

4.2 予測モデルのまとめ

件は、Appendix9 参照

各モデルの予測精度の比較を以下に示す。詳細条 (Training Set に対する予測精度を表示)

条件	トレーニングセット	モデル名	Feature 数	Features 選択方法	Concordance	Sensitivity	Specificity
条件1	Liver_conv	Run#10	207	Automatic	87.1	50.3	96.7
条件2	Liver_conv	Run#11	156	Manual (Mean が 0.3-0.6 となる Features を除外)	87.3	43.6	98.6
条件3	Liver_conv2	Run#12	207	Automatic	77.5	53.4	91.4
条件4	Liver_conv2	Run#4	624	Manual (Mean が 0.3-0.6 となる Features を除外)	80	62.3	90.2
条件5	Liver_conv2	Run#13	283	Manual (Mean が 0.1-0.6 となる Features を除外)	80	56.3	93.4
条件6	LGW	Run#14	193	Automatic	74.9	88.3	56.9
条件7	LGW	Run#15	134	Manual (Mean が 0.3-0.6 となる Features を除外など)	74.6	91.1	52.6
条件8	LG	Run#16	207	Automatic	73.5	82.4	65.7
条件9	LG	Run#18	179	Manual (Mean が 0.3-0.6 となる Features を除外など)	71.3	82.8	61.3
条件10	LG	Run#20	187	Manual (Mean が 0.3-0.7 で Z-Score が ± 2 範囲内となる Features のみを除外)	73.8	84.4	64.5
条件11	LG	Run#21	179	Manual (Z-Score が小さい (± 2) Features を全て削除)	73.0	85.1	62.4
条件12	LW	Run#17	189	Automatic	73.8	83.8	62.8
条件13	LW	Run#19	145	Manual (Mean が 0.3-0.6 となる Features を除外など)	70.5	86.9	52.8
条件14	LW	Run#22		Manual (Mean LW が 0.294-0.7 で Z-Score が ± 2 範囲内となる Features のみを除外)	73.5	83.5	62.6
条件15	Liver_conv2	PredictiveModel(番号なし)	207	Automatic	77.3	68.5	84.9

4.3 条件4のモデルと条件7のモデルとの組合せ モデルの予測精度の検討

条件4モデルは特異性が非常に高く感度が比較的低い。条件7モデルは逆に感度が高く特異性が低

い。これらのモデルを相補的に組み合わせて肝毒性を予測することで高い精度が得られると考えられた。

Liver_conv2	条件4	条件7	件数
—	—	—	196
—	—	+	263
—	+	—	2
—	+	+	48
—	(適用外)	+	6
+	—	—	15
+	—	+	95
+	+	—	10
+	+	+	172
+	(適用外)	+	1
		total	808

LGW	条件4	条件7	件数
—	—	—	180
—	—	+	130
—	+	—	2
—	+	+	29
—	(適用外)	+	5
+	—	—	31
+	—	+	228
+	+	—	10
+	+	+	191
+	(適用外)	+	2
		total	808

その結果、上記表において条件4と条件7とで陰性/陽性が一致しない場合は予測不可能と見なし、予測可能なケースのみ集計した。また、条件4はLiver_conv2、条件7はLGWをデータセットとしているので、予測対象となる変数はLiver_conv2

とLGWの2通りがあるため、各々のデータセットに関する予測結果を以下の表にまとめた。

モデルを組み合わせた場合、適用範囲が小さくなる代わりに予測精度が大幅に向上することが分かった。

		条件 4 と条件 7 モデルの組合せ				%
		+	−	total	concordance	85.38
Liver_conv2	+	172	15	187	sensitivity	91.98
	−	48	196	244	specificity	80.33
				431		
予測可能な化合物の割合(%):			53.34			

		条件 4 と条件 7 モデルの組合せ				%
		+	－	total	concordance	86.08
LGW	+	191	31	222	sensitivity	86.04
	－	29	180	209	specificity	86.12
				431		
予測可能な化合物の割合(%):			53.34			

4.4 モデル適用範囲の検討

構築した予測モデルにより予測されるPredicted Probabilitiesが0.5より大きい場合は「陽性」、0.5より小さい場合は「陰性」、と

判断した上で予測精度が計算される。この判断基準を変更することで予測精度を上げることができると予想された。従って、以下では条件4(Run#4)および条件7(Run#16)のモデルについて

Predicted Probability のカットオフの値を変更することでより高い予測精度が得られるかを検討した。以下に Model 構築の結果を記載した。
条件 4 モデルについて：

判定のカットオフ値をマニュアル設定 (minimum probability needed for a positive call: 0.75 ; the maximum probability needed for a negative call: 0.25) にして予測した場合：

		条件 4 (Run#4)				%
		+	-	total	concordance	91.35
Liver_conv2	+	118	27	145	sensitivity	81.38
	-	16	336	352	specificity	95.45
				497		
予測可能な化合物の割合 (%) :				61.51		

条件 7 のモデルについて：

判定のカットオフ値をマニュアル設定 (the minimum probability needed for a positive

call: 0.75 ; the maximum probability needed for a negative call: 0.25) にして予測した場合：

		条件 7 モデル				%
		+	-	total	concordance	93.56
LGW	+	107	8	115	sensitivity	93.04
	-	9	140	149	specificity	93.96
				264		
予測可能な化合物の割合 (%) :				32.67		

条件 7 による予測精度を計算したところ、concordance93%となり条件 4 による予測精度と比べ若干小さい値となった。また、適用可能な化合物数も条件 4 のモデルの場合よりも少ないことが分かった。Positive と判断する基準を 0.75 以上から 0.6 以上に下げると、今度は false positive が増える問題が起きることも分かった。

さらに、条件 4 のモデルで、更に詳細に適用範囲を検討することで予測精度がどの程度改善できるのかを検討した。以下に各カットオフに対する予測精度を以下の表にまとめた。パターン 1~5 については、パターン 1 の予測精度が一番高いことがわかる。またパターン 6~10 では、パターン 6 が一番予測可能な範囲が広いことが分かった。

パターン	陰性	陽性	予測可能な割合 (%)	concordance	sensitivity	specificity
1	0.1 以下	0.75 以上	42.45	94.17	96.72	92.76
2	0.2 以下	0.75 以上	54.83	93.23	89.39	94.86
3	0.25 以下	0.75 以上	61.51	91.35	81.38	95.45
4	0.3 以下	0.75 以上	65.97	89.49	74.68	95.73
5	0.4 以下	0.75 以上	79.95	84.52	58.42	96.4
6	0.25 以下	0.5 以上	73.64	87.06	87.08	87.05
7	0.25 以下	0.6 以上	67.7	89.58	85.08	91.8
8	0.25 以下	0.7 以上	63.74	91.07	83.13	94.65
3	0.25 以下	0.75 以上	61.51	91.35	81.38	95.45
9	0.25 以下	0.8 以上	60.15	91.56	80.15	96
10	0.25 以下	0.9 以上	55.32	92.84	74.53	98.53

4.5. 総括と今後の作業

本作業では、808 化合物に対する 28 日間反復投与毒性の肝毒性データをトレーニングデータセットとして QSAR 構築ツール Leadscope Prediction Data Miner を用いて肝毒性予測モデルを構築した。

肝毒性に関連するデータ (LOAEL 値) を変換 ($[-\text{Log}(\text{数値})+4]$) し、連続的な数値データから予測モデルの構築を試みたが十分な精度のモデルを構築することはできなかった。

連続データをバイナリ化 (1 か 0 に変換) し、このバイナリ値をトレーニングデータセットとした場合には、上記 808 化合物に対して感度の高いモデル (条件 7 Run#15)、特異性の高いモデル (条件 4 Run#4) などを構築することができた。肝毒性に関連するデータとしては、病理組織学的データ以外に GOT/GPT、肝重量変化をトレーニングデータセットとして加える場合と加えない場合を検討した。条件 4 と条件 7 の各モデルを相補的に組み合わせることで高い予測精度を得ることができた。

また、モデルが予測の際に出力する Probabilities の閾値を設定することにより適用範囲を制限し、更に予測精度を高めることが可能なことが分かった。

今後の作業としては以下の方向性が考えられる。

(1) External Validation

別途評価用データセットを用意して、本作業で構築した予測モデルの予測精度を評価する。データソースとしては Leadscope Toxicity Database が候補となる。既に報告書「2006 年度 ClassPharmer 4.0 による 28 日間反復投与毒性の解析」で肝毒性化合物のデータセット (Rat に対して一週間以上の経口反復投与により肝臓に病理組織学的異常が認められるデータ) を用意して ClassPharmer で見出された Toxicophore のヒット率を算出している。このデータセットが利用可能と考えられる。

(2) トレーニングデータセットの拡充とモデルの

再構築

Leadscope Toxicity Database から類似している構造群をトレーニングデータセットとして抽出し、改めて予測モデルを構築する。その後、Leadscope Toxicity Database から Validation 用データセットを抽出し、予測精度の評価を行う。

(3) Derek for Windows の肝毒性 alert 構築プロジェクトで得られている Toxicophore の Scaffold への追加と予測モデルの再構築

Lhasa 社による 2006 年度の肝毒性 alert 構築プロジェクトの feasibility study で得られた alert および 2007 年度に構築された肝毒性 alert の構造式を Leadscope の Scaffold として登録した上で改めて予測モデルの構築を行う。

D. 結論

2003 年の化審法改正により 1t から 10t 未満の物質 (低生産量物質) については、分解性・蓄積性・既知見に基づき審査されることとなったが、その低生産量物質の申請数は、スクリーニング試験が要求される物質数を上回る。したがって、これら低生産量化学物質の毒性もヒト健康上の観点からは把握することが望ましいが、動物愛護の観点からも動物の使用は控えるべきでもある。本研究は、このジレンマを解決する最良な方法として (定量的) 構造活性相関 ((Q)SAR) 手法を用い低生産量物質や既存化学物質の評価に役立つシステムの開発を目的とする。

AMES 試験及び染色体試験については評価方式の異なる 3 種類の市販の (Q)SAR モデルを組み合わせることによる予測の決定樹を提案しており、本年度はその精度を上げるためのモデルの改良と、alert の適用範囲拡大のための染色体異常試験を行った。また、反復投与毒性試験について DEREK モデルにおけるアラート検索と ADMEWORKS および Leadscope によるモデル作成を検討した。

染色体異常予測システムにおいて、ADMEWORKS モデルの改良として、SVM 法を用いた場合に比較的高い concordance の高いモデルを作成することがで

きた。10 化合物について染色体異常試験を行い、DEREK における染色体異常アラートの適用範囲の拡大を行うための有用な知見を収集した。

反復投与毒性試験については、DEREK でのアラート開発に対して、肝毒性および腎毒性について各々11種の新しいAlert候補を抽出することができた。ADMEWORKS モデルではSVM 法により肝重量を指標とした比較的高い concordance のモデルを作成した。さらに Leadscope Prediction Data Miner を用いた相補的モデルの組み合わせにより、予測精度の高い肝毒性予測モデル構築の可能性が示された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ema M, Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats, *Reprod Toxicol.* (in press)

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E, Two-generation reproductive toxicity study of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in rats., *Reprod Toxicol.*, 25, 21-38, 2008

Ema M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Evaluation of reproductive and developmental toxicity of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide in rats, *Congenit Anom Kyoto*, 49, 149-155, 2007

Ema M, Fukunishi K, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Kamata E, Repeated dose and

reproductive toxicity of the ultraviolet absorber

2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rats., *Drug Chem Toxicol.* (in press)

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E, Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats, *Reprod Toxicol*, 25, 89-99, 2008
Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M, Gonadal influence of 2-(2' -hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)b benzotriazole in rats, *Drug Chem Toxicol*, 31, 115-126, 2008

Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M., Lack of Gender-related difference in the toxicity of 2-(2' -hydroxy-3' ,5' -di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in preweaning rats, *Drug Chem Toxicol*, 31, 275-287, 2008

Hirata-Koizumi M, Noda A, Hirose A, Kamata E, Ema M., Reproductive and developmental toxicity screening test of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats, *Reprod Toxicol*, 25, 231-238, 2008

Hirata-Koizumi M, Ogata H, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M, A 52-week repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2' -hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in rats., *Drug Chem Toxicol*, 31, 81-96, 2008

Hirata-Koizumi M, Watari N, Mukai D, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M, A 28-day repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2' -hydroxy-3' ,5' -di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in rats, *Drug Chem Toxicol*, 30, 327-341, 2007

Honma M, Sakuraba M, Koizumi T, Takashima Y, Sakamoto H, Hayashi M, Non-homologous

- end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells, DNA Repair., 6, 781-788, 2007
- Kissling GE, Dertinger SD, Hayashi M, MacGregor JT, Sensitivity of the erythrocyte micronucleus assay: Dependence on number of cells scored and inter-animal variability, Mutat Res, 654, 235-240, 2007
- Kobayashi K, Pillai KS, Sakuratani Y, Abe T, Kamata E, Hayashi M, Evaluation of statistical tools used in short-term repeated dose administration toxicity studies with rodent, J Toxicol Sci, 33, 97-104, 2008
- Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M, Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>AT transversion in human cells, Mutat Res, 619, 113-123, 2007
- Matsumoto M, Furuhashi T, Poncipe C, Ema M, Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of the nitrophenolic herbicide dinoseb, 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol, in rats., Environ Toxicol, 23, 169-183, 2008
- Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M, Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction, Regulat Toxicol Pharmacol, 50, 37-49, 2008
- Thybaud V, Aardema M, Casciano D, Dellarco V, Embry MR, Gollapudi BB, Hayashi M, Holsapple MP, Jacobson-Kram D, Kasper P, MacGregor JT, Rees R, Relevance and follow-up of positive results in in vitro genetic toxicity assays: an ILSI-HESI initiative, Mutat Res, 633, 67-79, 2007
- 江馬 眞, 有機スズ化合物の生殖発生毒性, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 35-50, 2007
- 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞, OECD 化学物質対策の動向 (第12報) - 第20回、第21回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2005年パリ、ワシントンDC), 化学生物総合管理学会雑誌, 3, 43-55, 2007
- 高橋美加, 松本真理子, 川原和三, 菅野誠一郎, 菅谷芳雄, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 江馬 眞, OECD 化学物質対策の動向 (第13報) - 第22回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2006年パリ), 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 101-106, 2007
- 松本真理子, 大井恒宏, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞, OECD 高生産量化学物質点検プログラム - 第23回初期評価会議概要, 化学生物総合管理学会誌, 3, 56-65, 2007
- 松本真理子, 山本展裕, 宮地繁樹, 菅谷芳雄, 江馬 眞, OECD 高生産量化学物質点検プログラム - 第24回初期評価会議概要, 化学生物総合管理学会誌, 3, 180-189, 2007

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II . Appendices

最終報告書

Allyl ethyl ether のほ乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

N-M178

要 約

Allyl ethyl ether の染色体異常誘発能の有無を検討するため、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 (CHL/IU) を用いた染色体異常試験を実施した。

初めに、最高用量を毒性試験ガイドラインに定められた 10mM に相当する 870 $\mu\text{g/mL}$ として、細胞増殖抑制試験を実施した。細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ で、非代謝活性化では 435 $\mu\text{g/mL}$ で、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 218 $\mu\text{g/mL}$ で、それぞれ 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 115.2 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 244.6 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 201.0 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 175.1 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの結果より、染色体異常試験では、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量」として、短時間処理法の代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 435 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 218 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 218 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 用量を設定した。

染色体異常試験の結果、染色体構造異常の一つの指標であるギャップを含まない染色体異常を有する細胞の出現率（TA 値）は、短時間処理法の代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ で規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定したが、109 $\mu\text{g/mL}$ では 11.5%、54.4 $\mu\text{g/mL}$ では 3.5%及び 27.2 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%を示し 109 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10%以上を示した。非代謝活性化では 435 $\mu\text{g/mL}$ で規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定したが、218 $\mu\text{g/mL}$ では 23.5%、109 $\mu\text{g/mL}$ では 2.5%及び 54.4 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%を示し 218 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10%以上を示した。しかしながら、陽性と判定されたのは、代謝活性化では 109 $\mu\text{g/mL}$ で、非代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ の 1 用量のみであったことから、用量依存性及び再現性を確認するために、短時間処理法において陽性を示した近傍の用量として、代謝活性化では 150 $\mu\text{g/mL}$ を、非代謝活性化では 300 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量とし、以下公比 1.25 で希釈した計 4 用量をそれぞれ設定し、確認試験を実施した。

確認試験の結果、構造異常の出現率は、代謝活性化では 150 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定したが、125 $\mu\text{g/mL}$ では 36.0%及び 104 $\mu\text{g/mL}$ では 9.5%と 125 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10%以上を、104 $\mu\text{g/mL}$ において疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示し、異常細胞の出現率に用量依存性が認められ、更に染色体異常試験の結果との間で再現性が認められたため陽性と判定した。また、非代謝活性化では 300 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定し、240 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の細胞が観察されず UR (unreliable) と判定したが、240 $\mu\text{g/mL}$ では 36.5%、192 $\mu\text{g/mL}$ では 20.0%及び 154 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%と 240 及び 192 $\mu\text{g/mL}$ で陽性の判定基準である 10%以上を示し、代謝活性化同様の基準に従い陽性と判定した。数値異常の出現率は、染色体異常試験では短時間処理法のいずれの場合においても陰性であったが、確認試験における代謝活性化では 150 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定したものの、125 $\mu\text{g/mL}$ では 2.0%、104 $\mu\text{g/mL}$ では 5.0%及び 86.8 $\mu\text{g/mL}$ では 0.5%と 104 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5%以上 10%未満を示した。また、非代

謝活性化においては、300 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の分裂中期像が観察出来なかったため TOX と判定し、240 $\mu\text{g/mL}$ では規定数の細胞が観察されず UR と判定したが、240 $\mu\text{g/mL}$ では 1.0%、192 $\mu\text{g/mL}$ では 8.0% 及び 154 $\mu\text{g/mL}$ では 5.5% と 192 及び 154 $\mu\text{g/mL}$ で疑陽性の判定基準である 5% 以上 10% 未満を示したことから、総合的に判断し、疑陽性と判定した。なお、染色体異常試験における短時間処理法及び確認試験の結果より、明らかに陽性と判定されたため、連続処理法は実施しなかった。また、全ての処理法において、陰性対照群では染色体構造異常を有する細胞及び倍数体の出現頻度は 5% 未満で、陰性の判定基準内にあった。これに対して、陽性対照群では著しい染色体構造異常の誘発が認められた。

以上の結果から、Allyl ethyl ether は本試験条件下において染色体構造異常は誘発するが、倍数体の誘発に関しては再現性が認められず、equivocal と結論した。

1. 試験材料及び方法

1.1 被験物質及び溶媒

1.1.1 被験物質

被験物質 Allyl ethyl ether は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 総合評価研究室より提供された。

製造者 : Alfa Aesar
 名称 : Allyl ethyl ether
 ロット番号 : 10100751
 CAS 番号 : 557-31-3
 構造式又は示性式 :



分子量 : 86.14
 密度 : 0.76
 純度 : 98%
 沸点 : 64-65°C
 性状 : 無色液体
 入手量 : 10 g
 保存方法 : 冷蔵（冷蔵庫内）（保存期間中の実測温度：4～6°C）、遮光、密閉
 取り扱い上の注意 : 被験物質の酸化を防ぐため、可能な限り空気との接触を避けた。また、引火性が強く、燃焼しやすい液体であり、蒸気は空気と混合して爆発性の混合ガスを形成するため、作業時は火気の使用を厳禁とした。
 返却 : 実験終了後、被験物質の残量は全て試験委託者に返却した。

1.1.2 溶媒

名称 : ジメチルスルホキシド (DMSO)
 ロット番号 : LTF0010
 規格 : 試薬特級
 製造元 : 和光純薬工業株式会社
 保存方法 : 室温
 溶媒の選択理由 : 試験開始前に溶媒に対する溶解性を検討したところ、DMSO に対して 87 mg/mL で溶解したため、DMSO を溶媒として用いることとした。

1.2 被験液の調製

1.2.1 調製方法

1.2.1.1 細胞増殖抑制試験

被験物質 0.1740 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 87.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：0.050 μ g/mL）を調製した。次いで、87.0 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 7 段階希釈し、43.5、21.8、10.9、5.44、2.72、1.36 及び 0.680 mg/mL の 8 濃度段階の被験液を調製した。

1.2.1.2 染色体異常試験

短時間処理法では、被験物質 0.1740 g を 2 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 87.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：870 μ g/mL）を調製した。次いで、87.0 mg/mL 溶液を公比 2（各濃度の被験液 1 mL：溶媒 1 mL）で順次 5 段階希釈し、43.5、21.8、10.9、5.44 及び 2.72 mg/mL の 6 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性法では 21.8、10.9、5.44 及び 2.72 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を、非代謝活性化では 43.5、21.8、10.9 及び 5.44 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を用いた。

1.2.1.3 確認試験

短時間処理法では、被験物質 0.1500 g を 5 mL メスフラスコに秤取した。溶媒で溶解した後に、メスアップして最高濃度の 30.0 mg/mL 溶液（プレートに 0.050 mL 添加した際の最終濃度：300 μ g/mL）を調製した。次いで、30.0 mg/mL 溶液を公比 1.25（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 0.50 mL）で順次 3 段階希釈し、24.0、19.2 及び 15.1 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。非代謝活性法では 30.0、24.0、19.2 及び 15.4 mg/mL の被験液を用いた。また、30.0 mg/mL 溶液を 2 倍希釈（被験液 1.5 mL：溶媒 1.5 mL）し、15.0 mg/mL の溶液を調製し、さらにこれを公比 1.20（各濃度の被験液 2 mL：溶媒 0.40 mL）で順次 3 段階希釈し、12.5、10.4 及び 8.68 mg/mL の 4 濃度段階の被験液を調製した。代謝活性化では 15.0、12.5、10.4 及び 8.68 mg/mL の被験液を用いた。

1.2.2 調製頻度

使用時に調製した。

1.2.3 被験液の安定性

被験物質に溶媒を添加した際に、発泡、発熱、吸熱、着色等の変化の有無を肉眼的及び触知にて観察し、被験液の安定性情報とした。

1.3 対照物質

1.3.1 陰性対照物質

溶媒である DMSO を陰性対照とした。

1.3.2 陽性対照物質

1) シクロフォスファミドとマイトマイシン C を、S9 による代謝活性化系と非代謝活性化系の陽性対照としてそれぞれ用いた。

(1) シクロフォスファミド (以下 CP と略記する)

ロット番号 : SDP4062
製造元 : 和光純薬工業株式会社
純度 : 生化学用 (97.0%以上)
保存条件 : 冷蔵、遮光

(2) マイトマイシン C (以下 MMC と略記する)

ロット番号 : 498AFJ、500AFJ
製造元 : 協和醗酵工業株式会社
力価 : 2 mg (力価) / 瓶
保存条件 : 室温、遮光

2) 調製方法

染色体異常試験の短時間処理法では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K7B93) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 μ g/mL) を調製した。MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K7B93) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.850 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.150 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.075 μ g/mL)。

次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 μ g/mL)。

確認試験では、CP 0.0140 g をプラスチック遠沈管 (50 mL) に秤取した。これに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、ロット番号 K7B93) を 20 mL 加えて溶解し 0.70 mg/mL 溶液 (培養液 4.900 mL に 0.100 mL を加えた時の最終濃度: 14 μ g/mL) を調製した。MMC の 2 mg 充填バイアルに生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場、K7B93) を注射筒で 2 mL 加えて溶解した (1 mg/mL)。次にこの溶液を公比 20 で順次 2 段階希釈 (溶液 0.250 mL : 生理食塩液 4.750 mL) し、0.050 及び 0.0025 mg/mL の溶液を調製した (培養液 4.900 mL に 0.0025 mg/mL 溶液を 0.100 mL 加えた。この時の最終濃度は 0.050 μ g/mL)。

なお、調製は用時とし、残余液はすべて貯蔵し焼却処分した。

3) 陽性対照物質の選択理由

前述の遺伝毒性試験法ガイドラインに使用が推奨されていること及び水溶性で調製が比較的容易であることから CP 及び MMC を選択した。

1.4 使用細胞株

1.4.1 供試哺乳類培養細胞

哺乳類の培養細胞（チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞、CHL/IU 細胞株）を用いた。2004 年 11 月 2 日にヒューマンサイエンス研究資源バンクから入手した。入手後、液体窒素中で保存した細胞の一部を融解後、継代培養し、後述（5.4.4）する細胞の性状検査を実施し、性状などが適正であることを定期的に確認した後に試験に使用した。使用時の細胞継代数は、細胞増殖抑制試験では 19 継代、染色体異常試験の短時間処理法では 23 継代、確認試験では 9 継代であった。

1.4.2 細胞の選択理由

本細胞株は、自然発生の染色体異常出現率が低く、種々の化学物質に対して感受性が高いことから哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験に広く用いられており、背景データも多いことから本試験に用いる細胞株として選択した。

1.4.3 培養条件

炭酸ガス培養装置を用い、CO₂濃度 5%、温度 37°C、高湿度条件下で培養した。継代は 1～4 日ごとに行った。

1.4.4 細胞の性状検査

細胞の性状は、モード数が 25 本、倍加時間が 18.7 時間(継代数 3 の時点)であり、細胞形態には問題のないことを確認した。また、細胞はマイコプラズマ陰性であることを確認した。

1.5 S9 mix 及び培養液の調製

1.5.1 S9 mix

オリエンタル酵母工業株式会社より S9 を購入し、自家調製を行ったコファクターと用時に混合して S9 mix を調製した。本試験に用いた S9 の製品分析書に示された情報、保存条件、使用期限、コファクターの保存条件、使用期限及び S9 mix の組成は以下の通りである。

1) S9

名称	: S9
ロット番号	: 07061503
製造日	: 2007 年 6 月 15 日
種・系統	: ラット・SD 系
性	: 雄
週齢	: 7 週齢
誘導物質	: フェノバルビタール (PB) 及び 5, 6-ベンゾフラボン (BF)
投与経路	: 腹腔内
投与期間及び投与量	: PB 4 日間 30+60+60+60 mg/kg body weight BF 1 日 80 mg/kg body weight

- 保存条件 : 冷凍 (超低温フリーザー)
 使用期限 : 2007年12月14日 (製造後6箇月)
- 2) 補酵素
 名称 : コファクター
 ロット番号 : 070929
 調製日 : 2007年9月29日
 保存方法 : 冷凍 (超低温フリーザー)
 使用期限 : 2008年3月28日 (調製後6箇月)

3) S9 mix の組成

S9	2 mL	
補酵素	4.7 mL	
	20 mmol/L HEPES 緩衝液(pH 7.2)	1.34 mL
	50 mmol/L 塩化マグネシウム水溶液	0.67 mL
	330 mmol/L 塩化カリウム水溶液	0.67 mL
	50 mmol/L グルコース-6-リン酸水溶液	0.67 mL
	40 mmol/L 酸化型ニコチンアミドアデニン	
	ジヌクレオチドリリン酸(NADP)水溶液	0.67 mL
	精製水	0.67 mL

実際には、補酵素は大量に調製を行うために、最終的な組成比が上記と同様になるように各成分の必要量を秤取し、精製水に溶解、pH 調整、濾過滅菌した後に分注、規定した条件下で保存した。使用に際しては、有効期限を越えない範囲で、必要量の分注物を融解して試験に供した。

1.5.2 細胞培養液

培養液は、非働化(56°C, 30分)した牛血清を10 vol%添加した Eagle's Essential Medium (GIBCO™, Cat.No. 11095, Invitrogen Co.)を用いた。調製後の培養液(BS-MEM)は冷蔵保存した。

1) 牛血清 (BS)

- ロット番号 : 571834
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存条件 : 冷凍 (−80°C の冷凍庫)

2) MEM (Minimum Essential Medium, 1×Liquid)

- ロット番号 : 281601、300142
 製造元 : Invitrogen Corporation
 保存条件 : 冷蔵

1.6 試験方法¹⁻⁵⁾

試験は以下のステージ順に実施した。染色体異常試験の短時間処理法の結果、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれにおいて1用量のみで陽性と判定されたことから、用量依存性又は

再現性を確認するために、確認試験を実施した。確認試験の結果、明らかに陽性と判定されたことから、連続処理法は実施しなかった。

1) 細胞増殖抑制試験

(1) 短時間処理法：代謝活性化及び非代謝活性化

(2) 連続処理法：24 時間処理及び 48 時間処理

2) 染色体異常試験

(1) 短時間処理法：代謝活性化及び非代謝活性化

3) 確認試験

(1) 短時間処理法：代謝活性化及び非代謝活性化

1.6.1 識別方法

個々の培養は、試験番号及びコード化した処理番号を明記したラベルで識別した。個々の染色体標本は、試験番号と処理内容をランダムにコード化した番号及びスライド枝番号を明記したラベルで識別した。

1.6.2 用量の設定

1.6.2.1 細胞増殖抑制試験

最高用量を 870 $\mu\text{g/mL}$ (10 mM 相当) とし、以下公比 2 で希釈した 435、218、109、54.4、27.2、13.6 及び 6.80 $\mu\text{g/mL}$ の計 8 用量を設定した。また、これに陰性対照群を設けた。

1.6.2.2 染色体異常試験

細胞増殖抑制試験の結果、短時間処理法の代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ で、非代謝活性化では 435 $\mu\text{g/mL}$ で、連続処理法の 24 時間処理及び 48 時間処理では 218 $\mu\text{g/mL}$ で、それぞれ 50% を超える細胞増殖抑制作用が認められた。50%細胞増殖抑制濃度（概略値）は、短時間処理法の代謝活性化では 115.2 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 244.6 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 201.0 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 175.1 $\mu\text{g/mL}$ であった。これらの結果より、ガイドラインに定められた「細胞増殖が明らかに 50%以上抑制される用量」として、短時間処理法の代謝活性化では 218 $\mu\text{g/mL}$ 、非代謝活性化では 435 $\mu\text{g/mL}$ 、連続処理法の 24 時間処理では 218 $\mu\text{g/mL}$ 、48 時間処理では 218 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下、公比 2 で希釈した計 4 用量を設定した。また、これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

1.6.2.3 確認試験

確認試験（短時間処理法）では、短時間処理法において陽性を示した近傍の用量として、代謝活性化では 150 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下公比 1.20 で希釈した 125、104 及び 86.8 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量を、非代謝活性化では 300 $\mu\text{g/mL}$ を最高用量として、以下公比 1.25 で希釈した 240、192 及び 154 $\mu\text{g/mL}$ の計 4 用量をそれぞれ設定した。また、これに陰性対照群及び陽性対照群を設けた。

1.6.3 細胞増殖抑制試験

染色体異常試験の用量を設定するための予備試験として実施した。

1.6.3.1 短時間処理法

- 1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え更に 18 時間培養を続けた。
- 4) 培養終了後、細胞を生理食塩液で洗浄して 10%ホルマリン液で固定し、0.1%クリスタルバイオレット液で染色した。単層細胞密度測定装置（モノセレータ、オリンパス光学工業株式会社）を用いて細胞密度を測定し、陰性対照群の値を 100%として、代謝活性化及び非代謝活性化のそれぞれについて被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。また、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。

1.6.3.2 連続処理法

- 1) 24 時間処理と 48 時間処理のそれぞれに被験物質処理群及び陰性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 2 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、24 時間処理及び 48 時間処理ともに陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。その後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、24 時間及び 48 時間培養した。
- 3) 24 時間及び 48 時間の培養終了後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、短時間処理法と同様に、洗浄、固定、染色及び細胞密度の測定を行い、24 時間及び 48 時間処理における被験物質の 50%細胞増殖抑制濃度（概略値）を求めた。

1.6.4 染色体異常試験

1.6.4.1 短時間処理法

- 1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL（最終濃度：14 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.150 mL を除き、MMC 0.150 mL（最終濃度：0.075 $\mu\text{g/mL}$ ）を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。
- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。
- 4) 各群 2 枚のプレート（枝番号-1 及び-2）について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド（デメコルシン溶液、10 $\mu\text{g/mL}$ 、和光純薬工業株式会社）を 0.100 mL 加えた。培養終了後、0.25%トリプシン溶液（Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.）で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール：酢酸=3：1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所に滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞滴下後、約 1 日空気乾燥し、2%ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- 5) 残る各群 2 枚のプレート（枝番号-3 及び-4）は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した（培養終了時の結果は、参考データとした）。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

1.6.5 確認試験

1.6.5.1 短時間処理法

- 1) 代謝活性化と非代謝活性化のそれぞれに陰性対照群、被験物質処理群及び陽性対照群を設けた。シャーレはγ線滅菌済プラスチックプレート（直径 60 mm）を用いた。プレートは各群 4 枚とした。
- 2) プレート当たり 2×10^4 個の細胞（培養液 5.0 mL）を播種した。培養 3 日後に、細胞に異常のないことを倒立位相差顕微鏡で観察し確認してから、代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理

群については、培養液 0.883 mL を取り除き、S9 mix 0.833 mL に続き各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。陽性対照群については培養液 0.933 mL を除き、S9 mix 0.833 mL に続き CP 0.100 mL (最終濃度: 14 µg/mL) を加えた。非代謝活性化では陰性対照群については、培養液 0.050 mL を取り除き、溶媒 0.050 mL を加えた。被験物質処理群については、培養液 0.050 mL を取り除き、各濃度の被験液 0.050 mL を加えた。各群ともに添加後、肉眼で析出の有無及び培養液の色を確認し、6 時間培養した。

- 3) 培養 6 時間後に、肉眼で被験物質の析出の有無を観察するとともに、倒立位相差顕微鏡下で細胞の状態を確認した。次いで、細胞を生理食塩液で洗浄し、新しい培養液 5.0 mL を加え、更に 18 時間培養を続けた。各群 2 枚のプレート (枝番号-1 及び-2) について、染色体観察用標本作製のため培養終了の約 2 時間前にコルセミド (デメコルシン溶液、10 µg/mL、和光純薬工業株式会社) を 0.100 mL 加えた。培養終了後、0.25% トリプシン溶液 (Trypsin 0.25%、Invitrogen Co.) で細胞を剥がし、遠心分離によって集めた細胞を 0.075M 塩化カリウム溶液で約 15 分間低張処理し、メチルアルコール: 酢酸=3:1 液で固定した。固定した細胞をスライドガラス 1 枚につき 2 箇所点滴下した。染色体標本はプレート当たり 2 枚作製した。細胞点滴後、約 1 日空気乾燥し、2% ギムザ液で約 15 分間染色して染色体標本作製した。
- 4) 残る各群 2 枚のプレート (枝番号-3 及び-4) は、培養 6 時間後と同様の方法で 18 時間培養の終了時に、肉眼で析出の有無を確認し、更に細胞の状態を倒立位相差顕微鏡で観察し確認した (培養終了時の結果は、参考データとしよう)。その後、細胞増殖抑制試験に準じクリスタルバイオレット染色した標本作製し、単層細胞密度測定装置を用いて細胞密度を測定した。

1.6.6 染色体標本の観察

顕微鏡下で各濃度当たり 200 個 (プレート当たり 100 個) のよく広がった分裂中期像について構造異常の種類と異常を持つ細胞の数を記録した。同時に倍数体の数も記録した。なお、客観的に観察するため染色体標本はすべて盲検法により観察した。観察終了後、プレート当たり 1 枚の染色体標本をカバーガラスで封入し、保存資料とする。

1.6.7 染色体異常の分類

染色体異常の種類は以下のように分類した。

1.6.7.1 構造異常

ギャップ(g) : 染色分体型(ctg)及び染色体型(csg)を含むギャップとは染色体または染色分体の同軸上に断片があるもの (非染色部分が染色分体の同軸上にある) であって、その長さが染色分体の幅以下で明瞭な非染色部位が認められるものとした。

染色分体型切断(ctb) : 断片が染色分体の同軸上からはずれているもの、及び非染色部位が染色分体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものとした。

- 染色分体型交換(cte) : 四放射状交換など。
 染色体型切断(csb) : 断片が染色体の同軸上からはずれており動原体が認められないもの及び非染色部位が染色体の同軸上にあってもその長さが染色分体の幅以上に離れているものとした。
 染色体型交換(cse) : 二動原体染色体、環状染色体など。
 その他(other) : 断片化 (frg) 他。

1.6.7.2 数的異常

倍数性 : polyploidy (endoreduplicationを含む)。

1.6.8 判定基準

判定は石館らの基準¹⁾に従い、染色体の構造並びに数的異常を持つ細胞の出現率 (%) によって被験物質の染色体異常誘発性を次のように判定した。

異常細胞の出現率	判定基準
5%未満	陰 性 (－)
5%以上 10%未満	疑陽性 (±)
10%以上	陽 性 (+)

構造異常の総出現率は、ギャップを含む場合 (TAG) と含まない場合 (TA) とに分け、総合判定は後者によって行った。

異常細胞の出現率に用量依存性又は再現性が認められた場合を、被験物質の染色体異常誘発性陽性と判定した。

なお、判定に際しては統計学的手法を用いなかった。