

II. 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 (2) ラーサ社試験データベース (CGX)

調査

II-1. 研究目的

哺乳類培養細胞を用いた染色体異常試験 (CA) においては、非発がん物質を陽性と検出してしまう偽陽性の多さが問題となっている。その要因の 1 つに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出現が指摘されており、試験最高濃度の低減化が検討されている。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。しかしながら、一般化学物質ではどの程度の濃度にまで低減するかの合意は得られていない。ラーサ社の遺伝毒性試験データベース (<http://www.lhasalimited.org/cgx>) には、発がん性、もしくは非発がん性化学物質に分類され、遺伝毒性試験結果が評価されている。染色体異常試験に関しては最高用量を 10mM と設定して結果が評価されている。本研究では、この染色体異常試験データベースを用い、試験最高濃度を 1 mM 低減化させることによる染色体異常試験結果が、発がん性物質予測率にどのような影響を与えるかを検討することを目的とする。

II-2. 研究方法

英国 ラーサ社のデータベース (<http://www.lhasalimited.org/cgx>) を基に、カークランドが報告した (Kirkland et al., Mutat Res., 584, 1-256, 2005) データから、染色体異常試験 (CA) 陽性化合物の結果について再評価した。

カークランドの論文に記載の発がん性化学物質の CA データ 352、非発がん性化学物質の CA データ 136 (合計 488 化合物) のうち、CA 陽性化合物については、オリジナル文献、データベースを再調査し、陽性を示す最低濃度、試験条件 (S9 の存在の有無、処理時間) を確認した。データベースが NTP のものについては、トレンドにより陽性判定が行われているため、10% 以上の陽性が出ている場合及び、5-10% 陽性で濃度依存がみられる場合の最低濃度を調べた。

II-3. 研究結果

カークランドの論文に記載の発がん性化学物質の CA データ 352、非発がん性化学物質の CA データ 136 (合計 488 化合物) の、発がん性と、染色体異常試験結果の相関性を表 1 に示す。彼の報告よれば、染色体異常試験のげっ歯類発がん性試験に対する Sensitivity: 65.6%、Specificity: 44.9%、Concordance: 59.8% である。

以前、国立医薬品食品研究所・総合評価評価室の鎌田が、カークランドが報告した化合物から Derek, Mcase, ADMEWORKS を用いて結果予測を行うのに用いた化合物のうち、CA の結果があるのは、464 物質であった。このリスト外の化合物で、CA の結果があるのは、41 物質であった。それぞれのデータには、E 判定 (equivocal) が 25 物質および 3 物質、TC 判定 (technically compromised) が 18 物質及び 2 物質あり、Kirkland の論文では、上記の TC のうち、1 物質を CA(-)、2 物質を CA(+) としてカウントしたと考えられた。

表 2 に鎌田のリスト CA(-) 159 物質、CA(+) 262 物質 (+*(4) は含む) (発がん性の

結果あり)結果を示す。これ以外にリスト外 CA(-) 8 物質、CA(+) 28 物質についても解析を行ったが、発がん性データがないため、発がん性物質予測率の検討からは外した。

CA 陽性 262 化合物について、陽性を示す最低濃度、試験条件(S9 の存在の有無、処理時間)のデータが収集できた化合物は 244 物質であった。このうち、陽性最低濃度が、10mM 以上 ; 19 物質、1mM 以上 10mM 未満 ; 67 物質、1mM 未満 ; 158 物質であった (表 3)。244 物質のリストと染色体異常試験結果とその再評価の結果を表 4 に示す。

II-4. 考察

今回調査した結果を、鎌田リストにあった化合物のうち、詳細を調べることができた染色体異常試験陽性を示す 244 物質を含む 403 物質について、各化合物の発がん性、非発がん性データと合わせて整理した (表 5 a, b)。

従来用いられてきた判定(最低陽性濃度 10mM 以上、1mM 以上 10mM 未満、1mM 未満すべてを陽性と判定)とした場合、発がん判定物質で CA 陰性 ; 103 物質、CA 陽

性 ; 197 物質、非発がん判定物質で CA 陰性 ; 56 物質、CA 陽性 ; 47 物質であり、Sensitivity (発がん性&CA 陽性 / 発がん性) = $197/300 = 65.7\%$ 、Specificity (非発がん性&CA 陰性 / 非発がん性) = $56/103 = 54.3\%$ であった。これに対して、1mM 未満において陽性を示した場合のみを CA 陽性判定とし、結果を再整理すると、発がん判定物質で CA 陰性 ; 167 物質、CA 陽性 ; 133 物質、非発がん判定物質で CA 陰性 ; 78 物質、CA 陽性 ; 25 物質であり、Sensitivity = $133/300 = 44.3\%$ 、Specificity = $78/103 = 75.7\%$ であった。

以上の結果は 1mM への最高用量の低減化は Specificity の向上には大きく貢献するが、逆に Sensitivity が 50%以下となり、多くの発がん物質を検出できないことになる。医薬品と異なり、工業化学物質は分子量が低いものが多いことがその原因の一つと推測されるが、さらなる調査が必要と考えられる。

表 1 カークランドの解析結果

	CA(-)	CA(+)	E	TC	total
発がん性物質	107	231	14		352
非発がん性物質	61	61	14		136
total	168	292	28		488

E; equivocal, ethier as positive or negative TC; technically compromised

sensitivity(%) 65.6 231/ 352

specificity(%) 44.9 61/136

concordanve(%) 59.8 292/488

表 2 鎌田の解析結果

	CA(-)	CA(+)	total
発がん性物質	103	213	316
非発がん性物質	56	49	105
total	159	262	421

表 3 染色体異常試験陽性の陽性最低濃度

	10mM 以上	1mM 以上 10mM 未満	1mM 未満	total
発がん性物質	9	55	133	197
非発がん性物質	10	12	25	47
total	19	67	158	244

表 4 発がん性予測に用いた染色体異常試験陽性を示す 244 化合物

Chem_Name		CA	CA Re-evaluation			
No.				Min. conc.	Min. conc.	
			S9	ug/mL	mM	Judge
1	Acetaldehyde	+	-	4.4	0.1	no change
2	N-acetoxy-2-acetylaminofluorene	+	-	0.3	0.001	no change
3	Acrylonitrile	+	-	5.3	0.1	no change
4	Actinomycin D	+	-	1.8	0.0014	no change
5	Aflatoxin B1	+	+	0.5	0.0016	no change
6	Aldrin	+	-	19.125	0.052	no change
7	Allyl glycidyl ether	+	-	60	0.53	no change
8	Allyl isothiocyanate	+		0.0005	0.000005	no change
9	4-aminobiphenyl	+	-,+	50	0.30	no change
10	2-amino-4-nitrophenol	+	+	15	0.1	no change
11	2-amino-5-nitrophenol	+	+	3.75	0.024	no change
12	2-amino-5-nitrothiazole	+	-	100	0.69	no change
13	Atrazine	+	-		0.085	no change
14	Auramine O	+	-	6.4	0.02	no change
15	5-azacytidine	+	-	2	0.008	no change
16	Azathioprine		-	23	0.083	no change
17	Benzaldehyde	+	-	0.005	0.00005	no change
18	Benzene	+	+	9	0.11	no change
19	Benzidine	+	-	2.5	0.014	no change
20	Benzidine 2HCl	+	-	30	0.12	no change
21	Benzo[a]pyrene	+	+	5	0.02	no change
22	Benzyl chloride	+	-	15	0.12	no change
23	2-biphenylamine HCl	+	-	200	0.97	no change
24	Bis(2-chloro-1-methylethyl)ether, technical grade	+	+	124	0.72	no change
25	Bromate, potassium	+	-	62.5	0.37	no change
26	Butylated hydroxyanisole	+	+	125	0.69	no change
27	N-n-butyl-N-nitrosourea	+	-	100	0.7	no change
28	Captafol	+	-	3.5	0.01	no change
29	Captan	+	-	7	0.023	no change
30	Carbaryl	+	-	15	0.075	no change
31	Carboxymethylnitrosourea	+	-	62.5	0.42	no change
32	Chlorambucil	+	-	0.25	0.0008	no change

検査項目の検査結果と基準値との比較結果を示す表

物質名		検査結果		基準値		
No.	物質名	検査結果	基準値	比較結果	検査結果	基準値
33	3-(chloromethyl)pyridine HCl	+	+	50	0.30	no change
34	4-chloro-o-phenylenediamine	+	-	10.1	0.07	no change
35	Chlorothalonil	+	-	0.5	0.002	no change
36	Chrysazin	+	-	5	0.02	no change
37	C.I. Acid orange 3	+	-	89.1	0.20	no change
38	C.I. Disperse blue 1	+	-	7.5	0.03	no change
39	Ciprofibrate	+	-		0.1	no change
40	Clofibrate	+	-	250	1	no change
41	Cytembena	+	-	24.9	0.08	no change
42	p,p'-DDE	+	-	8.8	0.028	no change
43	DDT	+	-	8.1	0.023	no change
44	Danthron	+	-	17	0.07	no change
45	2,4-diaminotoluene	+	-	98.5	0.81	no change
46	1,2-dibromo-3-chloropropane	+	-	47	0.2	no change
47	Dibromomannitol	+	-	150	0.49	no change
48	1,3-dibutyl-1-nitrosourea	+	-	62.5	0.31	no change
49	Dichloromethane	+	+	5	0.06	no change
50	Dichlorvos	+	-	10	0.045	no change
51	Dieldrin	+	-	1	0.003	no change
52	Diethylstilbestrol	+	-	0.1	0.00037	no change
53	Diglycidyl resorcinol ether, technical grade	+	-	0.5	0.002	no change
54	Dimethoxane	+	-	12.6	0.07	no change
55	3,3'-dimethoxybenzidine-4,4'-diisocyanate	+	-	93	0.31	no change
56	N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene	+	-	25	0.11	no change
57	N,N-dimethylaniline	+	+	83	0.69	no change
58	7,12-dimethylbenz[a]anthracene	+	+	1	0.0039	no change
59	3,3'-dimethylbenzidine 2HCl	+	-	5	0.02	no change
60	Epichlorhydrin	+	-	5	0.054	no change
61	1,2-epoxybutane	+	-	50	0.54	no change
62	Ethyl acrylate	+	-	11	0.11	no change
63	Ethyl methanesulphonate	+	-	0.003	0.000024	no change
64	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	+	-	2.5	0.016	no change
65	1-ethyl-1-nitrosourea	+	-	11.7	0.1	no change
66	5-fluorouracil	+	-	1	0.008	no change
67	Formaldehyde	+	-	6	0.2	no change

68	Fumonisin B1	+	-	1	0.0014	no change
69	Furylfuramide (AF-2)	+	-	5	0.02	no change
70	Glycidol	+	-	30	0.4	no change
71	Griseofulvin	+	-	40	0.11	no change
72	Haloperidol	+	+	10	0.026	no change
73	Heptachlor	+	+	25	0.07	no change
74	Hydrazobenzene	+	+	1.4	0.01	no change
75	N-hydroxy-2-acetylaminofluorene	+	-	1	0.0042	no change
76	Isobutyl nitrite	+	-	51	0.49	no change
77	Lasiocarpine	+	-	206	0.5	no change
78	Manganese ethylenedithiocarbamate	+	-	15	0.057	no change
79	Melphalan	+	-	1	0.0033	no change
80	4-methoxyphenol (AKA Hydroquinone monomethyl ether)	+	-		0.25	no change
81	8-methoxypsoralen	+	-	100	0.46	no change
82	Methylazoxymethanol acetate	+	-	0.13	0.001	no change
83	3-methylcholanthrene	+	-	2	0.0075	no change
84	3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene	+	+	50	0.21	no change
85	Methyl methanesulphonate	+	-	0.003	0.000027	no change
86	2-methyl-1-nitroanthraquinone	+	+	5	0.02	no change
87	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	+	-	0.003	0.00002	no change
88	Methylnitrosocyanamide	+	-	0.85	0.01	no change
89	Metronidazole	+	-	0.1	0.0006	no change
90	Mitomycin C	+	-	0.17	0.00005	no change
91	Monocrotaline	+	+	65	0.2	no change
92	Nafenopin	+	-		0.03	no change
93	Naphthalene	+	-	30	0.23	no change
94	1,5-naphthalenediamine	+	+	1	0.01	no change
95	2-naphthylamine	+	+	3.33	0.023	no change
96	5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone (AKA Nitrofurazone)	+	-	23	0.12	no change
97	Nitrogen mustard	+	-	0.02	0.0001	no change
98	1-nitropyrene	+	+	100	0.404	no change
99	4-nitroquinoline-N-oxide	+	-	0.02	0.00011	no change
100	p-Nitrosodiphenylamine	+	-	0.25	0.0013	no change

101	N-nitroso-N-methylurea	+	-	10	0.1	no change
102	4,4'-oxydianiline	+	-	100	0.50	no change
103	N-oxydiethylene thiocarbamyl-N-oxydiethylene sulphenamide	+	+	5	0.02	no change
104	Pentachloroethane	+++	-	80	0.395	no change
105	Pentachloronitrobenzene	+	-	2.4	0.01	no change
106	Phenazopyridine HCl	+	+	105	0.42	no change
107	Phenobarbital	+	-	100	0.43	no change
108	Phenolphthalein	+	+	50	0.16	no change
109	Phenoxybenzamine HCl	+	+	30	0.09	no change
110	o-Phenylphenol	+	-	100	0.59	no change
111	Propane sultone	+	-	12	0.1	no change
112	beta-Propiolactone	+	-	30	0.42	no change
113	N-propyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	+	-	0	0.057	no change
114	Pyrimethamine	+	-	50	0.201	no change
115	Quercetin	+	-	6	0.02	no change
116	p-Quinone dioxime	+	-	10	0.07	no change
117	Retinol acetate	+	-	65.6	0.2	no change
118	Safrole	+	+	83.3	0.5	no change
119	Sodium dichromate	+	-	0.1	0.0019	no change
120	Styrene oxide	+	-	3.75	0.031	no change
121	1,1,1,2-tetrachloroethane	+++	-	100	0.596	no change
122	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate	+	-	0.0062	0.00001	no change
123	Tertanitromethane	+	+	20	0.10	no change
124	4,4'-thiodianiline	+	+	100	0.46	no change
125	Thio-tepa	+	-	0.94	0.0049	no change
126	o-Toluidine	+	-	12	0.13	no change
127	Trenimon	+	-	0.00001	4.3E-08	no change
128	Triamterene	+	-	3.75	0.015	no change
129	Tribromomethane	+	+	116	0.46	no change
130	N-(Trichloromethylthio)phthalimide	+	-	5	0.017	no change
131	1,2,3-trichloropropane	+	+	59.5	0.40	no change
132	Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate	+	-	125	0.18	no change
133	Zearalenone	+	-	15	0.05	no change

134	Benzoin	+	+	20	0.1	no change
135	Caffeine	+	-	80	0.4	no change
136	4-(Chloroacetyl)-acetanilide	+	-	2.5	0.01	no change
137	o-Chlorobenzalmonitrile	+	-	6	0.03	no change
138	2-(Chloromethyl)pyridine.HCl	+	-	30.2	0.18	no change
139	Diallyl phthalate	+	+	200	0.81	no change
140	Diazinon	+	+	100	0.32	no change
141	2,4-Dichlorophenol	+	+		0.6	no change
142	Dimethoxane, commercial grade [AKA acetic acid ester with 2,6-dimethyl-m-dioxan-4-ol]	+	-	12.6	0.07	no change
143	Diphenhydramine.HCl	+	-	100	0.34	no change
144	Diphenyl-p-phenylenediamine	+	-	1	0.0038	no change
145	Eugenol	+	-	125	0.76	no change
146	FD & C red no. 3 [AKA fluorescein, 2', 4', 5', 7'-tetraiodo, disodium salt]	+	-	600	0.68	no change
147	Fenthion	+	-	1.5	0.005	no change
148	Fenvalerate [AKA cyano-3-phenoxyphenylmethyl-4-chloro-alpha-1-methyl-ethylbenzene acetate]	+	-	10	0.024	no change
149	Hexachlorocyclopentadiene	+	+	7.5	0.03	no change
150	8-Hydroxyquinoline [AKA 8-quinolino]	+	-		0.04	no change
151	4,4'-isopropylidenediphenol	+	-		0.4	no change
152	Methotrexate [AKA glutamic acid, N-(p-(((2,4-diamino-6-pteridiny)methyl)methylamino)benzoyl)-, L-]	+	-	1	0.0022	no change
153	N-(1-Naphthyl)ethylenediamine.2HCl [AKA PL-89779]	+	+	200	0.77	no change
154	1-Nitronaphthalene	+	+	16	0.09	no change
155	p-Phenylenediamine.2HCl	+	-	16	0.09	no change
156	Tetracycline.HCl	+	-	10	0.02	no change
157	Tetraethylthiuram disulfide [AKA disulfide, bis(diethylthiocarbamoyl)]	+	-	0.005	0.00002	no change

158	Malathion	+	+	303 未滿	0.92 未滿	no change
159	4-amino-2-nitrophenol	+	+	160	1.04	change
160	C.I. Disperse orange 2 (1-amino-2-methyl-anthraquinone)	+	+	300	1.26	change
161	Acetaminophen	+	-	200	1.3	change
162	3-chloro-2-methylpropene, technical grade	+	-	120	1.33	change
163	Chlorobenzene	+	+	150	1.33	change
164	Caffeic acid	+	-	260	1.4	change
165	2,6-dichloro-p-phenylenediamine	+	-	250	1.41	change
166	Bromodichloromethane	+	+	240	1.5	change
167	2-nitro-p-phenylenediamine	+	+	300	1.96	change
168	Bis(2,3-dibromopropyl)phosphate, magnesium salt	+	-	2000	2	change
169	1,2-dibromoethane	+	-	380	2	change
170	Furfural	+	-	200	2.08	change
171	Allyl isovalerate	+	+	300	2.11	change
172	3,3'-dimethylbenzidine	+	+	460	2.17	change
173	2-Acetylaminofluorene	+	+	500	2.2	change
174	Phenacetin	+	+	400	2.2	change
175	2-Mercaptobenzothiazole	+	+	373.5	2.23	change
176	Furan	+	-	160	2.35	change
177	Ethionamide	+	-	400	2.4	change
178	Styrene	+	+	250	2.4	change
179	N-methylolacrylamide	+	-	250	2.47	change
180	Methapyriline hydrochloride	+	+	747	2.51	change
181	1,1,2-trichloroethane	+	+	377	2.83	change
182	4,4'-methylenedianiline 2HCl	+	+	800	2.95	change
183	2,2-bis(bromomethyl)-1,3-propanediol, technical grade	+	+	800	3.05	change
184	6-nitrobenzimidazole	+	-	500	3.06	change
185	2,4,5-trimethylaniline	+	-	415	3.07	change
186	1-[(5-nitrofurfurylidene)amino]hydantoin (AKA Nitrofurantoin)	+	+	747	3.14	change
187	Isoniazid	+	-	440	3.2	change
188	Methimazole	+	-	370	3.2	change
189	5-nitro-o-toluidine	+	+	500	3.29	change
190	Chlorodibromomethane	+++	-	720	3.457	change

191	Chloral hydrate	+	-	600	3.63	change
192	m-Cresidine	+	+	500	3.64	change
193	4-chloro-m-phenylenediamine	+	-	525	3.68	change
194	Methylphenidate HCl	+	+	1000	3.71	change
195	HC Blue 1 (impure and purified)	+	+	960	3.76	change
196	1-chloro-4-nitrobenzene	+	+	600	3.81	change
197	Ethylene oxide	+	-	220	5	change
198	Petasitenine	+	-	1910	5	change
199	Chlorendic acid	+	+	1950	5.015	change
200	1,2-dichloroethane	+	+	500	5.05	change
201	Phenylbutazone	+	+	1600	5.19	change
202	p-Nitrobenzoic acid	+	-	875	5.24	change
203	1,2-dichloropropane	+	+	660	5.84	change
204	Furosemide	+	-	2000	6	change
205	3-(p-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea (AKA monuron)	+	+	1300	6.54	change
206	N-nitrosodimethylamine (dimethylnitrosamine)	+	+	500	6.7	change
207	o-Nitroanisole	+	+	1060	6.92	change
208	Chloramben	+	-	1510	7.33	change
209	Cupferron	+	+	1163	7.50	change
210	alpha-Methylbenzyl alcohol	+	+	1000	8.19	change
211	1,2-propylene oxide	+	+	500	8.61	change
212	Isophorone	+	-	1250	9.044	change
213	Dichloroacetic acid	+	-	1250	9.69	change
214	Coumarin	+	+	1600	10.95	change
215	Dimethyl hydrogen phosphite	+	-	1600	14.54	change
216	Trimethylphosphate	+	-	3000	21.42	change
217	Acrylamide	+	+	2000	28.14	change
218	N-nitrosodiethylamine (diethylnitrosamine)	+	+	3000	29	change
219	Hexanamide	+	-	4000	34.73	change
220	Saccharin, sodium	+	-	8000	39	change
221	Nitrobenzene	+	-		50	change
222	Urethane	+	-	8000	90	change
223	Lithocholic acid	+	-	560	1.5	change
224	Benzoate, sodium	+	-	290	2	change
225	Dimethoate [AKA phosphorodithioic acid,o,o-dimethyl	+	-	500	2.2	change

	ester,S-ester with 2-mercapto-N-methylacetamide]					
226	2,4-Dimethoxyaniline.HCl	+	-	500	2.64	change
227	C.I. acid orange 10	+	+	1250	2.76	change
228	Penicillin VK	+	-	1250	3.2	change
229	Chlorpropamide	+	-	1000	3.6	change
230	FD & C yellow no. 5 [AKA tartrazine]	+	-	2000	3.7	change
231	p-Chloroaniline	+	-	500	3.92	change
232	Carbromal	+	-	1000	4.22	change
233	2,6-Diaminotoluene.2HCl	+	-	1000	5.13	change
234	Acetohexamide	+	-	2000	6	change
235	Phthalic anhydride	+	-		10	change
236	1H-Benzotriazole	+	+	1257	10.55	change
237	p-Nitroaniline	+	+	1600	11.58	change
238	4-Nitroanthranilic acid	+	+	2200	12.08	change
239	Methyl methacrylate	+	-	1600	15.98	change
240	1-Phenyl-2-thiourea	+	+	3000	19.71	change
241	Phenol	+	+	2000	21.25	change
242	o-Anthranilic acid	+		4000	29.2	change
243	Resorcinol	+	+	4000	36.33	change
244	Benzyl alcohol	+	-	4000	36.99	change

表 5a 10mM を最高用量とした場合の発がん性予測率

10mM	CA(－)	CA(+)	Total
発がん物質	103	197	300
非発がん物質	56	47	103
	159	244	

Sensitivity: $197/300=65.7\%$

Specificity: $56/103= 54.3\%$

表 5b 1mM を最高用量とした場合の発がん性予測率

1mM	CA(－)	CA(+)	Total
発がん物質	167	133	300
非発がん物質	78	25	103
	245	158	

Sensitivity: $133/300=44.3\%$

Specificity: $78/103= 75.7\%$

III. *In vitro* 遺伝毒性と *in vivo* 遺伝毒性の 関係の評価 : *in vivo* 肝遺伝毒性と *in vivo* 骨 髄小核形成の代謝を含む機序的 QSAR モデ ルの構築に関する研究

III-1. 研究目的

発がん性および遺伝毒性はヒトの健康にとって最大の懸念材料である毒性学的エンドポイントであり、これら性質をもつ化学物質は規制の対象となる。現在、パブリックドメインで得られるデータの多くは、化学物質の遺伝毒性を評価する試験に基づく。変異原性および遺伝毒性を学術的に定義すると、固定され受け継がれる遺伝的变化を突然変異と呼ぶ。これには塩基置換および欠失、構造的染色体異常（切断および再構成）ならびに数的染色体異常（染色体の増減、すなわち異数性異常）など、様々なタイプの事象が含まれる。遺伝毒性は広義の用語であり、DNA 損傷など、固定されず受け継がれないその他の変化を含む。遺伝毒性は、細胞複製中に細胞の機構によって突然変異に変換されることもあれば、されないこともある。*In vivo* 遺伝毒性の評価に使用される適切な実験系には *in vivo* 小核試験、不定期 DNA 合成 (UDS) 試験、アルカリ性単細胞ゲル電気泳動法 (Comet 法) などがある。

遺伝毒性試験は、物質が最終的にヒトのがんを誘発する性質を有するかどうかを評価するものである。発がん性と定義される化学物質は、腫瘍を誘発するか、腫瘍の発生率を高めるか、あるいは腫瘍発生までの時間を短縮させる。発がん性物質は、推定される作用機序にもとづき、遺伝毒性と非

遺伝毒性発がん物質の 2 つに大きく分類される。遺伝毒性発がん物質は、DNA との直接相互作用によって損傷を引き起こすことから、多くの変異原物質がこのカテゴリーに属する。一方、非遺伝毒性発がん物質は DNA の変化を直接誘発しないが、ペルオキシソーム増殖、芳香族炭化水素受容体結合、ギャップ結合細胞間連絡の阻害、酸化ストレス、DNA メチル化の変化などの機序によって発がん過程に影響を与える。James と Elizabeth Miller は遺伝毒性発癌物質の作用機序を説明するため、30 年以上前に「求電子理論」を紹介した。この理論は、一部の遺伝毒性発がん物質、すなわち DNA 反応性化学物質に適用される。これらは求電子性であるか、あるいは求電子反応性中間体に活性化される。Miller の理論は当時同定されていた発癌物質のほとんどを網羅したが、それ以降、数種の遺伝毒性化学物質（染色体異常および染色体数の変化を誘発する化学物質など）は直接 DNA 反応性ではなく、Miller の理論ではそれらの作用機序を説明できないことがわかった。非遺伝毒性すなわち非遺伝子傷害性発がん物質は、多様な機序を持つことから、これらの作用機序を総括的に説明できる科学的理論は未だ見つかっていない。(Q)SAR は当初求電子反応性の原理にもとづき容易に開発されたが、非遺伝毒性発がん物質の(Q)SAR は現在でも開発段階にある。

REACH Technical ガイダンスに記載されているような統合的試験方法によると、化学物質の変異原性の評価に最も多く使用される *in vitro* 系は、細菌を用いた復帰突然変異試験 (AMES)、*in vitro* 哺乳類細胞遺伝子

突然変異試験（マウスリンフォーマ試験または *HPRT* 遺伝子突然変異試験など）、*in vitro* 哺乳類染色体異常（CA）試験、ならびに *in vitro* 小核試験である。*In vivo* での遺伝毒性に関する情報が必要な場合には、いくつかの試験方法が利用できる。代謝、薬物動態およびトキシコキネティクスの因子（ADME）は実験動物では明らかに固有の特徴である。*In vivo*UDS 試験はラット肝細胞で DNA 修復を誘導する化学物質を同定することができる。Comet 試験は DNA 鎖切断の検出法として比較的単純でありながら、感度が高い。この試験は動物のあらゆる組織の DNA 鎖切断を検出できるため、発がん標的組織での評価に利用できる。*In vivo* トランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験（TGR）も発がん標的組織での評価に有用である。*In vivo* 小核試験（MNT）は生体の遺伝毒性の評価に最も広く利用されている試験方法の1つである。他の *in vivo* 試験と同じく、MNT は *in vivo* 代謝、薬物動態および DNA 修復過程に寄与する因子がその結果を左右する。適切に実施されれば、*in vivo* MNT は染色体異常誘発性および異数性異常誘発性の両方を検出できる。

規制目的で使用する標準的な *in vitro* 変異原性試験の多くは、遺伝毒性発がん物質の検出の感度が比較的高い。一方、齧歯類の発がん性と比較して、偽陽性結果の発生率も高い（特異性が低い）試験法もある。偽陽性の化学物質の数を減らし、予測の特異性を高めるために、規制当局の担当者は *in vitro* の陽性結果を *in vivo* で見直す場合が多い。*In vitro* で観察された変異原性が *in vivo* でも認められるかどうかを明らかにすることが、遺伝毒性の評価に使用される *in*

vivo 試験の主たる役割である。さらに *in vivo* 試験は、*in vivo* でしか陽性結果を示さない化学物質の同定にも利用できる。例えば、atovaquone[95233-18-4]は、AMES ならびに *in vitro* CA で陰性の結果が報告されているが、*in vivo* MNT で陽性の結果が得られている。一連の遺伝毒性試験を補完する最も標準的な *in vivo* 試験の1つに *in vivo* 骨髄 MNT がある。UDS 試験は骨髄 MNT に代わる *in vivo* 遺伝毒性試験法であり、いくつかの規制ガイドラインで推奨されている。*In vivo* 肝遺伝毒性に対応するには、肝臓で行う *in vivo* 試験（UDS、Comet および TGR）が有効である。特に肝臓は高薬物代謝能を有する臓器であり、重大な毒性過負荷がかかりやすいという事実を考慮すると、骨髄 MNT の適切な *in vivo* フォローアップ試験として利用することができる。

本研究の主目的は、試験方法に関連する生物学的特異性を考慮し、*in vitro* 遺伝毒性試験結果と、*in vivo* 遺伝毒性試験結果の関係、いわゆる *in vitro-in vivo* 「ギャップ」を調査することである。この調査によって、*in vivo* 反応の性質を理解し、ひいては機序的 (Q)SAR モデルの開発に有用な遺伝毒性の統合的分析方法を明らかにする。*In vitro* 系と *in vivo* 系の一貫した関係を特定するために、慎重な評価によって、*in vitro* の陽性結果は、真の遺伝毒性ハザードを反映することを確認する必要がある。そのため、発表されている試験結果の信頼性確保のため、pH の変化、細胞毒性濃度、浸透圧などの非遺伝毒性的因子による陽性結果を除外した。現行の OECD ガイドラインに従って、溶解度、細胞毒性および動物の全身毒性などの因子も考慮に入れた。信頼できる結果を基

に、*in vitro* 実験系と *in vivo* 実験系とを比較し、標的組織での遺伝毒性化合物（またはその代謝物）の利用可能性を決定する因子を検討した。同一物質を対象にした *in vitro* 突然変異試験、*in vivo*（肝）遺伝毒性試験および *in vivo* 骨髄 MNT 試験の結果を網羅する大量のデータを収集した。本研究では以下の疑問に対する回答を求める。(a) *In vitro* 変異原性化学物質の *in vivo*（肝）遺伝毒性はどの程度か。すなわち *in vitro* 陽性作用を消失させる *in vivo* 解毒代謝経路は存在するのか。(b) *In vivo*（肝）遺伝毒性化学物質の *in vivo* 骨髄 MNT 陽性はどの程度か。すなわち遠隔標的に移動する化学物質を「生体内で消耗（bioexhausting）」する付加的経路は存在するのか。(c) *In vivo* 肝または骨髄遺伝毒性を有する *in vitro* 非突然変異原性化学物質は存在するのか。すなわち化学物質の *in vivo* での特異的生体活性化を予測できるかである。

こうした疑問を解決するために、遺伝毒性作用の特徴をワークフローに組み込んだ（図 1）。このワークフローによって、*in vitro-in vivo* ギャップを埋めるための段階的評価方法が可能となる。

III-2. 研究方法

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（「557 リスト」）を編集した。次に種々の遺伝毒性作用を有する化学物質と「最終的な」*in vivo* MNT データセットとの重なりを最大にするため、同セットの物質の *in vitro* 変異原性および *in vivo*（肝）遺伝毒性のデータを収集した。トレーニングセット内の非同質化学物質 397 種については、複数の文献から

in vitro 変異原性のデータを検索した。陽性の結果を数字の 1、陰性を 0 で分類し、実施した文献検索からデータがまったく見つからない場合には「利用可能なデータなし」として N/A と表示した。

ラット肝 S9 代謝活性化系を用いた AMES 結果は、非同質化学物質 267 種で得られた。このうち 95 種の物質（36%）は陽性、172 種（64%）は陰性であった。*In vitro* CA のデータは 291 種で見つかり、このうち 180 種（62%）は陽性、111 種（38%）は陰性とみなされた。MLA については化学物質 178 種のデータが評価されていた。評価された物質のほとんどが陽性（134 種、75%）であり、残る 44 種（25%）が陰性であった。

In vitro と *in vivo* 試験の比較の第 2 段階は、肝臓での *in vivo* 齧歯類遺伝毒性データに基づき行った。*In vivo* 肝遺伝毒性の評価に使用するため、Comet、UDS および TGR の結果を収集した。これらのアッセイの情報は 185 種の化学物質で見つかった。Comet では 185 種中 122 種（66%）で肝遺伝毒性の結果が得られた。この 122 種中 76 種（62%）が陽性、46 種（38%）が陰性であった。TGR の齧歯類肝遺伝毒性データは化学物質 185 種中 42 種（23%）で存在し、このうち 25 種（60%）は陽性、17 種（40%）は陰性と報告された。*In vivo* UDS の肝遺伝毒性データはきわめて少なく、結果全体でも 185 種中 21 種（11%）しかなく、このうちすべてが陰性であることが観察された。「557 リスト」には、骨髄または末梢血で行われた MNT 試験の陽性（269 種、48%）と陰性（288 種、52%）がほぼ同数含まれた。さらに、「557 リスト」の化学物質 117 種（21%）はマウス、73 種（13%）はラットで評価され、

残る 367 種 (66%) は齧歯類の動物種が明記されていなかった。

パブリックドメインから得られる *in vivo* MNT データの信頼性はモデルの構築に重要である。ほとんどの化学物質が 1980 年代初期に評価されたことや、動物種 (ラットとマウス) および性差 (雄と雌) が必ずしも考慮されなかったという事実などから、これらのデータの信頼性は必ずしも高くない。こうした欠点を回避するために、weight of evidence から、収集した *in vivo* MNT データを再評価した。齧歯類の種の差、非生理的培養条件など、*in vivo* 環境に比べて一貫性を欠く *in vitro* 結果の原因が存在するかどうかを検討するため、専門家の判断に委ねた。MNT トレーニングセット全体の質を現在、解析中である。

III-3. 結果と考察

初めに、3 レベルの遺伝毒性の実験データが存在する化学物質を対象に、*in vitro-in vivo* 遺伝毒性の評価を実施した。化学物質 397 種の突然変異原性の判定は AMES (S9 使用)、CA および MLA の *in vitro* 試験にもとづいた。185 種の *in vivo* 肝遺伝毒性は Comet、UDS および TGR にもとづき、「557 リスト」の化学物質の骨髄遺伝毒性は MNT にもとづいた。*In vivo* 肝遺伝毒性データのある全 185 種の化学物質のうち 23 種に *in vitro* データがなかった。3 レベルの試験でデータの存在した化学物質 162 種を次の解析に選択した。この 162 種のリスト表 1 に示す。これらの作用およびその相互関係を示すために、開発したワークフローにその結果を組み入れた (図 2)。

最初の調査では、化学物質 162 種中 36 種

(22%) が *in vitro* 陰性 (非変異原性) であり、121 種 (75%) は *in vitro* 陽性 (変異原性) であることが認められた。残る 5 種 (3%) は、AMES と CA のデータの不一致が認められたために、不確定と判定した。5 種はいずれも AMES 陽性であり、CA 陰性であった。これら 5 種は二塩化エチレン [107-06-2]、チアベンダゾール [148-79-8]、1-フェニルアゾ-2-ナフトール [842-07-9]、ジブチルニトロスアミン [924-16-3]、および C.I. ダイレクトブラック 38 [1937-37-7] である。

In vitro で非変異原性化学物質の 36 種 (22%) を対象に、生物学的組織化の 2 つのレベル、すなわち肝および齧歯類骨髄を用いて *in vivo* 遺伝毒性を評価した。この *in vitro* 非変異原性物質の 36 種中 22 種 (61%) の陰性反応は、*in vivo* 肝でも陰性が確認された。*In vitro* 非変異原性物質の残る 14 種 (39%) は、*in vivo* 肝陽性であることが認められ、*in vivo* 肝活性化の理由の詳しい調査が必要とされた。*In vivo* 骨髄 MNT では、この 14 種中 12 種 (86%) が陰性と記録されたが、残る 2 種 (14%) (塩酸アニリン [142-04-1] およびモノクロトホス [6923-22-4]) は陽性であった。*in vivo* 肝非遺伝毒性化学物質 22 種の骨髄組織内の運命も評価した。この 22 種中 17 種 (77%) は骨髄でも陰性と報告されたが、残る 5 種 (23%) は陽性が観察された。具体的にはコルヒチン [64-86-8]、1,1,2,2-テトラクロロエタン [79-34-5]、ファーストグリーン FCF [2353-45-9]、ソルビン酸 [110-44-1]、デヒドロ酢酸ナトリウム [4418-26-2] である。調査の結果、これら 5 種の化学物質は遠隔骨髄臓器で直接活性化されるものと考えられた。我々は *in vivo* 骨髄生体内活性化に関

する結論を導く前に、使用した実験条件、投与経路、動物種の差などの因子の関連性を考慮することによって、*in vitro-in vivo* 遺伝毒性エンドポイントの3レベルの評価で得られたデータを厳密に解析することとした。

121種の*in vitro*変異原物質についても同様の比較を実施した。このうち56種(46%)の*in vitro*変異原性化学物質は、*in vivo*肝非遺伝毒性であることが観察された。これにより、*in vitro*突然変異原性は必ずしも*in vivo*肝陽性作用の予測因子でないことが示された。121種の*in vitro*突然変異原性化学物質のうち残る65種(54%)は*in vivo*肝陽性作用を示した。この65種中37種(57%)は、骨髄の遺伝毒性結果陽性であった。これに対して、この65種中残る28種(43%)は骨髄試験で陰性であった。これらの化学物質は肝から遠隔骨髄までの過程で「衰退」されるとみられた。肝の非遺伝毒性化学物質56種の*in vivo*骨髄分布も調べた。当然ながら、この56種中36種(64%)は肝で観察された陰性が確認された。残る20種(36%)は骨髄に対する遺伝毒性を示した。

*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を対象に、厳密なデータ評価を実施し、*in vitro-in vivo*判定の不一致の原因となった因子を検討した。例えば、*in vitro*陰性反応は、化学物質の低い可溶性、高い(または低い)インキュベーション温度など、実験の実施方法の欠陥が考えられるケースがあった。同じく、*in vivo*陽性反応は、*in vitro*よりも*in vivo*での高い曝露濃度、曝露経路、(腎、胆嚢などの)肝臓外活性化など、*in vivo*に特有の実験的因子が原因であると考えられた。*in*

*vitro*系と*in vivo*系のデータの比較に際しては、実験のデザインおよび実施に由来する因子のほかにも、齧歯類の種差を考慮する必要がある。

*In vitro*と*in vivo*代謝活性化との差の影響は過去にTweatsらが評価しており、たとえばウレタンの代謝活性化には*in vitro*と*in vivo*の代謝および酵素発現に違いが関与していることが指摘されている。ウレタンのほかにも、プロカルバジン、ハイドロキノンおよびベンゼンで両系間の酵素の差が*in vivo*生体内活性化の原因であることが認められた。こうした物質および疎水性の低分子化合物の*in vitro*の結果は、発現されるP450アイソザイムの種類に強く依存する。Ghanayemらは、アクリルアミド、ウレタン、ベンゼン、アクリロニトリル、塩化ビニル、スチレン、1-ブロモプロパン、トリクロロエチレン、ジクロロエチレン、アセトアミノフェンおよびブタジエンの*in vitro*酸化活性化にP450 2E1 (CYP 2E1)が寄与することを示した。こうした化学物質のなかにも、他のP450の存在下では突然変異原性が陰性を呈する物質もある。このため、*in vitro*試験と*in vivo*試験の比較では、試験条件は別として、*in vitro*系の一般的な性質も考慮する必要がある。

*In vitro-in vivo*代謝間の見かけの不一致の特性を解析するため、*in vitro*で陰性でありながら*in vivo*肝で陽性が観察された化学物質を対象に、表面上の*in vivo*肝活性化化学物質のデータ解析を実施した。図1のワークフローに従い、14種の化学物質がこのカテゴリーに属した。なかでもN,N-ジメチルホルムアミド(DMF[68-12-2])は、CYP450酵素の効果の差による*in vitro-in vivo*代謝の

不一致を示すのに利用できる典型的な例である。DMF は AMES および CA の両試験とも陰性であったが、Comet 試験では陽性であった。

DMF の *in vitro* ラット肝ミクロソーム代謝は、CYP 450 のヘム補欠分子団を攻撃する炭素中心フリーラジカル中間体の形成により、CYP 450 の不可逆的不活化を引き起こすことが知られている。この種の障害は確実に反応性代謝物の *in vitro* 形成をさらに障害する。このため、*in vitro* インキュベーションの条件下で *in vitro* 変異原性は観察されない。

ラットに DMF を経口投与すると、CYP 2E1 以外の CYP 450 アイソフォームの活性化の低下を代償として、CYP 2E1 依存性の活性化が増大することが *in vivo* で示されている。実際、CYP 2E1 は DMF の *in vivo* 活性化を担う酵素である。反応性中間体（おそらくメチルイソシアネート）が *in vivo* で肝の毒性病変の形成に寄与し、肝毒性はもちろん、発癌性も引き起こしうると考えられる。Gescher らは、反応性中間体の前駆物質 N-ヒドロキシメチル-N-メチルホルムアミドはきわめて親水性の高い反応性物質であり、肝細胞内で *in vivo* 代謝によって形成されると、N-メチルホルムアミド（強力な肝毒性物質）、さらには上記の反応性種へ変換することを示した。

In vivo 系と *in vitro* 系の不一致を合理的に説明する例として、酢酸シプロテロン [427-51-0] の第 II 相代謝活性化が挙げられる。代謝的解毒を除き、スルホトランスフェラーゼ酵素によって触媒される第 II 相代謝硫酸化は、酢酸シプロテロンのラット *in vivo* 代謝活性化経路に重要な役割を果たす。

酢酸シプロテロンから形成される反応性種は短命であり、標的細胞内で形成された場合に限り遺伝毒性を有する。しかし、*in vitro* の S9 系は解毒補因子を欠くため、*in vitro* の代謝活性化には第 II 相スルホトランスフェラーゼ反応は含まれていない。従って、S9 存在下での *in vitro* 実験系で観察された酢酸シプロテロンの非変異原性は、*in vitro* 系の基本的な性質に依拠している。

見かけの *in vivo* 肝生体内活性化化学物質のデータ解析は未だ完了していないが、*in vitro* 系と *in vivo* 系の代謝に差があることは明らかである。「生体内代謝活性化経路」のリストが完成すれば、*in vivo* 活性化の「ロジック」と、これに関連する代謝経路を明確に定義することができる。この種のロジックは特に *in vivo* 試験の実施の費用の削減に貢献できる。したがって、未評価の化学物質が変異原性を示さず（すなわち、DNA または蛋白相互作用に必要な SA を含まず）、「生体内活性化経路」のリストに属さない場合は、「暫定的 *in vivo* 非遺伝毒性」と判定することができる。

肝生体内代謝活性化の問題に比べて、*in vivo* 骨髄内での代謝活性化（つまり、骨髄遺伝毒性代謝物が他の組織で観察されない場合）についてはあまり評価されていない。我々のデータセットには、*in vivo* 肝遺伝毒性が陰性でありながら、*in vivo* MNT が陽性の物質が 25 種存在した。このうちベンゼンは、*in vitro* 陽性、*in vivo* 肝陰性、*in vivo* MNT 陽性を示す物質の 1 つである。報告によれば、B6C3F1 マウスにベンゼンを投与した一連の実験で *in vivo* 骨髄活性化が認められた。骨髄で形成される比較的高濃度の一酸化窒素が、環状ヒドロキシル化ベンゼン代謝物

の酸化還元サイクルの過程で生成される酸素またはスーパーオキシドアニオンと反応し、ペルオキシ亜硝酸および中間体を含む他のニトロ基を産生すると推測される。ペルオキシ亜硝酸は細胞マクロ分子を直接損傷するか、硝酸化された毒性代謝物を生成する。興味深いことに、骨髄以外の組織（肝および肺）では検出可能量のニトロ誘導体の形成は観察されていない。Ross らは、マウスおよびヒトの骨髄でベンゼン代謝物の細胞特異的活性および解毒を評価した。ベンゼンの主要肝代謝物はフェノール、カテコールおよびハイドロキノンである。カテコールおよびハイドロキノンはベンゼン曝露後に骨髄内に存続することが示されている。骨髄は過酸化活性に富むことから、ベンゼンのフェノール性代謝物は過酸化によって反応性キノン誘導体に活性化され、これらが毒性の原因になると考えられた。これ以外の肝臓では陰性でありながら骨髄陽性を示す化学物質について現在、データ解析を行っている。これまでの解析結果から、肝と骨髄の代謝的不一致が最も明解な例はトルエンである[108-88-3]。骨髄は高濃度のミエロペルオキシダーゼ酵素を含有する組織であり、この酵素は、トルエンの代謝物の1つである *p*-クレゾールからのセミキノンラジカルおよびキノンメチドの形成に寄与する。こうした反応性代謝物は骨髄 DNA を傷害する可能性がある。しかし、これに比べて肝のミエロペルオキシダーゼの有効

性は低く、トルエンの主要代謝経路は馬尿酸（第Ⅱ相グリシン抱合体）であり、肝には *in vivo* 遺伝毒性を惹起する可能性がある検出可能の活性代謝物は同定されていない。

III-4. 結論

生物学的組織化の3レベルの遺伝毒性作用に関する新しい分類ワークフローを開発した。このワークフローの正当性を検証するために、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）のデータを大量に収集する必要があった。異なる情報源間の多くの不一致をできる限り小さくするために、データベースの厳密な解析を実施した。

ワークフローでは5つのレベルの *in vitro-in vivo* 関係が認識される。本研究で開発したワークフローから *in vitro-in vivo* 関係を解析した結果、*in vitro* 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。遺伝毒性ワークフローの開発は、同一化学物質の *in vitro* と *in vivo* の差は、反応性よりも評価対象臓器でのバイオアベイラビリティの差に起因するという基本的仮説に基づく。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、標的臓器での利用可能性の差により、*in vitro/in vivo* 作用に差が生じると考えられる。

表 1. *In vivo* 小核試験データをもつ 162 化合物とその遺伝毒性試験結果

CAS	Name	ivt	liver	MNT
50-06-6	Phenobarbital	1	1	1
50-32-8	Benzo(a)pyrene	1	1	1
50-55-5	Reserpine	0	0	0
51-03-6	Piperonyl butoxide	1	0	0
51-79-6	Urethane	1	1	1
52-24-4	Thio-TEPA	1	1	1
56-04-2	Methylthiouracil	0	0	0
56-23-5	Carbon tetrachloride	0	0	0
56-57-5	4-Nitroquinoline 1-Oxide	1	1	1
56-75-7	Chloramphenicol	0	0	0
57-14-7	Dimazine	1	1	1
57-22-7	Vincristine	1	0	1
57-30-7	Phenobarbital, sodium	0	0	0
57-50-1	Sucrose	0	0	0
57-57-8	Propiolactone	1	1	0
57-97-6	7,12-Dimethylbenz(A)Anthracene	1	1	1
58-08-2	Caffeine	1	0	0
58-89-9	Lindane	0	0	0
59-05-2	Methotrexate	1	1	1
59-89-2	N-Nitrosomorpholine	1	1	1
60-09-3	p-Aminoazobenzene	1	1	1
60-11-7	4-Dimethylaminoazobenzene	1	1	1
60-35-5	Acetamide	0	0	0
60-57-1	Dieldrin	1	1	1
62-44-2	Acetophenetidin	1	0	1
62-53-3	Aniline	1	1	1
62-55-5	Thioacetamide	1	0	1
64-86-8	Colchicine	1	0	1
66-27-3	Methyl Methanesulfonate	1	1	1
67-20-9	Nitrofurantion	1	1	0
67-66-3	Chloroform	1	0	0