、

- 構造アラート情報をはじめとした、これまでの経験的ルールを加味していない
- 学習データとして用いる Ames 試験結果は、プロジェクトで提供したデータでは不十分
- データのキュレーション (精査) が不十分であり、化学物質の構造や陽性と陰性のデータのバランスの考慮が不十分

等が考えられる。特に 3 番目の化学物質の構造については、Ames 変異原性予測 QSAR では、脱塩処理 (図 1 参照) など、事前に構造のキュレーションを実施して、学習データの構築およびテストデータの整理を行うが、変異遺伝部で提供したデータはデータセット構築時期によって脱塩処理がされているものとされていないものが混在していた。万が一、構造キュレーションを行っていない場合にはモデルの性能や予測結果に影響を及ぼした可能性がある。また、第 2 回プロジェクトで提供した学習データ・今回遺伝毒性情報など多くのデータセットにおいて、陰性と陽性が理想的な 1 : 1 から外れたインバランスなデータセットが多く存在し、対応するためのモデルの研究が広範囲で進められている (G. Haixiang, et al., *Expert Systems with Applications*, **73**, 220-239, 2017)。遺伝毒性 (*in vivo* 小核) 予測モデルに Sub-modeling approach や Down-sampling approach を導入することで予測精度向上に寄与する示唆が報告されている (J.W. Yoo et al., *Regul Toxicol Pharmacol.* **113**,104620, 2020)。

今年度実施した 6 物質の N-ニトロソ化合物の Ames 試験結果では陽性の傾向をとらえるには情報が不十分であった。より系統的な考察を行うためには令和 4 年度

に芳香族を中心とした N-ニトロソ化合物を含む試験を実施し、比較検討することで、QSAR の構築に必要な精緻なアラート構造および予測の基盤となる変異原性メカニズムの解明を目指す。

E. 結論

令和3年度は、第1回プロジェクトの取りまとめを進め、予測精度の全体の傾向を明らかにした。更に、第1回プロジェクトで予測評価対象とした安衛法 Ames 試験データに対する専門家による再評価を完了させ、高信頼性のデータセットを完成させる。更に、QSAR 予測の向上に資する改良に必要な Ames 変異原性試験対象として N-ニトロソ化合物を決定し、試験の実施を進め、考察に必要な情報を整理した。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Kasamatsu T, Kitazawa A, Tajima S, Kaneko M, Sugiyama K, Yamada M, Yasui M, Masumura K, Horibata K, Honma M. Development of a new quantitative structure–activity relationship model for predicting Ames mutagenicity of food flavor chemicals using StarDrop™ Auto-Modeller™. *Genes and Environ.* **43**, 16, 2021.
2. P.I. Petkov, H. Ivanova, M. Honma, T. Yamada, T. Morita, A. Furuham, S. Kotov, E. Kaloyanova, G. Dimitrova, O. Mekenyan, Differences between *in vitro* and *in vivo* genotoxicity due to metabolism: The role of kinetics, *Computat. Toxicol.*, **22**, 100222, 2022.
3. Anklam E, Bahl MI, Ball R, Beger RD, Cohen J, Fitzpatrick S, Girard P,

Halamoda-Kenzaoui B, Hinton D, Hirose A, Hoeveler A, Honma M, Hugas M, Ishida S, Kass GE, Kojima H, Krefting I, Liachenko S, Liu Y, Masters S, Marx U, McCarthy T, Mercer T, Patri A, Pelaez C, Pirmohamed M, Platz S, Ribeiro AJ, Rodricks JV, Rusyn I, Salek RM, Schoonjans R, Silva P, Svendsen CN, Sumner S, Sung K, Tagle D, Tong L, Tong W, Eijnden-van-Raaij JVD, Vary N, Wang T, Waterton J, Wang M, Wen H, Wishart D, Yuan Y, Slikker W Jr. Emerging technologies and their impact on regulatory science. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) **247**(1), 1-75, 2022.

4. Iso T, Natsume M, Murata Y, Hirose N, Umamo T, Horibata K, Masumura K, Sugiyama K, Matsumoto M, Hirose A. Absence of *in vivo* mutagenicity of 4,4'-oxybis(benzenesulfonylhydrazide) in liver and glandular stomach of Muta™ Mouse. *Fundam. Toxicol. Sci.* **9**(2), 31-36, 2022.

F.2. 学会発表

1. 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充 : Ames/QSAR の必要性・具体例と国内外のインシリコ研究. 第48回日本毒性学会学術年会 (2021年7月 神戸)
2. Furuham A : Bigdata Analysis: Outcome of the 2nd AMES/QSAR International Challenge Project. 11th Annual Global Summit on Regulatory Science (GSR21) (2021年10月 オンライン)
3. 古濱彩子, 杉山圭一, 本間正充 : 毒性予測活用への取り組み : 第2回

Ames/QSAR 国際チャレンジプロジェクト・CBI 学会 2021 年大会 (2021 年 10 月 オンライン)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

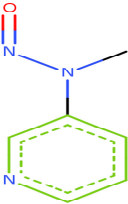
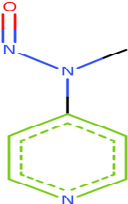
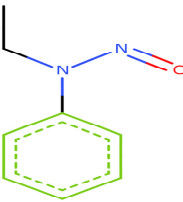
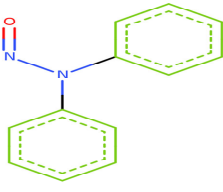
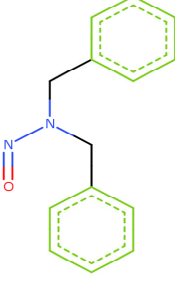
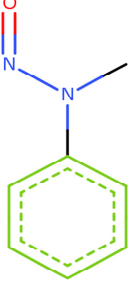
表 1 再評価によって判定が変更された物質一覧（令和2年度以降）

Registration No.	Result before review		Result after review	Note
12578	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
12998	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
12999	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
13388	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
13780	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
15107	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
15969	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
18542	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
18725	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
18746	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
19935	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
20083	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
20628	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
21008	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
21017	C	→	B	Review of the study report revealed the chemical was positive.
22021	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.
22104	C	→	B	Although the study report was negative, reproducible weak activity was confirmed. Re-evaluated as positive from the viewpoint of QSAR model development.

表2 安衛法 Ames 試験データベースの再評価のまとめ

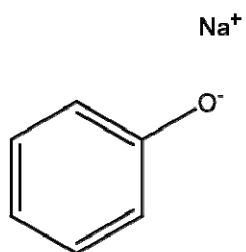
	A判定	B判定	C判定	計	備考
総化合物数：1stプロジェクト直後 (A)	672	1085	10383	12140	
2020年3月現在、試験報告書が存在せず (B)	44	164	1238	1446	所在確認とれず
2020年3月現在、試験報告書があり評価が可能 (C=A-B)	628	921	9145	10694	
2020年3月までに評価 (D)	628	921	16	1565	
2020年3月時点での専門家判断による評価結果訂正数 (E)	26	18	16		
2020年3月時点で専門家判断前後の評価Class増減 (E')	-23	15	2	-6	評価不能 (6)
2020年3月地点での判定結果 (A+E')	649	1100	10385	12134	第2回 Ames/QSAR プロジェクト 提供データ
2020年3月時点の未評価 (F=C-D)	0	0	9129	9129	
2021年5月時点での専門家判断による評価結果訂正数 (G)	0	0	50	50	2020年以降の更新
2021年5月時点で専門家判断前後の評価Class増減 (G')	0	50	-50	0	2020年以降の更新
2021年5月地点での判定結果 (A + E'+G')	649	1150	10335	12134	最終
2020年3月以降の未評価物質数 (評価不可能物質数)	0	0	15	15	試験報告書が欠損

表 3 令和3年度 Ames 試験対象物質のQSAR予測結果

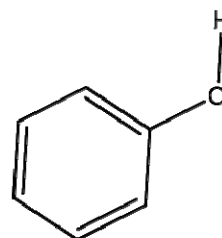
CAS番号	物質名	構造	Hansen et al.結果[1]	Derek NX result and Alert Nexus v230 DerekNx v61	CASE ULTRA GT1_BMUT Results 1802 Probability (%)
69658-91-9	3-nitrosomethylaminopyridine		陰性	PLAUSIBLE	Known Positive 98.2
16219-99-1	4-nitrosomethylaminopyridine		陰性	PLAUSIBLE	Known Positive 98.5
612-64-6	n-nitroso-n-ethylaniline		陰性	PLAUSIBLE	Known Negative 98.3
86-30-6	benzenamine, n-nitroso-n-phenyl-		陰性	INACTIVE	Known Negative 98.0
5336-53-8	n-nitrosodibenzylamine		陰性	PLAUSIBLE	Known Positive 99.1
614-00-6	N-methyl-N-phenylnitrous amide		陽性	PLAUSIBLE	Known Positive 98.0

[1] K. Hansen, S. Mika, T. Schroeter, A. Sutter, A. ter Laak, T. Steger-Hartmann, N. Heinrich, K.-R. Müller, Benchmark Data Set for *in Silico* Prediction of Ames Mutagenicity, J. Chem. Inf. Model., 49 (2009) 2077-2081.

提供した構造情報の例 Sodium phenoxideの構造



Non-washed SMILES(脱塩処理なし)
C1=CC=CC=C1[O-].[Na+]



Washed SMILES(脱塩処理)
C1=CC=CC=C1O

図1 脱塩処理しない構造 (左) と脱塩処理した構造 (右)