

研究要旨

本研究課題では、初期化学反応に基づく透明性の高い手法の開発の第一段階として、OECD QSAR ToolboxにCAS番号とSMILESリストが存在するMETI Japanインベントリデータの物質（化審法化学物質に対応）を対象として、得られるAmes試験結果を学習セットとして、量子化学計算で得られる相対エネルギー値と部分構造情報を考慮にいたったバイナリモデルを提案し、その有効性と問題点について議論を行う。

芳香族アミン構造情報は、METI インベントリデータから選択し、QSAR ToolboxにAmes変異原性データ（デフォルト設定でダウンロードできない ECHA データを除く）が存在する207物質を学習データセットとし、CASE Ultra GT1_BMUTにモデルで既知の陽性または既知の陰性がわかっている物質、および/またはUS NTPとUS EPA CompTox データベースで利用可能な合計88物質をテストデータセットとして収集した。更に、芳香族アミンの変異原性指標ddE（相対エネルギー値）を量子化学計算で算出し、構造の特徴と組合せてモデル（スキーム）を構築した。

収集した学習セット208物質のうち陽性は118物質、陰性は90物質であり、テストセット88物質のうち陽性は35物質、陰性は53物質であった。置換基の構造的な特徴を加味することで、統計データのうちMCC以外全てが0.8以上という高い性能の結果が得られたが、ddEで評価できる物質数が減少した。学習セットを用いて構造的な特徴にddEを加味して構築した評価スキーム案では、すべての学習セットの評価が可能になり、テストセットについてもddEのみの評価と比較すると特異度以外の指標が向上した。今回のスキームは感度が高く、可能な初期化学反応を加味したバイナリモデルの提案につながると期待できる。

A. 研究目的

初期化学反応メカニズムに基づく変異原性インシリコ予測はQSARを補完する演繹的手法として有効である。しかしながら、生体分子である、たんぱく質やDNA等を考慮に入れたシミュレーション・量子化学計算は多種多様な化学物質を評価する方法として現実的ではない。行政で受け入れられるためには説明可能で透明性を担保した評価手法が望まれる。

例えば、アニリン(PhNH_2)を基準とした芳香族アミン(ArNH_2)のニトレニウムイオン(ArNH^+)の安定性を評価する相対エネルギーddE

$$\text{ddE} = \Delta E_{\text{ArNH}^+} + \Delta E_{\text{PhNH}_2} - \Delta E_{\text{ArNH}_2} - \Delta E_{\text{PhNH}^+}$$

を計算し、アニリンよりもニトレニウムイオンとして閾値よりもエネルギー的に安定($\text{ddE} < -5 \text{ kcal/mol}$)ならばAmes変異原性を有する懸念が高いことになり、いくつかの条件を加えて変異原性の指標として提案がされてきた(Muto S et al. Genes Environ. **46** 24, 2024)。さらに、これまでの研究では量子化学計算に基づきニトレニウムイオンの安定性を評価する手法(Furukawa, A. et al. Genes Environ. **44** 10, 2022)が統合計算システムMOE (Molecular Operating Environment, Chemical Computing Group Inc.)のScientific

Vector Language (SVL)スクリプト(mut_nitre.svl)を用いて、ルーチン的に適用可能な提案がなされている。

本研究課題では、初期化学反応に基づく透明性の高い手法の開発の第一段階として、OECD QSAR Toolbox(<https://qsartoolbox.org/>)にCAS番号とSMILESリストが存在するMETI Japanインベントリデータの物質（化審法化学物質に対応）を対象として、得られるAmes試験結果を学習セットとして、量子化学計算で得られる相対エネルギー値と部分構造情報を考慮にいたったバイナリモデルを提案し、その有効性と問題点について議論を行う。そして、行政判断材料に資するモデルの構築を目指す。

B. 研究方法

1. 研究対象とする芳香族アミン構造は、QSAR Toolbox v4.6のMETIインベントリデータから、Ames/QSARを用いて評価可能なSMILESを有する890物質を抽出した。
2. 890物質のうちQSARツールボックスにAmes変異原性データ（ツールボックスのデフォルト設定ではダウンロードできないECHA REACH databaseのデータを除く）が存在する207物質を学習セットとして

使用した。

3. 890物質から学習セットの207物質を除いた物質のうち、MultiCASE社ソフトウェアCASE Ultra 1.9.0.4のAmes変異原性予測モデルGT1_BMUT 1.9.0.2で陽性または陰性であることが既知 (Known PositiveまたはKnown Negative) なデータおよび米国NTP<<https://ntp.niehs.nih.gov/>>、米国CompTox<<https://comptox.epa.gov/dashboard/>>で陽性・陰性の結果が入手可能なAmes試験データ結果が含まれる含む88物質をテストセットとして使用した。

4. 学習セットとテストセットのddEを計算統合システムMOEのSVLを用いて計算した。更に、構造的特徴 (芳香族炭素にSO₂が結合した構造:cSO₂と記載; および芳香族炭素にニトロ基が結合した構造:cSNO₂と記載; 芳香族アミンのアミノ基のオルト位置が両方とも水素の構造) について、MOEを用いて抽出・分離後、学習セットに対し、分子量(MW)とddEを用いてMOE 2022.02バイナリモデルジェネレーターを使用してバイナリモデルを構築した。更に、テストセットを用いてバイナリモデルの評価を行った。

更に、既存の統計ベース、ルールベースのQSARでは判定が困難と考えられる芳香族アミン① Diabeton (CAS RN 394-31-0)② 4-Cyclohexylaniline (CAS RN 6373-50-8)③ 5-Amino-1H-imidazole-4-carbonitrile (CAS RN 5098-11-3)のAmes実試験を実施した。被験物質の純度・用いた溶媒や構造、閾値ベースとルールベースのQSAR予測結果は表1の通りである。Ames試験は、OECD テストガイドライン471に準拠した5菌株 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2uvrA)、代謝活性化条件と非活性化条件による試験をプレインキュベーション法で実施した。最高用量を5 mg/plateとした用量設定試験の結果をもとに本試験を実施し、2回の試験試験実施で再現性の担保を図った。

(倫理面の配慮)

本研究では動物を用いた実験は実施しない。

C. 研究結果

収集した学習セット 208 物質のうち陽性は 118 物質、陰性は 90 物質であり、テストセット 88 物質のうち陽性は 35 物質、陰性は 53 物質であった。

図1にddEで陽性の閾値を $-\infty$ から $+\infty$ に変化させた偽陽性率と偽陰性率の変化であるReceiver Operating Characteristic (ROC) 曲線を示した。青で示したのが、学習セットの208物質での評価結果

であり、ランダムモデルのROCである $y=x$ (赤線) に近い。図1に示すように、置換基の構造的な特徴を加味することで、ROCが描くカーブの下面積が高くなり、表2で示すように統計データのうち感度・特異度・精度・F1スコアなどMCC以外全てが0.8以上という高い性能の結果が得られた。

学習セットを用いて構造的な特徴にddEを加味して構築した評価スキーム案と物質数・陽性の割合は図2、学習セットで構築したバイナリモデルでの陽性・陰性分岐の割合は図3に示す。統計量は表2に示した通り、ddE= -5 kcal/molで構造的な特徴を加味しない場合と比較すると学習セットの感度が0.89と軒並み改善したが、特異度と精度はそれぞれ0.63と0.76と低下した。テストセットについては、ddE= -5 kcal/molで構造的な特徴を加味しない場合と比較すると評価スキーム案では特異度以外の指標が向上した。

Ames試験結果は図1に示すように、① Diabetonと③ 5-Amino-1H-imidazole-4-carbonitrileは陰性、② 4-Cyclohexylanilineは比活性値が1,000倍以上の強い陽性を示した。①～③はcNO₂とcSO₂の構造を有しない。②はオルト位置の両方が水素であった。このことから、図2のスキームでは①と③はddEで判定、②はオルト位置の水素を基に判定を行い、①は陰性、②と③は陽性の予測となった。

D. 考察

今回対象とした3種類の構造的な特徴を有する物質を評価対象外とするとddEの評価が著しく改善することから、これらの構造を有する物質はddEの値だけでは評価するのが難しい構造であると考えられる。また、化学反応的には以下の様に反応性に寄与すると考察できる。第一に、芳香族スルホン基を有する芳香族アミンcSO₂は電子吸引性スルホン基 -SO₂H のように非変異原性 (不活性化) 特性がある可能性を有する。第二に、芳香族ニトロ基を有する芳香族アミンcNO₂は、電子吸引性基であり、c-NHOH に還元され、ニトレニウムイオンが生成され、変異原性特性として知られている。最後に、オルト位水素の置換基である芳香族アミンは、DNA付加体を介して反応する構造的障害がないため、これは変異原性 (活性化) 特性であると考察でき、三島らの研究の表5で考察されている (Muto S. et al. *Gene s Environ.* **46** 24, 2024)。三島らの論文での評価スキーム (Fig 5) では分子量の加味があったため、バイナリモデルの構築では分子量を加味したが、今

回は記述子として選択されなかった。

3種類の構造的な特徴を有する物質を評価対象外とするとモデルの適用範囲が低くなるが、バイナリもモデルで判断することにより、直観的で適用範囲を広げたモデルを構築することが可能であった。また選択されたddEの値(-6.62 kcal/mol)はこれまでの研究でのddEの最適値(-5 kcal/mol)からも妥当な値であった。感度が高く、行政判断に資する評価につながることを期待できる初期化学反応を加味したバイナリモデルの提案につながると考察される。

今後の課題は、スキームでの評価がうまく行えなかった構造の考察である。例えばAmes試験を実施した図1の③5-Amino-1H-imidazole-4-carbonitrileについては、ヘテロ環やシアノ基を有する芳香族アミンであり、これらの構造的なルールを検証することが挙げられる。③の物質は、ddEの値が-6.91 kcal/molと閾値に近く、判断が厳しい物質に該当していることも実試験とddEの予測値が一致しなかった理由としては考察できる。その一方で、既知の情報としてオルト位またはパラ位にシアノ基が結合した芳香族アミン（アニリン）である*o*-Aminobenzonitrileと*p*-AminobenzonitrileはAmes試験陰性、メタ位にシアノ基が結合した*m*-AminobenzonitrileはAmes試験で陽性の報告(Thompson et al. Environ. Mutagen. **5** 803, 1983)や、オルト位にシアノ基が結合した芳香族アミン（アニリン）が強くdeactivatingする効果があることを示した表(Fig 5, Ahlberg et al. Regul. Toxicol. Pharmacol. **77** 1, 2016)も存在し、経験的にオルト位置のシアノ基がAmes試験の活性を下げる傾向があることが示唆されていた。

E. 結論

化審法に基づき化学物質として収載されているOECD QSAR ToolboxのMETI Japanデータを用いて、芳香族アミンのAmes変異原性評価スキーム案を提案した。量子化学計算により得られたエネルギー値ddEと構造的な特徴（いわゆる構造活性相関）を組み合わせた直観的なスキームにより、予測の感度を得にあげることができることを示した。また、今回用いた学習セットでは、これまでの研究で提案されていたddE = -5 kcal/molと比較しても妥当なカットオフ値であることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名・頁・発行年等も記入)

1. Muto S, Furuham A, Yamamoto M, Otagiri Y, Koyama N, Hitaoka S, Nagato Y, Ouchi H, Ogawa M, Shikano K, Yamada K, Ono S, Hoki M, Ishizuka F, Hagio S, Takeshita C, Omori H, Hashimoto K, Chikura S, Honma M, Sugiyama K, Mishima M. 2024. Local QSAR based on quantum chemistry calculations for the stability of nitrenium ions to reduce false positive outcomes from standard QSAR systems for the mutagenicity of primary aromatic amines. *Genes Environ.* **46**, 24.
2. Furuham A, Sugiyama K, Honma M, 2025. Ames mutagenicity of 15 aryl, benzyl, and aliphatic ring *N*-nitrosamines. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **156**, 105763.

2. 学会発表

1. Furuham A, Sugiyama K, Honma M: Ames mutagenicity investigation of aromatic, cyclic and their related *N*-nitrosamines, 55th Annual Meeting of The Environmental Mutagenesis and Genomics Society(2024年9月10日米国パームスプリングス) 口頭発表
2. 古濱彩子、亀山暁子、三島雅之、杉山圭一、本間正充：化学物質審査での活用を目指した芳香族アミンのAmes変異原性評価手法の提案、日本環境変異原ゲノム学会第53回大会（2024年12月7日岡山）ポスター発表

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

表 1 Ames試験実施結果とQSAR*ならびに評価スキーム案での予測結果

名称	① Diabeton (CAS RN 394-31-0)	② 4-Cyclohexylaniline (CAS RN 6373-50-8)	③ 5-Amino-1H-imidazole-4-carbonitrile (CAS RN 5098-11-3)
構造			
統計ベースQSAR CASE Ultra 1.9.2.1 GT1_BMUT1.9.2.0. 15535.450	Positive (79.6%)	Inconclusive (45.8%)	Negative (29.4%)
ルールベースQSAR Derek Nexus: 6.4.1 (Nexus: 2.7.2)	INACTIVE	INACTIVE	PLAUSIBLE
相対エネルギー値 ddE (kcal/mol)	-2.78	-9.14	-6.91
分子量	153.1	175.3	108.1
cNO2を有する	No	No	No
cSO2を有する	No	No	No
オルト位置両方水素	No	Yes	No
スキームでの予測	陰性	陽性	陽性
Ames試験結果	陰性	強い陽性(+S9 TA100, +S9 TA98)	陰性
Ames試験溶媒	DMSO	DMSO	DMSO
Ames試験試薬純度(%)	95	99.99	98

*ルール（知識）ベースQSARモデルのDEREK Nexus（Lhasa Limited社（英国））、及び統計ベースQSARモデルCASE Ultra GT1_BMUTモジュール（MultiCASE社（米国））を用いたQSAR評価をおこなった。ddEを用いたスキームは図2を参照のこと。

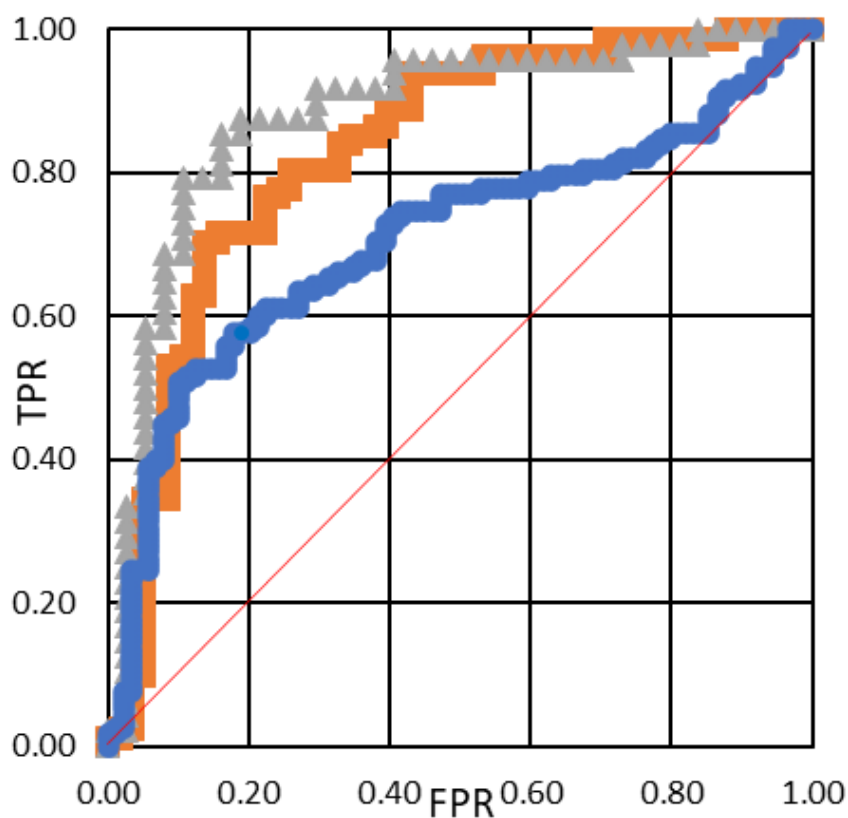


図1 ddEの閾値を変化させることにより得られた学習セットに対するReceiver Operating Characteristic(ROC) 曲線

横軸:偽陽性率(False Positive Rate, FPR) 縦軸:新陽性率(True Positive Rate, TPR)

●: 学習セット208物質の芳香族アミン、■: 学習セットのうちcNO₂とcSO₂のいずれか/両方の部分構造を持つ物質を除いた139物質、▲: 学習セットのうちcNO₂とcSO₂のいずれか/両方の部分構造を持つ物質を除き、更に芳香族アミンのアミノ基のオルト位置に水素を有する物質を除いた85物質。

表2 ddEの閾値ならびに評価スキーム案での統計量*

データセット	ddE の閾値 -5 kcal/mol			評価スキーム案	
	学習	学習 (構造的 特徴加味)	テスト	学習	テスト
物質数	207	85	88	207	88
感度	0.58	0.85	0.51	0.89	0.71
特異度	0.82	0.81	0.68	0.63	0.60
精度	0.81	0.85	0.51	0.76	0.54
バランス精度	0.59	0.81	0.68	0.81	0.76
陽性適中率	0.68	0.84	0.61	0.78	0.65
陰性適中率	0.70	0.83	0.60	0.76	0.66
MCC	0.40	0.66	0.19	0.55	0.31
F1スコア	0.67	0.85	0.51	0.82	0.62

*構造的な特徴を加味した学習セットは、 cNO_2 と cSO_2 のいずれか/両方の部分構造を持つ物質を除き、更に芳香族アミンのアミノ基のオルト位置に水素を有する物質を除いた85物質に該当。評価スキーム案は図2，図3での陽性・陰性予測に対して評価した結果に相当

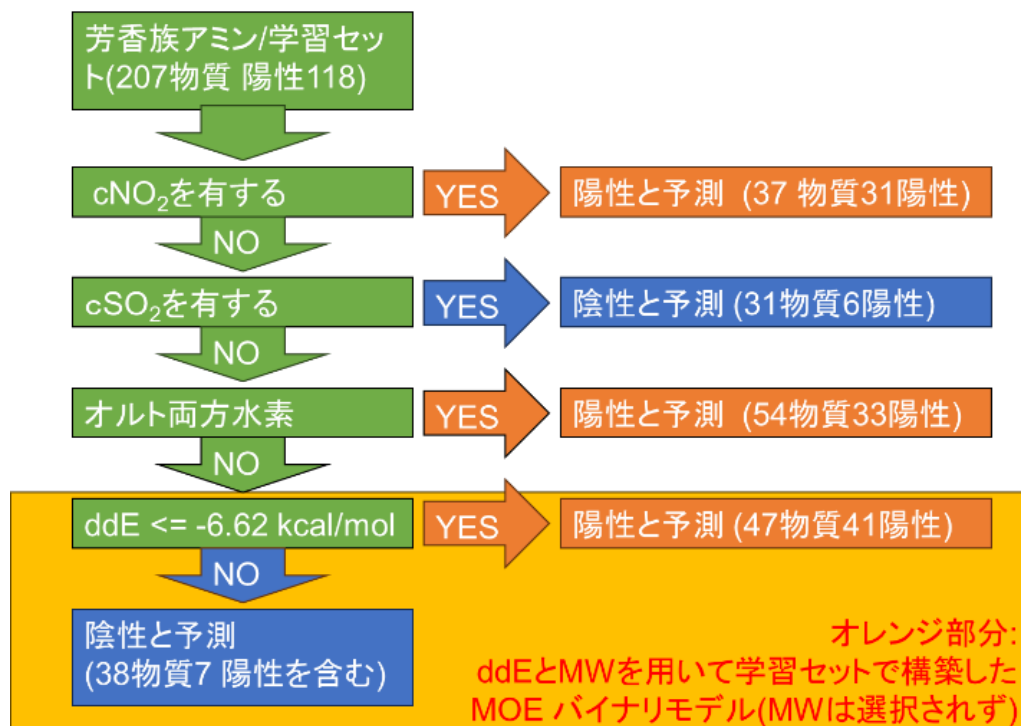


図2 学習セットを用いて構造的な特徴にddEを加味して構築した評価スキーム案

S

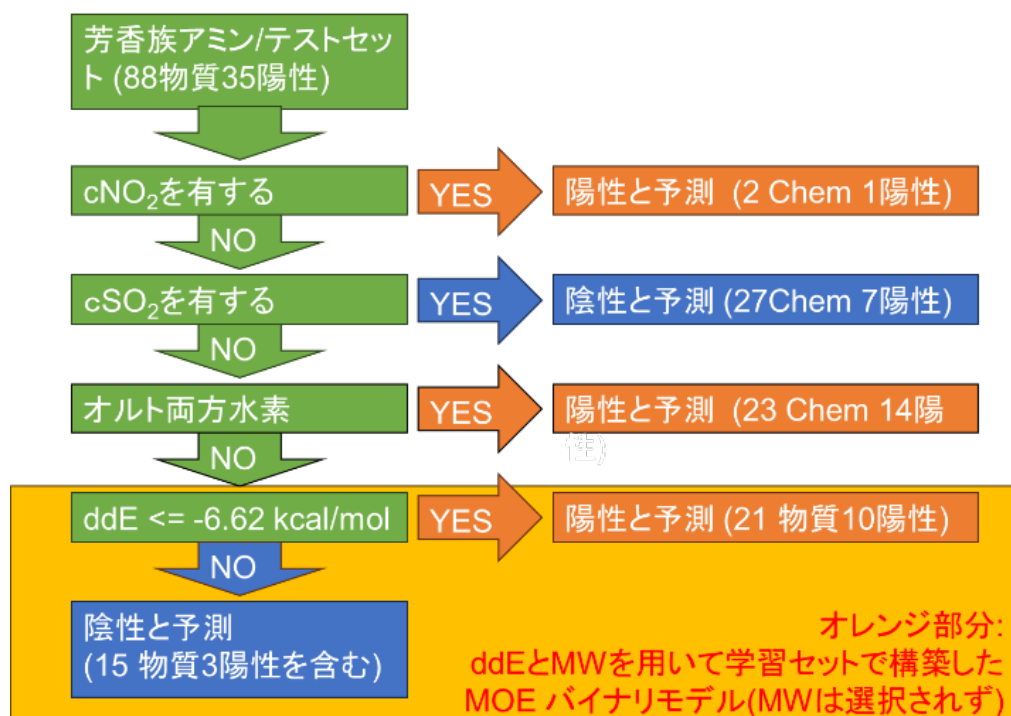


図3 学習セットを用いて構築した評価スキーム案をテストセットで評価した結果