

201133002A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)

およびカテゴリーアプローチの実用化に関する研究

(H21-化学-一般-002)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)

およびカテゴリーアプローチの実用化に関する研究

(H21-化学-一般-002)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 本間正充

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添3)	
化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)および カテゴリーアプローチの実用化に関する研究	<u>1</u>
本間 正充	
II. 分担研究報告書 (別添4)	
遺伝毒性の予測に関する研究	<u>7</u>
本間 正充、宮島 敦子、森田 健	
反復投与毒性及び遺伝毒性を指標にした構造活性相関手法構築及び 安全性評価における利用に関する研究	<u>4 3</u>
広瀬 明彦、林 真、江馬 眞	
構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究	<u>1 0 1</u>
小野 敦	
類似化合物のカテゴリー化による毒性評価に関する研究	<u>1 1 7</u>
吉田 緑	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5)	<u>1 3 5</u>
IV. 研究成果の刊行物・別冊	<u>1 3 7</u>

I . 総括研究報告書

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)および
カテゴリーアプローチの実用化に関する研究

研究代表者 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 室長

研究要旨

本研究では、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)やカテゴリーアプローチの化学物質行政における利用の実用化に向けた研究を進めた。本年度は、遺伝毒性試験に関しては、*in vitro* 哺乳類培養細胞遺伝毒性試験の問題点として指摘されている非生理的高濃度における毒性学的に妥当性の低い陽性反応の回避のため、現行の 10mM からどの程度の濃度にまで低減化可能かの科学的調査を行い、2mM 程度までの低減化で、Sensitivity、Specificity とともにエームス試験と同程度まで維持できると判断された。またさらに、*in vivo* 遺伝毒性評価のため、*in vitro* 試験および *in vivo* 齧歯類の遺伝毒性作用に関する分類ワークフローを開発し、その正当性を評価するために、既存試験データを収集し、そのデータを検証した。反復毒性試験に関しては、副腎、精巣、および、心臓毒性を標的臓器とした毒性について、既存化学物質安全性点検データ及び関連する文献情報の解析より、計 11 種の Rapid Prototype アラートの構築に成功した。一方、腎毒性については、特徴部分構造と計算記述子の組み合わせによる定性的及び定量的予測モデルを行い、定量モデルでは、実用的な精度のモデルを得ることは出来なかったが、定性モデルにおいては、外部検証における特異度 75% のモデル構築に成功した。*in vivo* における毒性強度の分類を行う、Cramer の毒性分類モデルについて既存点検試験結果をもとに毒性分類規則の拡張の検討を行い分類精度向上に成功した。新規化学物質のラット反復投与毒性試験において報告された病理組織学的所見を基にシソーラスを構築し、毒性の類似性について検討を行った結果、投与による病理組織学的所見が最も観察された臓器系は消化器系であり、臓器としては肝臓であった。また低頻度ながら特異的なあるいは、重篤な毒性を示す所見も認められた。化学物質安全性評価におけるカテゴリーアプローチの適用について検討するため、ジメチルアニリンの 6 構造異性体について環境運命及び環境毒性に関する情報収集を行い、カテゴリーアプローチを適用した経済協力開発機構の高生産量既存化学物質初期評価のための SIAP、SIAR 及び IUCLID Dossier を作成した。

研究分担者

林 真

: (財)食品農薬医薬品安全性評価センター センター長

吉田 緑

: 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

江馬 眞

: (独)産業技術総合研究所 安全科学研究部門 招聘研究員

宮島 敦子

: 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長

広瀬 明彦

: 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 室長

森田 健

: 国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部 室長

小野 敦

: 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 主任研究官

A. 研究目的

我が国では、数万種に及ぶ既存化学物質が安全性評価未実施のまま流通しており、早急な対応が求められている。さらに、現在の化学物質審査規制法では、10t 未満の物質(低生産量物質)については、スクリーニング毒性試験の実施は不要とされ、既存の毒性情報に基づき審査が行われている。しかし、低生産量物質の申請数は、スクリーニング試験結果を行った物質を大きく上回っており、低生産量であっても、その毒性をヒト健康の上からは把握することが望まれている。安全性評価未実施の既存化学物質はもとより低生産量物質については早急な安全性評価の実施が望まれるが、効率性や動物愛護の観点から、動物を使用せずに毒性の強さを把握できる最良な方法としてこれまでに蓄積された毒性情報を活用したカテゴリーアプローチや(定量的)構造活性相関((Q)SAR)の活用が期待されている。現在、カテゴリーアプローチや(Q)SAR の規制への適用については、OECD を始めとして EC 諸国および米国 EPA においても検討されているものの、実際のヒト健康影響の評価への適用例はほとんどない。我々は、これまでにヒト健康影響に関するスクリーニング試験の内、変異原性、染色体異常について 3 種のプログラムを用いた予測システムの開発を、反復毒性については肝毒性と腎毒性をターゲットとしたプロトタイプアラートの開発を進め、それぞれ適用可能な化合物や予測精度に限定はあるものの、(Q)SAR のヒト健康影響の評価への有用性に関する知見を得ている。本研究では、(定量的)構造活性相関((Q)SAR)やカテゴリーアプローチの化学物質行政における利用の実用化に向け、(Q)SAR 評価モデルの改良や適用範囲の拡充、カテゴリーアプローチの安全性評価への適用による利用法・有用性の検証、得られた成果をもとにこれらの手法を化学物質評価に適用するためのガイダンス作成を目的としてこれに関連した研究を進めている。

B. 研究方法

QSAR による染色体異常試験結果の予測の向上に関する研究：

染色体異常試験結果の毒性学的妥当性について検討するため *in vitro* CA データを用い、陽性物質について最小有効濃度の分類を行い、1 mM の最高濃度では *in vitro* 遺伝毒性試験バッテリーで不検出となる物質の CA 陽性妥当性を、培養環境評価、*in silico* ならびに文献評価を含む証拠の重み付け (WOE) 解析により検証し、最適とされる最高濃度を求めた。

QSAR による *in vivo* 遺伝毒性の予測に関する研究：

本研究では *in vitro* 試験および *in vivo* 齧歯類の遺伝毒性作用に関する分類ワークフローを開発し、その正当性を評価するために、既存試験データを収集し、そのデータを検証した。ワークフローに当てはまらない化合物については *in vitro*・*in vivo*「ギャップ」があると判断し、そのメカニズムを考察し、*in vivo* 遺伝毒性予測(Q)SAR モデル開発にむけた評価モデルに反映させた。

構造活性相関手法による反復投与肝毒性予測に関する研究：

反復投与毒性における標的臓器毒性の *in silico* 評価における適用可能な化合物構造のカバー率向上のため、副腎、精巣、および、心臓毒性に対する拡張を行った。化審法で毒性試験が実施された物質のみでは、ターゲットとする標的臓器毒性陽性化合物が限定されるため文献情報も含めて Rapid Prototype アラートの構築を行った。

ジメチルアニリン異性体におけるカテゴリー評価の研究：

ジメチルアニリンの構造異性体における環境運命及び環境毒性に関する情報収集を行い、経済協力開発機構の高生産量既存化学物質初期

評価のための SIAP、SIAR 及び IUCLID Dossier を作成した。

構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究：

腎毒性について、定性評価モデル及び毒性発現用量を評価する定量評価モデルを構造記述子と特徴部分構造の組み合わせにより構築して予測精度及び実用性について検討を行った。反復投与毒性の強さ（毒性発現用量）について分類を行う Cramer の毒性分類について既存点検試験結果をもとに分類規則の拡張を行った。

反復投与毒性試験病理組織学的所見シソーラスの構築：

平成 22 年度に引き続き、新規化学物質(1997 年~2003 年)のラットを用いた短期反復投与毒性試験にて認められた毒性および投与に関連した病理組織学的所見を抜粋し、シソーラスを構築し、毒性評価の類似性について検討を行った。

C. 研究結果

QSAR による染色体異常試験結果の予測の向上に関する研究：

国内既存化学物質データベース(ECJ)、英国ラーサ社のデータベース (CGX) から染色体異常試験結果を再調査した結果、1mM に最高用量を低減化した場合、遺伝毒性に懸念がある物質、もしくは発がん性物質の多くを見逃してしまう可能性が指摘された。解析の結果、2 mM あるいは 1 mg/mL のいずれか高い方の適用が最も効果的な検出性を示し、249 物質に適用すると陽性率は 46.6% (116/249) から 37.8% (94/249) に減少し、低減化の有効性が示された。

QSAR による in vivo 遺伝毒性の予測に関する研究：

試験方法に関連する生物学的特異を考慮し、in

vitro 遺伝毒性試験結果と、in vivo 遺伝毒性試験結果の関係を調査するため、まず始めに in vivo 骨髄 MNT データのある化学物質 557 種から成るレーニングセットを構築した。AMES (S9 使用)、CA および MLA の 3 レベルの in vitro 試験データが存在する化学物質 162 について解析を行い in vitro 陰性の 36 化合物のうち 14 化合物が、in vivo 肝陽性である一方、in vitro 陽性の 121 化合物のうち 56 化合物は、in vivo 肝非遺伝毒性であった。In vitro では非変異原性であるが、in vivo で遺伝毒性を示す化学物質には、生体内代謝による活性化や解毒が関与する化合物が含まれた。

構造活性相関手法による反復投与肝毒性予測に関する研究：

本年度は、反復投与毒性における標的臓器毒性の in silico 評価における適用可能な化合物構造のカバー率向上のため、副腎、精巣、および、心臓毒性に対する Rapid Prototype アラートの構築を行った。アラート構築のため化審法で審査された物質のみでは、ターゲットとする標的臓器毒性陽性化合物が限定されるため文献情報も含めることでカバーされるケミカルスペース拡大に成功し、最終的に 11 種の Rapid Prototype アラートが構築された。

ジメチルアニリン異性体におけるカテゴリー評価の研究：

カテゴリー評価を行った 6 物質の環境運命については、いずれも難分解性かつ低濃縮性であり加水分解性も示さない、また化学物質環境実態調査の結果から環境への放出は低いと考えられた。環境毒性については、水生生物の藻類、甲殻類(オオミジンコ)及び魚類の試験結果が得られたが、2,4-ジメチルアニリンのみ藻類及び魚類の試験結果が得られず、構造活性相関手法を用いて推定を行った結果、6 物質とも、魚類及び藻類に比べて甲殻類(オオミジンコ)に対してより強い毒性を示すことからカテゴリー

一評価が可能であることが示された。

構造活性相関モデル構築手法の比較と利用に関する研究：

腎毒性評価モデルの構築においては、定量モデルでは、構築したモデルは最大で予測精度 50% 程度であり実用的な結果を得ることは出来なかった。一方、定性モデルにおいては、外部検証における特異度 75% を得ることに成功した。Cramer の毒性分類モデルの拡張においては、既存化学物質について分類されたクラスが毒性試験結果に対して妥当ではない物質が多く含まれるサブクラスの化学構造解析により、構造ルールの拡張を行い無毒性量の平均値の比は、2.97 倍から 5.98 倍に拡大し分離精度向上に成功した。

反復投与毒性試験病理組織学的所見シソーラスの構築：

投与に関連して発現した約 1463 の病理組織学的所見は 13 の臓器系、714 のシソーラス、374 の主な病理用語に細分類出来た。投与による病理組織学的所見が最も観察された臓器系は消化器系であり、泌尿器・リンパ系・生殖器系と続いた。臓器としては、肝臓および腎臓の所見が多く、胃・脾臓と続いた。また、発生頻度は低いが、切歯のエナメル上皮の変性、全身諸臓器の空胞化、筋線維萎縮、関節軟骨びらん、小脳顆粒層壊死、小脳神経細胞脱落など特異的なあるいは重篤な毒性を示す所見が認められた。

D. 考察

染色体異常試験の最高濃度の低減化に関して医薬品では 1 mM が提案されているが、今回の解析では、2 mM あるいは 1 mg/mL のいずれか高い方の適用が最も効果的な検出性を示した。医薬品と比べ一般化学物質の分子量は一般的に低く、1 mM 上限では低分子物質は十分な濃度での処理ができない可能性が考えられた。しかしながら、1 mg/mL とのいずれか

高い方とすることで、分子量 300 未満の物質では 3.3 mM 以上が用いられることとなり、本解析で検討した 249 物質については、発がん性や *in vivo* 遺伝毒性データが極めて少ないなど限定的ではあるが、本データセットに基づけば、一般化学物質の CA 試験における最高濃度として、2 mM あるいは 1 mg/mL のいずれか高い方を推奨するのが適当と考えられた。In silico 評価に関しては、メタクリル酸塩はその多くが *in vitro* CA 誘発性を示すものの、*in vivo* 小核試験は陰性でヒトの健康リスクには懸念がないものと評価されたことから、こうした基本構造の扱いは予測性向上の要点になると考えられ、化学構造を考慮したさらなる検討が必要と考えられた。

種々の化学物質の *in vitro* 変異原性 (S9 使用 AMES、CA、MLA)、*in vivo* 肝遺伝毒性 (UDS、Comet、TGR) ならびに *in vivo* 骨髄遺伝毒性 (MNT) のデータの大規模解析から、現在の *in vitro* 試験の陰性結果は必ずしも *in vivo* 遺伝毒性の欠如を示す十分な証拠として利用することはできないことが明らかとなった。遺伝毒性評価の *in silico* ワークフローの開発では、DNA および蛋白質との反応性を有する親化合物または代謝物は、標的臓器での代謝に基づき利用可能性の差により、*in vitro*/*in vivo* 差が生じる可能性についてさらなる検討が必要であると考えられた。

反復投与毒性における標的臓器毒性の *in silico* 評価のための構造アラート構築では、これまでに肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、および甲状腺毒性のアラート構築を行ってきた。これまでの研究で構築された多くの反復投与毒性に対する Rapid Prototype アラートが複数のエンドポイントをカバーすることから、それらオーバーラップする構造は、同じ作用機序により異なる臓器に対して毒性を引き起こす化合物、もしくは、双方の毒性にリンクするパスウェイに影響を及ぼす化合物群に起因する可能性が示唆された。本年度の解析では、対象とし

た各毒性の陽性化合物が限られていることから文献情報も含めることでケミカルスペースの拡張に成功したことから、開発された Rapid Prototype アラートについても、外部データを用いた更なる予測信頼性の評価結果に基づいた改良が可能と考えられる。

カテゴリーアプローチの検証において、ジメチルアニリン類の構造異性体 6 種を対象として環境運命及び環境毒性に関する情報収集を行いカテゴリー評価の妥当性が認められたことから、結果をもとに OECD 提出文章の作成を行った。今後は、ヒト健康影響についてもカテゴリー評価の検討を行い、SIAM 会議において評価結果の妥当性や信頼性について議論することにより本手法の信頼性および効果的な適用について検討を進める。

腎毒性に関して部分構造と構造記述子を組み合わせることにより最終的に学習セットにおける一致率 93% のモデルを得た。しかし、外部検証による一致率は 61% の留まり、昨年度構築した肝毒性モデルに比べ予測精度は低かった。また、定量モデルの構築では、実用的な精度のモデルを構築することは出来なかった。毒性の種類やメカニズム、化学構造の種類ごとにモデル構築することでより精度の高い予測が可能になると考察されるが、その場合、反復投与毒性試験は、費用も期間もかかることから評価モデル構築に使用出来るデータには限界があり、対象とする毒性の陽性化合物数が少ないことが解析のネックとなると考えられる。一方、既存化学物質の毒性試験における無毒性量と化学構造の解析から Cramer の毒性分類モデルの分離精度向上に成功した。上述の標的臓器毒性アラート構築で述べたとおり、複数のエンドポイントについて重複するアラートが得られていることから、構造特異性の少ない毒性については、細分類を行わずに評価を行うほうが適用範囲も広く効率的であるとも考えられることから実施の評価においては、適用可能な化学構造や毒性の種類は限定されるが

精度の高い予測モデルを構築し、これまでに構築したモデルと組み合わせることにより、in silico 毒性推定の信頼性を向上し、実際のリスク評価に適用可能な評価スキームを構築可能であると考察される。

毒性の種類分類に関しては、反復毒性試験報告における病理組織学的所見シソーラス構築により、13 の臓器系、714 のシソーラス、374 の主な病理用語に細分類が完了した。投与による病理組織学的所見は、臓器系としては消化器系、臓器としては、代謝排泄の主要臓器である肝臓・腎臓及び、投与物質が刺激性に由来すると想定される胃における所見が多く認められており、今後、まずは陽性化合物の多い毒性について毒性の種類（病理変化の再分類）ごとに化合物のグループ化を行い構造的特徴について解析を行うことで in silico 評価モデルの構築を可能であると考察された。一方、毒性学的に重篤な所見を示す物質も認められたが、それらについては、発生頻度が低いため（陽性物質が少ないため）化学構造からの推定のためには文献情報も含めた解析が重要であると考察された。

E. 結論

本研究では、ヒト健康影響の in silico 評価のための手法について検討を行った。in silico 評価を行うためには、これまでに得られている毒性試験結果をもとに化学構造からの評価モデル（スキーム）を構築する必要がある。本研究で検討した in vitro 染色体異常試験における、非生理的高濃度における毒性学的に妥当性の低い偽陽性反応や遺伝毒性評価における in vitro 評価結果と in vivo 評価結果に差がある多くの化学物質の存在は、信頼性の高い in silico モデルを構築するためには、もともとなる試験結果の毒性学的な信頼性が重要であることを示している。このことは、反復投与毒性試験についても同様であり、特に反復投与毒性においては、利用可能な毒性試験データが限られ

ていることにより、複雑で多様な個々の毒性について十分な数の陽性化合物が得られないため、本研究では毒性の種類やメカニズム、化合物の構造を細分化することなくモデル構築を進めてきたが、更なる信頼性の向上に向けては、毒性や構造を細分化しての検討が必要である。すなわち、化学物質ヒト健康影響評価における *in silico* 手法の実用化に向けて、評価対象とするそれぞれの毒性（試験）について、なるべく多くの信頼性の高い試験結果を収集するとともに、試験結果の再評価により信頼性が確認された情報をもとにしたモデル構築を進めるとともに、試験結果からのみでは予測が難しい毒性メカニズムや生体内代謝情報について、文献情報や AOP なども含めて検討することで、限られた範囲ではあっても信頼性の高い *in silico* 評価スキームを構築し、段階的に実用化を進めることが重要である。現時点では、ヒト健康影響分野における構造活性相関やカテゴリーアプローチの利用に関しては、各国ともまだ検討段階であり、特に反復投与毒性を始めとする *in vivo* 毒性の予測については、アプローチの仕方も含め議論の余地のあるところであり、今後とも国際協調のもとでの研究推進、情報交換が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

G. 知的所有権の取得状況

(該当なし)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)

報告書

化学物質リスク評価における(定量的)構造活性相関((Q)SAR)およびカテゴリーアプローチ
の実用化に関する研究 (H21-化学-一般-002)

— 遺伝毒性の予測に関する研究 —

研究代表者	本間正充	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第一室長
研究分担者	森田 健	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室室長
研究分担者	宮島敦子	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部第二室長
研究協力者	O. Mekenyan	ブルガス大学数学化学研究室教授
研究協力者	福島久美子	国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室
研究協力者	三島 雅之	中外製薬株式会社
研究協力者	若田 明彦	アステラス製薬株式会社
研究協力者	濱田 修一	三菱化学メディエンス株式会社
研究協力者	馬庭 二郎	アストラゼネカ株式会社

研究要旨

In vitro 哺乳類培養細胞遺伝毒性試験の問題点として、非発がん物質を陽性と検出してしまふ偽陽性の多さが指摘されている。その要因の 1 つに非生理的高濃度における毒性的に妥当性の低い陽性反応がある。この陽性反応は非遺伝毒性作用であるため、予測が困難であり、QSAR におけるアラートの開発の大きな障害となる。しかしながら、現行の 10mM からどの程度の濃度にまで低減化可能かの科学的調査はこれまでない。国内既存化学物質データベース(ECJ)、英国ラーサ社のデータベース (CGX) から染色体異常試験結果を再調査した結果、1mM に最高用量を低減化した場合、遺伝毒性に懸念がある物質、もしくは発がん性物質の多くを見逃してしまう可能性が指摘された。調査では、2mM 程度までの低減化で、Sensitivity、Specificity ともエームス試験と同程度まで維持できると判断されたが、化学構造を考慮したさらなる検討が必要と考えられた。

In vivo 遺伝毒性試験は、生体の全身曝露を考慮に入れ標的器官への化学物質の遺伝毒性を評価するのに対して、*in vitro* 遺伝毒性試験は生体外の適切な実験条件下で行われる。*In vitro* 試験の実験条件は実際の生体内の条件と一致しないため、*in vitro* 評価の結果と *in vivo* 評価の結果に差が生じることが多い。これにより、遺伝毒性発現機構の解釈が困難になり、結果を *in silico* でモデル化しようとする、大きな齟齬が生じる。これら両実験系の差を合理的に説明し、それによって、新しい(Q)SAR モデルを開発するためには *in vitro-in vivo* 遺伝毒性「ギャップ」を埋める必要がある。本研究では *in vitro* 試験および *in vivo* 齧歯類の遺伝

毒性作用に関する分類ワークフローを開発し、その正当性を評価するために、既存試験データを収集し、そのデータを検証した。ワークフローに当てはまらない化合物については *in vitro-in vivo* 「ギャップ」があると判断し、そのメカニズムを考察し、モデルに反映させる。これを基に将来、*in vivo* 遺伝毒性予測(Q)SAR モデルを開発する。

キーワード：遺伝毒性試験、染色体異常試験、最高用量、小核試験、解毒、

I. 最高濃度低減化に伴う染色体異常不検出物質の陽性妥当性評価と至適最高濃度の提案 (1) 国内既存化学物質データベース (ECJ) 調査

I-1. 研究目的

染色体異常試験 (CA) を含む哺乳類培養細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験においては、非発がん物質を陽性と検出してしまふ偽陽性の多さが問題となっている。その要因の 1 つに過剰なまでの高濃度の使用が挙げられており、試験最高濃度を現行の 10 mM から低減させることが検討されている。事実、医薬品では試験最高濃度を 1 mM とすることが決定されたが、一方、一般化学物質ではどの濃度にまで低減するかの合意は得られていない。また、最高試験濃度の変更は、すでに陽性陰性が知られている既存物質のデータをもとに構築されている *in silico* 染色体異常予測システム ((Q)SAR) の精度にも影響する。そこで、一般化学物質において、試験最高濃度を現行の 10 mM から 1 mM に低減した場合の影響を評価し、至適最高濃度を検討するために既存化学物質の CA データを解析した。このアプローチは、最終的には *in silico* 染色体異常予測率向上に資することになる。

I-2. 研究方法

1994～2006 年に本邦で実施された 249 の化審法既存化学物質の GLP による *in vitro* CA データ (<http://wwwdb.mhlw.go.jp/ginc/html/db1.html>) を用い、図 1 に示す手順で解析した。すなわち、249 物質のデータから、現行ガイドラインではもはや必要とされていない 48 時間処理でのみ陽性となった物質を除き、試験陽性陰性に分けた。次いで、陽性物質について最小有効濃度を①1 mM 以下、②>1～10 mM 以下、③>10 mM に分類した。②について Ames 試験陽性を除き、すなわち 1 mM の最高濃度では *in vitro* 遺伝毒性試験バッテリーで不検出となる物質について、その CA 陽性妥当性を、培養環境評価、DEREK あるいは TIMES による *in silico* 構造活性相関ならびに広範な文献評価を含む証拠の重み付け (WOE) 解析により検証し、懸念のレベルを求めた。さらに、現在提案されている 3 つの案 (1 mM あるいは 0.5 mg/mL のいずれか高い方、4 mM あるいは 2 mg/mL のいずれか低い方、10 mM あるいは 2 mg/mL のいずれか低い方) を含む 4 種類の暫定最高濃度をこれら不検出物質に適用し、高懸念物質の検出性あるいは低懸念物質の不検出性を評価し、最適とされる最高濃度を求めた。なお、懸

念のレベルは、以下の3つを設定した。1) 無視できる懸念：in vivo 遺伝毒性試験や発がん性試験での陰性、あるいは極端な培養環境などその陽性に妥当性のないことを示す明白な証拠があるもの、2) 最小限の懸念：CA 誘発に妥当性のないことを示す限定的な知見や、無視できる懸念を増大させる証拠がある、あるいは in vivo 遺伝毒性試験での限定的な陰性所見があるもの、3) いくらかの懸念：in vivo 遺伝毒性試験や発がん性試験での陽性、あるいは懸念のレベルを下げる支持所見が認められないもの。

I-3. 研究結果

249 物質のうち CA 陽性は 116 物質 (46.6%) であったが、48 時間処理のみで陽性を示した物質は認められなかった (図 1)。このうち最小有効濃度が①の 1 mM 以下のものが 59 物質、③の >10 mM が 6 物質、②の >1~10 mM 以下が 51 物質であった。この 51 物質中 13 物質が Ames 試験陽性であったことから、残りの 38 物質が試験最高濃度を 1 mM とすると不検出となることが判明した。この 38 物質の CA 陽性妥当性について in silico 評価を含む WOE 解析を実施した (表 1)。なお、in silico 評価においては全 38 物質について DEREK を実施し、培養環境影響に起因すると推定された 15 物質など 21 物質を除く、17 物質について TIMES を実施した。その結果、15 物質が培養環境に起因する陽性の可能性が示唆された。すなわち、低 pH が 7 物質、高細胞毒性が 6 物質、沈殿が 2 物質であった。これら 15 物質の懸念のレベルは、無視できるものが 6 物質、最小限が 3 物質であった。また、38 物質中 2 物質は CA 陽性の証拠は

弱い、すなわち統計学的有意差はあっても生物学的意義に疑問が呈され、これらの懸念のレベルは、無視できるものと最小限が各 1 物質であった。さらに残りの 21 物質については、倍数体のみ誘発で DNA 反応性を示さないものが 1 物質、DNA 反応性の染色体異常誘発性を示す化学物質クラスと明確に判断されるものが 4 物質、16 物質が分類不能であった。これら 21 物質の懸念のレベルは、無視できるものが 12 物質、最小限が 5 物質、いくらかあるものが 4 物質であった。38 物質全体では、4 物質はヒト健康リスク評価においていくらかの懸念が、9 物質は最小限の懸念があり、残り 25 物質の懸念は無視できると判断された (表 2)。これら 38 物質 (懸念のある物質 13、懸念のない物質 25) に 4 種類の暫定最高濃度、すなわちこれまでに提案されている①1 mM あるいは 0.5 mg/mL のいずれか高い方、③4 mM あるいは 2 mg/mL のいずれか低い方に加え、1 mM と 4 mM の中間に相当しかつ低減化の効果が期待できる②2 mM あるいは 1 mg/mL のいずれか高い方を適用した。その結果、13 の懸念物質の検出数 (高いほど望ましい) は、①2/13、②8/13、③3/13、④11/13 で、①と③の検出性は低かった (表 3)。一方、25 の非懸念物質の検出数 (低いほど望ましい) は、①9/25、②17/25、③14/25、④23/25 で、①の検出性は低かったが、④の検出性は高く、②と③はその中間を示した。なお、249 物質のうち 204 物質 (81.9%) が分子量 300 未満であった。

I-4. 考察

38 の不検出物質 (13 の懸念物質、25 の

非懸念物質)に、4種類の暫定最高濃度を適用したところ、①の1 mMあるいは0.5 mg/mLのいずれか高い方、および③の4 mMあるいは2 mg/mLのいずれか低い方では重要な遺伝毒性物質を見逃す可能性が高く、④の10 mMあるいは2 mg/mLのいずれか低い方では濃度の低減化の効果がほとんど認められず、②の2 mMあるいは1 mg/mLのいずれか高い方が最も効果的な検出性を示した。②の最高濃度を249物質に適用すると陽性率は46.6% (116/249) から37.8% (94/249)に減少し、低減化の有効性が示された。また、医薬品と比べ一般化学物質の分子量は一般的に低く、1 mM上限では低分子物質は十分な濃度での処理ができない可能性がある。しかしながら、1 mg/mLとのいずれか高い方としたことで、分子量300未満の物質では3.3 mM以上が用いられることとなり、十分な曝露濃度が確保される。本解析で検討した249物質については、発がん性やin vivo 遺伝毒性データが極めて少ないなど限定的ではあるが、本データセットに基づけば、一般化学物質

のCA試験における最高濃度として、2 mMあるいは1 mg/mLのいずれか高い方を推奨するのが適当と考えられた。

In silico 評価に関しては、メタクリル酸塩はその多くがin vitro CA誘発性を示すものの、in vivo 小核試験は陰性でヒトの健康リスクには懸念がないものと評価されたことから、この基本構造の扱いは予測性向上の要点になると考えられた。また、いくつかの芳香族化合物 (ID103, 1,4-dibromobenzene; ID107, 2,4-dinitrophenol; ID113, p-nitrophenol sodium salt) は、TIMESでCA誘発性が示唆されてはいるが、リスクの懸念はないと判断された。これらは芳香族化合物の中ではin vivo 遺伝毒性を示さないものとして例外的部類に入るが、in silico 評価の際には留意する必要がある物質と考えられた。

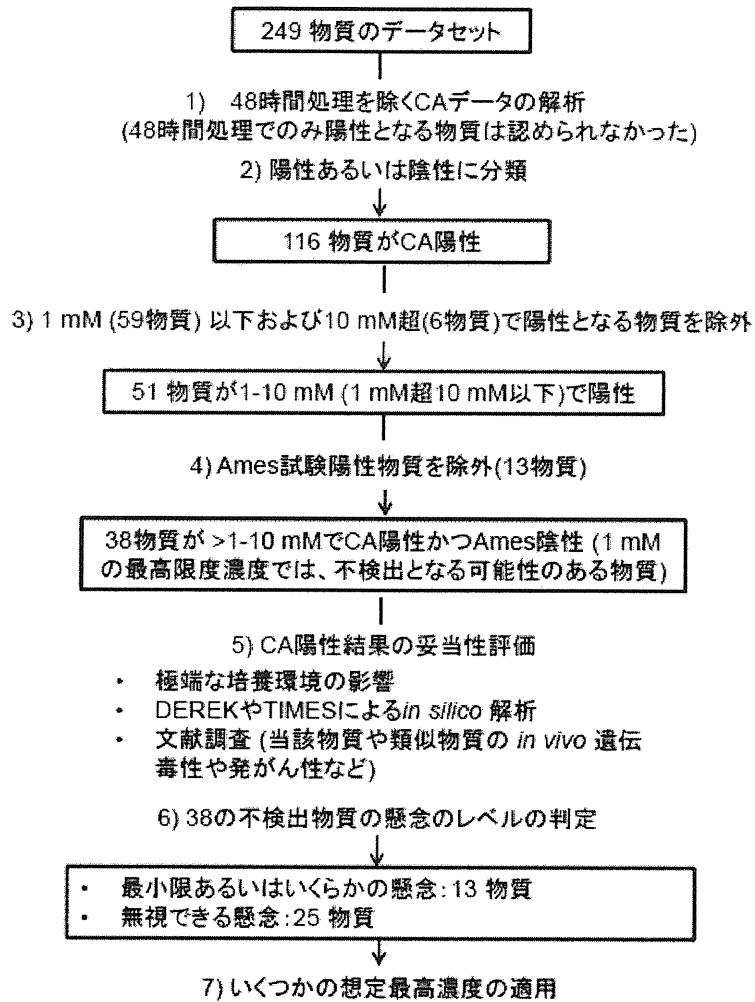

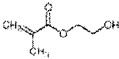

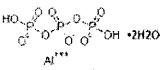
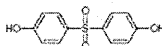
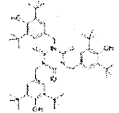

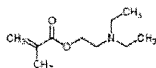
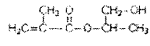
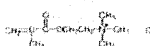
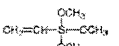


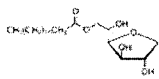


図1 データ解析のフローチャート

表 1. 38の不検出物質のCA陽性結果の妥当性解析

ID No.	Chemical name	CAS	Molecular structure	DEREK	TIMES	Ames test	<i>In vivo</i> MN (CA)	Note
1. Possible effects of extreme culture conditions (n=15)								
1.1. Low pH (7 chemicals)								
79	3-Aminobenzenesulfonic acid	121-47-1		No alert	ND	-	<->	Irrelevant due to low pH; Negative in <i>in vivo</i> MN test for 2-amino-5-methylbenzenesulfonic acid (ID81); Negligible concern.
80	2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid	86-53-9		No alert	ND	-	<->	Irrelevant due to low pH; Negative in <i>in vivo</i> MN test for ID81; Negligible concern.
81	2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid	86-44-8		No alert	ND	-	-	Irrelevant due to low pH; No increase in CAs by neutralization of culture medium; Negative in <i>in vivo</i> MN test; Negligible concern.
82	Glycerol triacetate	102-76-1		No alert	ND	-	-	Irrelevant due to low pH; Possible generation of acidic metabolite(s) in <i>in vitro</i> specific condition with S9 mix; Negligible concern.
83	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7		No alert	ND	-	-	Irrelevant due to low pH; No increase in CAs by neutralization of culture medium; Negligible concern.
84	Methyl acetoacetate	105-45-3		No alert	ND	-	-	Not concluded irrelevant due to low pH; Lack of information on pH measurement; No increase in CAs by neutralization of culture medium; Minimal concern.
85	1-Naphthylacetic acid	86-87-3		No alert	ND	-	-	Irrelevant due to low pH; Negative in <i>in vivo</i> MN test; Negligible concern.
1.2. High toxicity (6 chemicals)								
86	1,3-Bis(2-methylphenyl)guanidine	97-39-2		No alert	ND	-	-	Not concluded irrelevant due to high toxicity; Insufficient of negative in bone marrow MN test because <i>in vitro</i> CA-positive only with S9 mix; Minimal concern.
87	<i>tert</i> -Butyl-methacrylate	585-07-9		CA-induction	ND	-	<->	Maybe associated with cytotoxicity; Negative in <i>in vivo</i> MN test for other methacrylates. 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate, 2-hydroxyethyl methacrylate (ID91), and methyl methacrylate; No evidence of carcinogenic potential for methyl methacrylate in rats and mice; <Methacrylates> Negligible concern.
88	<i>o</i> -Dichlorobenzene	95-50-1		Carcinogenicity	ND	-	- (-)	Irrelevant due to high toxicity; Negative in <i>in vivo</i> MN and CA tests, and in <i>in vivo</i> carcinogenicity tests; Negligible concern.
89	Dicyclohexylamine	101-83-7		No alert	ND	-	<(-)>	Not considered to be irrelevant due to high toxicity; Negative in <i>in vivo</i> CA test for <i>N</i> -methyl dicyclohexylamine; Negligible concern.

ID No.	Chemical name	CAS	Molecular structure	DEREK	TIMES	Ames test	<i>in vivo</i> MN (CA)	Note
90	<i>N</i> -Ethylaniline	103-69-5		No alert	ND	-	-	Maybe irrelevant due to high toxicity; No supporting evidence to reduce the level of concern; Minimal concern.
91	2-Hydroxyethyl methacrylate	868-77-9		CA-induction	ND	-	-	Maybe associated with cytotoxicity. Negative <i>in vivo</i> MN test; No evidence of carcinogenic potential for methyl methacrylate in rats and mice; Negligible concern.
1.3. Precipitation coupled with high toxicity (2 chemicals)								
92	4-Methylbenzoic acid	99-94-5		No alert	ND	-	-	Irrelevant due to precipitation and following high toxicity; Precipitation at all concentrations tested; Negative <i>in vivo</i> MN test; Negligible concern.
93	Triphosphoric acid aluminum salt	13939-25-8		No alert	ND	-	-	Irrelevant due to precipitation and following high toxicity; Precipitation at all concentrations tested; Negligible concern.
2. Weak evidence for a positive (n=2)								
94	4,4'-Sulfonyldiphenol	80-09-1		No alert	ND	-	-	Low biological significance; Statistically significant, but not tested for confirmation of reproducibility; Negligible concern.
95	1,3,5-Tris(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid	27676-82-6		No alert	ND	-	-	Maybe low biological significance; Statistically significant increase only in polyploidy (analysis of 800 cells per group), and outside of the historical control range; Minimal concern.
3. Possible other factors (n=21)								
3.1. Induction of polyploidy only (1 chemical)								
96	1,2-Dicyanobenzene	91-15-6		No alert	ND	-	-	Induction of polyploidy only; Negative <i>in vivo</i> MN test; Mode of action by non-DNA target; Negligible concern.
3.2. Selected chemical class with DNA reactivity (4 chemicals)								
97	2-(Diethylamino)ethyl methacrylate	105-16-8		CA-induction	CA-induction due to possible metabolite(s)	-	<->	Maybe associated with the DNA reactivity and/or cytotoxicity; See <Methacrylates>; Negligible concern.
98	Methacrylic acid, monoester with propane-1,2-diol	27813-02-1		CA-induction	CA-induction due to parent chemical and possible metabolite(s)	-	<->	Maybe associated with the DNA reactivity and/or cytotoxicity; See <Methacrylates>; Negligible concern.
99	(Methacryloyloxyethyl)trimethylammonium chloride	5039-78-1		CA-induction	CA-induction due to parent chemical	-	<->	Maybe associated with the DNA reactivity; See <Methacrylates>; Negligible concern.
100	Ethenyltrimethoxysilane	2768-02-7		No alert	CA-induction due to possible metabolite(s)	-	<->	Maybe associated with the DNA reactivity of metabolite(s); Negative <i>in vivo</i> MN test for [3-(Methacryloyloxypropyl)tri-methoxysilane, but insufficient of negative <i>in vivo</i> MN test because <i>in vitro</i> CA-positive only with S9 mix; Minimal concern.

ID No.	Chemical name	CAS	Molecular structure	DEREK	TIMES	Ames test	<i>in vivo</i> MN (CA)	Note
3.3. Others (16 chemicals)								
101	2-Chlorophenol	95-57-8		CA-induction	No alert	-	-	Negative in <i>in vivo</i> MN test; Not found to be carcinogenic in rats; Negligible concern.
102	C.I. Fluorescent brightener 271	41267-43-0		No alert	Not applied due to too large molecule	-	-	Negative in <i>in vitro</i> CA test for C.I. fluorescent brightener 24, 225 and 260; No <i>in vivo</i> supporting evidence of a reduced level of concern; Minimal concern.
103	1,4-Dibromobenzene	106-37-6		No alert	CA-induction due to possible metabolite(s)	-	<->	Negative in <i>in vivo</i> MN test for 1,4-dichlorobenzene (non-genotoxic carcinogen); Negligible concern.
104	Dibutyl adipate	105-99-7		No alert	No alert	-	-	No supporting evidence of a reduced level of concern; Some concern.
105	2-(Di- <i>n</i> -butylamino)ethanol	102-81-8		No alert	No alert	-	<->	Negative in <i>in vivo</i> MN test for 2-aminoethanol and 2-diethylaminoethanol; Negligible concern.
106	<i>N,N</i> -Dimethylbenzylamine	103-83-3		No alert	CA-induction due to possible metabolite(s)	-	-	Insufficient of negative in <i>in vivo</i> MN test because <i>in vitro</i> CA-positive only with S9 mix; Minimal concern.
107	2,4-Dinitrophenol	51-28-5		Carcinogenicity; CA-induction	CA-induction due to parent chemical and possible metabolite(s)	-	-	Metabolic poison (mechanism with a threshold); Positive <i>in vitro</i> CA at cytotoxic levels in CHO and TK cells; Clastogenicity by indirect mechanism (energy depletion); Negligible concern.
108	2-Ethylbutyric acid	88-09-5		No alert	ND	-	-	Negative in <i>in vivo</i> MN test; Negligible concern.
109	Ferrous sulfate heptahydrate	7782-63-0	FeSO ₄ · 7H ₂ O	No alert	ND	-	-	Negative <i>in vivo</i> digestive tract MN assay including stomach, duodenum and colon; No increase in tumour incidence for ferric chloride; Negligible concern.
110	2-Hydroxypropanenitrile	78-97-7		No alert	No alert	-	-	No supporting evidence of a reduced level of concern; Some concern.
111	2-Mercaptobenzimidazole	583-39-1		Mutagenicity; CA-induction	CA-induction due to parent chemical and possible metabolite(s)	-	-	Negative in Ames test and <i>in vivo</i> 13-week inhalation MN test; Insufficient of negative in long term erythrocyte MN test by inhalation because of possibility of poor systemic exposure and <i>in vitro</i> CA-positive only with S9 mix; Minimal concern.
112	<i>N</i> -Methylaniline	100-61-8		No alert	CA-induction due to possible metabolite(s)	-	<+>	<i>N</i> -Methylaniline yields aniline in rats or rabbits, which is carcinogen and induces MN in mice and rats; Some concern.
113	<i>p</i> -Nitrophenol sodium salt	824-78-2		No alert	CA-induction due to parent chemical and possible metabolite(s)	-	<->	Negative in <i>in vivo</i> MN test for free base, <i>p</i> -nitrophenol; Negligible concern.

ID No.	Chemical name	CAS	Molecular structure	DEREK	TIMES	Ames test	<i>in vivo</i> MN (CA)	Note
114	Sorbitan mono-octadecanoate	1338-41-8		No alert	No alert	-	-	No evidence of carcinogenic potential for sorbitan monostearate in rats and mice; Negligible concern.
115	Trimethoxyphosphine	121-45-9		No alert	ND	-	-	No supporting evidence of a reduced level of concern; Some concern.
116	Trimethylamine	75-50-3		No alert	No alert	-	<->	Negative in <i>in vivo</i> 15- or 90-day inhalation CA test for dimethylamine; Insufficient of negative in long term bone marrow CA test by inhalation because of possibility of poor systemic exposure; Minimal concern.

-, Negative; +, Positive; <->, Negative in a related structural analogue; <+>, Positive in a related structural analogue; CA, Chromosomal aberration; MN, Micronucleus; ND, Not done
 DEREK: Structure alert for mutagenicity, chromosome damage and carcinogenicity.
 TIMES: Structure alert for CA.

表2. 38不検出物質のヒト健康リスク評価に対する懸念のレベル

妥当性のない陽性結果の可能要因	当該懸念レベルを有する物質数		
	無視できる	最小限	いくらかある
1. 極端な培養環境 (15物質)			
1.1 低pH (7物質)	6	1	0
1.2 高細胞毒性 (6物質)	4	2	0
1.3 沈澱 (2物質)	2	0	0
2. 極めて弱い陽性 (2物質)	1	1	0
3. その他の要因 (21物質)			
3.1 倍数体からの誘発 (1物質)	1	0	0
3.2 DNA反応性を有するある種の化学物質クラス (4物質)	3	1	0
3.3 その他 (16物質)	8	4	4
計 (38物質)	25物質	9物質	4物質

表3. 異なる想定最高濃度による38不検出物質の検出の程度

1-10 mMにおける 38の不検出物質	検出化学物質数			
	1 mMか0.5 mg/mL, いずれか高い方	2 mMか1 mg/mL, いずれか高い方	4 mMか2 mg/mL, いずれか低い方	10 mMか2 mg/mL, いずれか低い方
13の懸念物質 (最小限あるいはいくらか)	2/13	8/13	3/13	11/13
25の非懸念物質 (無視できる)	9/25	17/25	14/25	23/25