

別添 1

36 の遺伝毒性不検出物質 (最高濃度 1 mM の in vitro 染色体異常試験で陰性評価かつ Ames 試験陰性) のうち、以下の 17 物質については、低 pH (5 物質 : #63, #64, #66, #73, #82)、高細胞毒性 (10 物質 : #69, #74, #77, #81, #86, #95, #101, #103, #106, #107)、in vitro のみの倍数体誘発 (2 物質 : #94, #108) から、in vivo における遺伝毒性の懸念は低いと推察された。これら 17 物質について、低 pH、高細胞毒性あるいは in vitro のみの倍数体誘発と判断した根拠データを以下に示す。加えて、17 物質中 8 物質については in vivo 小核試験が実施されており、いずれも陰性であった (下表)。

Relevance	Reason for relevance conclusion	Number	Number negative / Number tested in vivo MN
“Irrelevant” positive (17)	Low pH	5	2/2
	High toxicity	10	5/5
	In vitro polyploid only	2	1/1
Unknown relevance (19)	Positive only with S-9	8	2/2
	Other	11	0/0

● #63. 2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid (88-53-9) [MW=222]

[Effect of low pH]

Treatment	6-hr with S9		
Conc. (µg/mL)	550	1100	2200
Conc. (mM)	2.5	5.0	10
CA (%)	0	1.5	50.0
Relative cell growth (%)	ca. 100	ca. 100	ca. 100
pH (just after the treatment)			5.5-5.8

Treatment	24-hr without S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	500	1000	2000
Conc. (mM)	2.3	4.5	9
CA (%)	1.5	2.0	7.5
Relative cell growth (%)	ca. 50% in 48-hr treatment		
pH (just after the treatment)			6.4-6.6

Lowest Effective Concentration (LEC)

Positive Effect ($\geq 5\%$ for structural aberration)

- #64. 1-Naphthylacetic acid (86-87-3) [MW=186]

[Effect of low pH]

Treatment	6-hr without S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	400	900	1700
Conc. (mM)	2.5	4.8	9.1
CA (%)	0.5	3.0	6.5
Relative cell growth (%)	ca. 100	80	45
pH (just after the treatment)			5.9
pH (6 hr after the treatment)			5.1

Treatment	6-hr with S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	400	900	1700
Conc. (mM)	2.5	4.8	9.1
CA (%)	0.5	2.0	9.0
Relative cell growth (%)	ca. 100	70	40
pH (just after the treatment)			5.9
pH (6 hr after the treatment)			5.0

- #66. 3-Aminobenzenesulfonic acid (121-47-1) [MW=173]

[Effect of low pH]

Treatment	6-hr with S9 (1st assay)		
Conc. (µg/mL)	1100	2200	4400
Conc. (mM)	6.4	12.7	25.4
CA (%)	2.5	Toxic	Toxic
Relative cell growth (%)	ca. 100	90	40

Treatment	6-hr with S9 (2nd assay)		
Conc. (µg/mL)	410	830	1650
Conc. (mM)	2.4	4.8	9.5
CA (%)	5.0	16.5	Toxic
Relative cell growth (%)	ca. 100	ca. 100	ca. 90
pH (just after the treatment)	6.3	5.8	
pH (6 hr after the treatment)	6.5	6.2	

- #69. N-Ethylaniline (103-69-5) [MW=121]

[Effect of high toxicity]

Treatment	6-hr without S9		
Conc. (µg/mL)	300	600	1100
Conc. (mM)	2.5	5.0	9.1
CA (%)	0.5	2.0	25.0
Relative cell growth (%)	ca. 100	ca. 100	40

- #73. 2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid (88-44-8) [MW=187]

[Effect of low pH]

Treatment	6-hr with S9 (1st assay)		
Conc. (µg/mL)	480	950	1900
Conc. (mM)	2.5	5.0	10
CA (%)	0	7.0	Toxic
Relative cell growth (%)	90	90	40
pH (just after the treatment)		5.8	
pH (6 hr after the treatment)		6.3	

Treatment	6-hr with S9 (pH-adjusted)		
Conc. (µg/mL)	480	950	1900
Conc. (mM)	2.5	5.0	10.0
CA (%)	0.5	0	2.0
Relative cell growth (%)	ca. 100	ca. 100	ca. 90
pH (just after the treatment)	6.8-7.2		

- #74. tert-Butyl-methacrylate (585-07-9) [MW=142]

[Effect of high toxicity]

Treatment	24-hr without S9		
Conc. (µg/mL)	100	200	400
Conc. (mM)	0.7	1.4	2.8
CA (%)	0.5	1.0	10.5
Relative cell growth (%)	90	90	40

● #77. 2-Hydroxyethyl methacrylate (868-77-9) [MW=130]

[Effect of high toxicity]

Treatment	24-hr without S9		
Conc. (µg/mL)	330	650	1300
Conc. (mM)	2.5	5.0	10
CA (%)	0	4.0*	63.3**
Relative cell growth (%)	ca. 55	ca. 50	ca. 50

*: Fisher's Exact test ($p < 0.05$), 10.0% of aberrant cells with gap.

** : 177 cells analysed

Treatment	6-hr with S9		
Conc. (µg/mL)	330	650	1300
Conc. (mM)	2.5	5.0	10
CA (%)	2.0	2.5	11.0
Relative cell growth (%)	ca. 85	ca. 75	ca. 60

● #81. Dicyclohexylamine (101-83-7) [MW=181]

[Effect of high toxicity]

Treatment	6-hr without S9			
Conc. (µg/mL)	200	400	600	800
Conc. (mM)	1.1	2.2	3.3	4.4
CA (%)	0.5	2.5	9.5	Toxic
Relative cell growth (%)	No data	80	34	11

Treatment	6-hr with S9			
Conc. (µg/mL)	400	600	800	1000
Conc. (mM)	2.2	3.3	4.4	5.5
CA (%)	0.0	0.5	13.5	30.0
Relative cell growth (%)	90	79	60	35

- #82. Glycerol triacetate (102-76-1) [MW=218]

[Effect of low pH], ([Effect of high Toxicity])

Treatment	6-hr with S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	550	1100	2200
Conc. (mM)	2.5	5.0	10.0
CA (%)	0.0	0.5	42.0
Relative cell growth (%)	ca. 100	90	30
pH (just after the treatment)			6.9 (adjusted)
pH (6 hr after the treatment)			4.9

- #86. 4,4'-Sulfonyldiphenol (80-09-1) [MW=250]

[Effect of high toxicity]

Treatment	24-hr without S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	100	200	400
Conc. (mM)	0.4	0.8	1.6
CA (%)	1.0	1.0	4.5*
Relative cell growth (%)	67	51	38

*: Fisher's Exact test ($p < 0.05$), 5.5% of aberrant cells with gap.

- #94. 1,2-Dicyanobenzene (91-15-6) [MW=128]

[In vitro polyploid only]

Treatment	24-hr without S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	200	400	800
Conc. (mM)	1.6	3.2	6.3
CA (% polyploidy)	0.3	1.6*	4.1*
Relative cell growth (%)	79	70	44

*: Fisher's Exact test ($p < 0.05$), 0% in the negative control

Treatment	6-hr without S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	330	650	1300
Conc. (mM)	2.5	5.0	10
CA (% , polyploidy)	1.1*	8.6*	9.5*
Relative cell growth (%)	88	74	63

*: Fisher's Exact test ($p < 0.05$), 0% in the negative control

Treatment	6-hr with S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	330	650	1300
Conc. (mM)	2.5	5.0	10
CA (% , polyploidy)	5.1*	26.1*	24.4*
Relative cell growth (%)	88	68	69

*: Fisher's Exact test ($p < 0.05$), 0% in the negative control

● #95. o-Dichlorobenzene (95-50-1) [MW=147]

[Effect of high toxicity]

Treatment	6-hr with S9 (1st assay)			
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	130	180	230	280
Conc. (mM)	0.9	1.2	1.6	1.9
CA (%)	1.0	3.0	6.5	Toxic
Relative cell growth (%)	ca. 85	ca. 50	ca. 20	ca. 10

Treatment	6-hr with S9 (2nd assay)			
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	240	250	260	270
Conc. (mM)	1.6	1.7	1.8	1.8
CA (%)	5.5	4.0	11.0	Toxic
Relative cell growth (%)	ca. 20	ca. 15	ca. 15	ca. 10

● #101. 2-Ethylbutyric acid (88-09-5) [MW=116]

[Effect of high toxicity], ([Effect of low pH])

Treatment	24-hr without S9			
Conc. (µg/mL)	400	800	1200	1600*
Conc. (mM)	3.4	6.9	10.3	13.8
CA (%)	5.5	5.0	17.0	74.0**
Relative cell growth (%)	94	83	62	2
pH (Just after or 24 hr after the treatment)			6.6-7.1	

*: Medium became yellow (pH6.6-7.1 during treatment)

**: 100 cells were analysed.

● #103. Triphosphoric acid aluminium salt (13939-25-8) [MW=318]

[Effect of high toxicity]

Treatment	6-hr with S9 (1st assay)		
Conc. (µg/mL)	1000*	1500*	2000*
Conc. (mM)	3.1	4.7	6.3
CA (%)	0.5	1.0	33.0
Relative cell growth (%)	42	36	10
pH		yellow	yellow

*: Precipitation at the end of the treatment

Treatment	6-hr with S9 (2nd assay)		
Conc. (µg/mL)	1600*	1800*	2000*
Conc. (mM)	5.2	5.7	6.3
CA (%)	0.5	4.5	11.0
Relative cell growth (%)	62	40	38
pH	yellow	yellow	yellow

*: Precipitation at the end of the treatment

- #106. 1,3-Bis(2-methylphenyl)guanidine (97-39-2) [MW=239]

[Effect of high toxicity]

Treatment	6-hr with S9 (1st assay)		
Conc. (µg/mL)	300	450	600
Conc. (mM)	1.3	1.9	2.5
CA (%)	0	0.5	7.0
Relative cell growth (%)	65	64	44

Treatment	6-hr with S9 (2nd assay)		
Conc. (µg/mL)	400	600	800
Conc. (mM)	1.7	2.5	3.3
CA (%)	2.5	9.0	Toxic
Relative cell growth (%)	70	35	15

- #107. 4-Methylbenzoic acid (99-94-5) [MW=136]

[Effect of high toxicity], ([Effect of Low pH])

Treatment	6-hr without S9 (1st assay)		
Conc. (µg/mL)	1000	1500	2000
Conc. (mM)	7.4	11.0	14.7
CA (%)	1.5	3.5	9.5
Relative cell growth (%)	59	46	8

Treatment	6-hr without S9 (2nd assay)		
Conc. (µg/mL)	1600	1800	2000
Conc. (mM)	11.8	13.2	14.7
CA (%)	5.0	11.0	1.0*
Relative cell growth (%)	36	14	21

* 100 cells analysed due to toxic in one plate.

Treatment	6-hr with S9 (1st assay)		
Conc. (µg/mL)	500	1000	1500
Conc. (mM)	3.7	7.4	11.0
CA (%)	0.0	3.5	Toxic
Relative cell growth (%)	100	82	5

Treatment	6-hr with S9 (2nd assay)		
Conc. (µg/mL)	1000	1200	1400
Conc. (mM)	7.4	8.8	10.3
CA (%)	1.5	7.0	13.0
Relative cell growth (%)	56	34	24

Treatment	24-hr with S9 (1st assay)		
Conc. (µg/mL)	500	1000	1500
Conc. (mM)	3.7	7.4	11.0
CA (%)	0.5	1.5	Toxic
Relative cell growth (%)	66	61	41

Treatment	24-hr with S9 (2nd assay, using enhanced buffering system)		
Conc. (µg/mL)	1250	2500	5000
Conc. (mM)	9.2	18.4	36.8
CA (%)	7.0	7.5	Toxic
Relative cell growth (%)	89	40	12

Treatment	24-hr with S9 (3rd assay, using enhanced buffering system)		
Conc. (µg/mL)	1000	2000	3000
Conc. (mM)	7.4	14.7	22.1
CA (%)	5.0	12.0	Toxic
Relative cell growth (%)	80	73	37

- #108. 1,3,5-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid (27676-62-6)
[MW=784]

[In vitro polyploid only]

Treatment	6-hr without S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	1300	2500	5000
Conc. (mM)	1.7	3.2	6.4
CA (% polyploidy)	0.8	1.1*	3.4*
Relative cell growth (%)	102	99	95

*: Fisher's exact test ($p < 0.01$, 800 cells were analysed.)

Treatment	24-hr without S9		
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	1300	2500	5000
Conc. (mM)	1.7	3.2	6.4
CA (% polyploidy)	1.0	1.4*	3.1*
Relative cell growth (%)	83	74	68

*: Fisher's exact test ($p < 0.01$, 800 cells were analysed.)

別添 2

追加 in vitro CA 陽性 9 物質の異常誘発濃度の解析ならびに誘発性評価の結果を以下に示す。試験最高濃度を 10 mM から 1 mM に低減すると 4 物質 (#1a, 3a, 4a, 7a) が陰性と評価されることとなる。また、CA 誘発の妥当性を評価したところ、9 物質中 6 物質 (#3a, 4a, 5a, 6a, 7a, 8a) は HTC (High Toxicity Clastogen, 高細胞毒性に起因した染色体異常陽性物質) あるいは HTC 様作用によると考えられ、また、その他の理由から懸念は低いものと判断された。#9a は HTC と考えられたが、Ames 試験陽性であることから懸念が残される。

なお、Low Effective Concentration (LEC) を朱色で、5%以上の異常を示した濃度を Positive Effect として黄色で表示した。

Lowest Effective Concentration (LEC)

Positive Effect ($\geq 5\%$)

- #1a; Benzenesulfonic acid, 4-hydroxy-, tin (2+) salt (70974-33-3) [MW=465]

6 時間処理で S9 の有無にかかわらず陽性反応を示したが、S9 非存在下でより有効であった。なお、S9 存在下では 1540 $\mu\text{g/mL}$ 以上で沈殿がみられた。LEC は 1.6 mM (755 $\mu\text{g/mL}$) ゆえ、1 mM Limit では陰性となる。

Treatment	6-hr without S9			
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	528	755	1078	1540
Conc. (mM)	1.1	1.6	2.3	3.3
CA (%)	4.5	12.5	24.0	Toxic
Relative cell growth (%)	85	64	53	41

Treatment	6-hr with S9			
Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	755	1078	1540	2200
Conc. (mM)	1.6	2.3	3.3	4.7
CA (%)	1.0	0.0	1.0	14.0
Relative cell growth (%)	83	66	59	43

● #2a; alpha,4-Dichlorotoluene (104-83-6) [MW=161]

6時間処理でS9の有無にかかわらず陽性反応を示したが、S9非存在下ではより低濃度で有効であった。LECは0.08 mM (12.5 µg/mL)ゆえ、1 mM Limitでも陽性となる。

Treatment	6-hr without S9			
Conc. (µg/mL)	6.25	12.5	25	37.5
Conc. (mM)	0.04	0.08	0.15	0.23
CA (%)	0.5	13.5	32.5	Few meta
Relative cell growth (%)	103	96	86	52

Treatment	6-hr with S9			
Conc. (µg/mL)	50	100	150	200
Conc. (mM)	0.31	0.62	0.93	1.24
CA (%)	1.0	5.5	31.0	Few meta
Relative cell growth (%)	89	79	65	40

● #3a; 1,3-Bis(aminomethyl)cyclohexane (2579-20-6) [MW=142]

S9非存在下の6時間処理で陽性反応を示した。LECは2.8 mM (400 µg/mL)ゆえ、1 mM Limitでは陰性となる。陽性反応は、陰性対照比30%未満の細胞毒性を示した量で認められ、HTC (High Toxicity Clastogen、高細胞毒性に起因した陽性反応)と考えられ、懸念は低いと判断された。

Treatment	6-hr without S9			
Conc. (µg/mL)	350	400	450	500
Conc. (mM)	2.5	2.8	3.2	3.5
CA (%)	1.0	8.5	16.8	16.5
Relative cell growth (%)	39	12	7	5
Relative MI (%)	82	27	14	41

● #4a; 1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5h)-trithione (638-16-4) [MW=177]

S9の有無にかかわらず6時間処理で陽性反応を示したが、S9存在下でより有効であった(S9存在下では沈殿あり)。LECは4.5 mM (800 µg/mL)ゆえ、1 mM Limitでは陰性となる。被験物質添加により培養液の酸性化がみられたため、pH調整による検討を行ったが、これも最高用量(6.8 mM=1200 µg/mL)でのみ陽性反応がみられた。モノセレータによる細胞毒性は強くはないが、1用量段階上の濃度では標本観察が不能な状態であり、HTC的作用と考えられ、懸念は低いと判断された。

Treatment	6-hr without S9			
Conc. (µg/mL)	360	530	800	1200
Conc. (mM)	2.0	3.0	4.5	6.8
CA (%)	1.5	0	5.5	Few meta
Relative cell growth (%)	84	69	55	20

Treatment	6-hr with S9			
Conc. (µg/mL)	360	530	800	1200
Conc. (mM)	2.0	3.0	4.5	6.8
CA (%)	0/1.0*	0.5/1.0	19.0/11.0	Few meta
Relative cell growth (%)	96/90	87/90	73/76	27/36

*: initial assay/confirmation assay

Treatment	6-hr with S9 (pH adjusted)			
Conc. (µg/mL)	530	800	1200	1800
Conc. (mM)	3.0	4.5	6.8	10.2
CA (%)	1.0	2.0	31.5	Few meta
Relative cell growth (%)	95	90	77	33

● #5a; 2,3,4,4'-Tetrahydroxybenzophenone (31127-54-5) [MW=246]

S9の有無にかかわらず6時間処理で陽性あるいは擬陽性反応を示したが、S9非存在下ではより低濃度であった。LECは約0.1 mM (0.06~0.08 mM, 14.8~19.5 µg/mL)ゆえ、1 mM Limitでも陽性となる。反応に再現性は認められたものの、明確な用量依存性はなかった。沈殿などは認められなかったようであるが、被験物質の溶液中での安定性の評価が必要かもしれない。反応は弱く、類似物質の Benzophenone (119-61-9)は、Ames 試験およびマウス骨髄小核試験 (200-500 mg/kg を 24 時間間隔で 3 回腹腔内投与) で陰性と報告されている (METI, 有害性評価書 <NTP データ>) ことから、懸念は低いと判断された。

Treatment	6-hr without S9 (initial assay)				
Conc. (µg/mL)	19.5	39	78	156	313
Conc. (mM)	0.08	0.16	0.32	0.63	1.27
CA (%)	11.5	9.0	4.0	2.5	Not done
Relative cell growth (%)	80	70	60	60	30

Treatment	6-hr without S9 (confirmation assay)			
Conc. (µg/mL)	14.8	22.2	33.3	50
Conc. (mM)	0.06	0.09	0.14	0.20
CA (%)	7.5	12.5	10.5	6.0
Relative cell growth (%)	75	66	58	58

Treatment	6-hr with S9 (initial assay)				
Conc. (µg/mL)	39.1	78.1	156	313	625
Conc. (mM)	0.16	0.32	0.63	1.27	2.5
CA (%)	3.0	9.5	9.0	7.5	Not done
Relative cell growth (%)	83	83	83	66	33

Treatment	6-hr with S9 (confirmation assay)			
Conc. (µg/mL)	256	320	400	500
Conc. (mM)	1.0	1.3	1.6	2.0
CA (%)	2.5	5.5	5.0	2.6
Relative cell growth (%)	66	77	66	66

● #6a; 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-ethylphenol (4130-42-1) [MW=234]

S9 存在下の 6 時間処理でのみ陽性反応を示した。LEC は 0.19 mM (45 µg/mL)ゆえ、1 mM Limit でも陽性となる。反応は弱く 10%の陽性率に満たず、明確な用量依存性もなかったが、再現性は認められた。陰性対照比 50%以下の細胞毒性を示した量での反応であり、HTC と考えられ、懸念は低いと判断された。

Treatment	6-hr with S9			
Conc. (µg/mL)	35	45	55	-/65
Conc. (mM)	0.15	0.19	0.24	-/0.28
CA (%)	5.5/1.0*	8.5/6.0	8.0/4.5	-/Toxic
Relative cell growth (%)	89/65	50/36	38/23	-/6

*: initial assay/confirmation assay

● #7a; 2-Nitro-p-crezol (119-33-5) [MW=153]

S9 存在下の 6 時間処理でのみ陽性反応を示した。LEC は 3.3 mM (500 µg/mL)ゆえ、1 mM Limit では陰性となる。陽性反応は、陰性対照比 40~60%の細胞毒性を示した量で認められ、モノセレータによる細胞毒性は強くはないが、HTC 的作用と考えられ、懸念は低いと判断される。なお、600 µg/mL では沈殿もみられた。

Treatment	6-hr with S9			
Conc. (µg/mL)	400	500	600	700
Conc. (mM)	2.6	3.3	3.9	4.6
CA (%)	8.5/2.0*	7.5	11.5	Toxic
Relative cell growth (%)	66/80*	60	40	40

*: initial assay/confirmation assay, other data were in confirmation assay.

▪ #8a; 4-Chloro-m-cresol (59-50-7) [MW=143]

6時間処理でS9の有無にかかわらず陽性（あるいは擬陽性）反応を示したが、S9存在下がより有効であった。LECは0.98 mM (140 µg/mL)ゆえ、1 mM Limitでも陽性となる。明確な陽性反応は、陰性対照比40%以下細胞毒性の強い濃度で認められており、HTCと考えられ、懸念は低いと判断される。なお、本物質はin vivo マウス小核陰性（1用量のみ、ip投与）、in vitro UDS 陰性とされている（by HSDB, EPA RED）。

Treatment	6-hr without S9		
Conc. (µg/mL)	140	150	160
Conc. (mM)	0.98	1.07	1.14
CA (%)	4.0	6.5	9.0
Relative cell growth (%)	56	51	41
Relative MI (%)	65	18	48

Treatment	6-hr with S9		
Conc. (µg/mL)	140	150	160
Conc. (mM)	0.98	1.07	1.14
CA (%)	13.5	18.0	33.5
Relative cell growth (%)	26	18	8
Relative MI (%)	31	31	14

▪ #9a; 4-Chloro-2-nitroaniline (89-63-4) [MW=173]

S9存在下の6時間処理で陽性反応を示した。LECは0.58 mM (100 µg/mL)ゆえ、1 mM Limitでも陽性となる。しかしながら、陽性反応は、陰性対照比40%の細胞毒性を示した最高用量でのみ認められ、HTCあるいはchemical class effect（要検討）と考えられる。なお、本物質はAmes試験で陽性であり、懸念が残される。

Treatment	6-hr with S9			
Conc. (µg/mL)	50	75	100	125
Conc. (mM)	0.29	0.43	0.58	0.72
CA (%)	2.0	2.5	10.5	Few meta
Relative cell growth (%)	79	77	41	10
Relative MI (%)	106	84	66	35

2. 最高濃度の低減化に伴う QSAR による染色体異常試験結果の予測率の向上

染色体異常試験はエームス試験と同様に化学物質の承認及び登録における安全性確認に重要な *in vitro* 遺伝毒性試験項目の一つである。染色体異常試験についても(Q)SAR モデルが開発されているが、染色体異常は化学物質と DNA の直接的相互作用に加え、DNA 複製に関する酵素(トポイソメラーゼ等)や、染色体分配に関与する核タンパク質(ヒストンタンパク質等)との相互作用などのメカニズムによっても誘発されるため、より複雑である。また、染色体異常自体も、分裂中期における染色体の構造的特性の結果として観察可能となるため、上記の全てのメカニズムが染色体異常として認識されるわけではない。従って、染色体異常を引き起こす化学物質の予測のためのモデル化には多様な計算的アプローチが必要である。

DEREK (バージョン 12) には 74 種類の染色体異常試験陽性の警告構造が収納されている。1994~2009 年に本邦で実施された 270 の既存化学物質データは 121 の染色体異常試験陽性と、149 の染色体異常試験陰性化合物からなるが、DEREK による予測率は、感度 (49.6%)、特異性 (88.6%)、一致性 (71.1%) であり、エームス試験の予測率と比較すると著しく劣る。特に感度は 50% 以下であり、このことは約半分の染色体異常誘発物質を予測できないことを示す (False negative)。同様に Multicase、AdomeWorks のような統計学的手法による QSAR モデルにおいてもその予測率はよくない。染色体異常試験結果自体が、げっ歯

類発がん性試験結果と相関性が低いことも指摘されており、一部の染色体異常陽性結果は遺伝毒性発がん性と無関係であるのと考えられる。

先の項でも報告したように、高濃度でのみで陽性反応を示す染色体異常は、低 pH、強い細胞毒性、沈殿等の非生理的条件下による非特異的反応が多く含まれる。これら反応は生体に対する遺伝毒性と無関係であると同時に、化学構造が有する遺伝毒性とも無関係である。従って、これら非特異的陽性反応を排除することは、染色体異常の予測モデルを構築する上で重要である。

121 の染色体異常試験陽性と、149 の染色体異常試験陰性化合物からなる 270 の既存化学物質データをレビューし、1mM 以上のみで陽性を示す化合物を陰性と判定すると、陽性化合物は 67、陰性化合物は 203 に分類された (図 3)。この判定基準を基に、DEREK、Multicase、AdomeWorks の予測率を再計算した (図 4)。感受性は、DEREK (49.6→58.2%)、Multicase (42.4→52.3%) と向上した。AdomeWorks (22.9→23.1%) に関しては向上が見られなかった。しかしながら、特異性はわずかではあるが向上し、AdomeWorks の一致率 (48.1→59.2%) は 10% 以上も向上した。これは DEREK (71.1→75.6%)、Multicase (54.4→61.5%) の向上率の増加より高い。これらデータを、QSAR のラーニングセットに組み入れたり、不確定なアラートを削除したりすることにより (Q) SAR モデルを改良することが、予測率の向上に貢献できる。今後、他の大規模データベース (CGX Database) での検証作業が必要と考えられる。

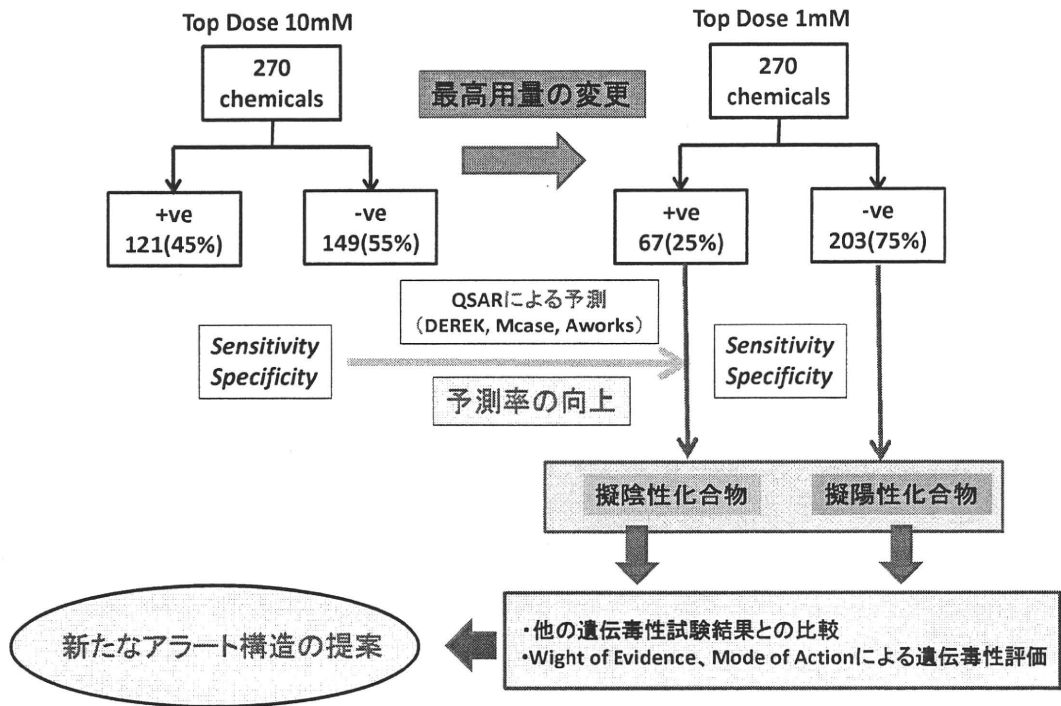


図3 最高用量変更に伴う染色体異常試験結果の変更

10mM					1mM								
DEREK	Prediction	+	-	?	71.1% (Concordance)	DEREK	Prediction	+	-	?	75.6% (Concordance)		
	CA +	121	60	61	0		49.6% (Sensitivity)	CA +	67	39	28	0	58.2% (Sensitivity)
	Results -	149	17	132	0		88.6% (Specificity)	Results -	203	38	165	0	81.3% (Specificity)
	270	77	193	0			270	77	193	0			
MCASE (NIHS Data)	Prediction	+	-	?	54.4% (Concordance)	MCASE (NIHS Data)	Prediction	+	-	?	61.5% (Concordance)		
	CA +	118	50	61	1		42.4% (Sensitivity)	CA +	65	34	27	4	52.3% (Sensitivity)
	Results -	144	40	93	17		64.6% (Specificity)	Results -	197	56	127	14	64.5% (Specificity)
	262	90	154	18			262	90	154	18			
AWORKS (SVM_KNN1)	Prediction	+	-	?	48.1% (Concordance)	AWORKS (SVM_KNN1)	Prediction	+	-	?	59.2% (Concordance)		
	CA +	118	27	91	0		22.9% (Sensitivity)	CA +	65	15	50	0	23.1% (Sensitivity)
	Results -	144	44	99	1		68.8% (Specificity)	Results -	197	56	140	1	71.1% (Specificity)
	262	71	190	1			262	71	190	1			

図4 最高用量変更に伴う染色体異常試験結果の変更と QSAR 予測率の向上

3. TIMES による *in vivo* 小核試験の予測

生物学的活性を有する化学物質の設計とそのリスクの管理には、選択毒性の基礎となる化学的・生物学的相互作用に関する全体論的展望が必要とされる。化学物質は代謝によって解毒されるだけでなく活性化されるため、多くの因子に依存して集団内のみならず種横断的に劇的なシフトを示すという相対的確率の見地から、選択毒性を考慮することができる。親構造と最終的作用の予測との関連性が低く、代謝率の基準となる種・条件をみつけだす見込みがないと思われるため、代謝に起因する毒性の複雑さは QSAR 研究では厄介なものとなっている。異化プロセスがあらゆる種で高度に保存されているというエビデンスを考慮すると、相対的な生体異物代謝そのものの複雑さでさえ逆説的なことに思われる。選択毒性と健康上の有害転帰における代謝の役割を予測するには、特定の条件下で代謝的確率分布を形作る多くの因子だけではなく、決定論的モデルに関する確率的枠組みが必要であるのは明らかである。本研究では、生体内変化および非生物的反応の総合的ライブラリーとシステム特異的な変換確率の推定値を用いて妥当な代謝マップを創り出す帰納的アルゴリズムを使用する組織代謝シミュレータ (TIMES) について述べる。このモデルは、体系的試験から得られる変換率の情報をを用いて、特定の基準条件に対して変換確率を較正することができる。変換率のデータがない場合、組み合わせアルゴリズムを用いて基準システムから得られた既知の代謝マップを適合性が最も高い変換確率に書き換えることができる。TIMES

は現在、環境中の化学物質の生物分解性の予測、およびラット肝 S9 存在下で起こる *in vitro* での化学物質の代謝物の予測と、その遺伝毒性の予測に用いられている。本年度から、TIMES の開発者であるブルガス大学の Mekenyan 博士と、*in vivo* 小核試験の予測モデルの開発の研究を行った。

3.1 TIMES による代謝物の予測モデルの構築と変異原性の予測

3.1.1 はじめに

QSAR などの *in silico* (コンピュータ・シミュレーションによる) 手法は、初期の研究からリスク評価に至るまでの化学物質開発のすべての局面において、時間、費用を節約し、動物実験の利用をできるだけ少なくすることができる可能性がある。これらのツールの開発における主要な課題は、(生物学的作用や毒性学的作用のいずれかの) 作用を誘発する化学物質を予測し同定する能力である。親化学物質には作用がないが、(代謝または化学的) 活性化を通じて変換された化学物質が作用を示すという例が多くみられる。化学物質がさらに高い生物学的活性を有する代謝物に変換される場合、代謝経路の解明を通じてのみ永続的モデルと有害性の確認が信頼できるものになると予想される。重要な代謝物を実験的に同定することは難しく、高価であり、また不完全な場合も多い。したがって、妥当性が高い生体内変化の *in silico* シミュレーションと代謝経路の予測は、ヒトの健康と生態系に対する化学的影響の評価において重要である。代謝経路の予測によって、重要な代謝物を同定するために実施される試験から得られるアウトプット/情報を最大化