

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）

総合研究報告書（H21-23）

—Part I— 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して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にない。国内既存化学物質データベース、英国ラーサ社のデータベース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。また、最高用量を 1mM に低減化することによる QSAR モデル（DEREK、MCASE、AWORKS）の予測率を検討したところ、DEREK、MCASE に関しては Sensitivity の改善、3つのモデル全てで Specificity の改善が観察されたことから、予測率の向上にも最高用量の低減化は重要であることが示唆された。

一方、ブルガス大学が開発した Tissue Metabolic Simulator（TIMES）は代謝物の染色体異常誘発性まで検出可能であり、さらなる Sensitivity の向上が見られその有用性が確認されたが、Specificity が低いためさらなる検証が必要である。

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し、*in vitro-in vivo* 関係を解析した結果、以下のことが明らかとなった。① *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。② 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。③ 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。

キーワード：遺伝毒性試験、染色体異常試験、QSAR、最高用量、小核試験、代謝

I. 最高濃度の低減に伴う染色体異常試験陰性化合物の陽性妥当性評価

I-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。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ため、濃度変更に伴うデータの再評価が必要である。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、至適最高濃度の解析を行った。最終的に、このアプローチが、*in silico* 染色体異常予測率向上に貢献するかどうかを検討した。

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>)、および英国ラーサ社のデータベー

ス (<http://www.lhasalimited.org/cgx>) を基に、カーランドが報告した (Kirkland et al., *Mutat Res.*, 584, 1-256, 2005) 488 化合物の *in vitro* CA データを再評価した。

国内既存 249 化学物質に関しては、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、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、懸念のレベルとして、1) 無視できる懸念、2) 最小限の懸念、3) いくらかの懸念の 3 段階に分類した。

英国ラーサ社のデータベース 488 化合物の *in vitro* CA データには、発がん性化学物質データ 352、非発がん性化学物質データ 136 が含まれる。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、最小有効濃度を①1 mM 以下、②>1~10 mM、③10mM

以上、に分類した。

また、2006 年~2009 年までに本邦で実施された化審法既存化学物質の *in vitro* CA データは 21 化合物追加され、270 化合物存在する。これに関して、10mM から 1mM に低減化した場合の 3 種類の QSAR モデル (DEREK、MCASE、AWORKS) の予測率を再計算した。

I-3. 研究結果

1994~2006 年実施された既存化学物質 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)。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、④10 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。

英国ラーサ社のデータベースを基に、カーランドが報告した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 4 に示す。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。CA 陽性 292 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 5)。244 物質の内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の相関性を評価した (表 6 a, b)。従来用いられてきた判定(最低陽性濃度 10mM) 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、結果を再評価すると、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。

2009 年度までの 270 の我が国での既存化学物質データ (149 の CA 陽性を含む) をレビューした結果。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 2)。この判定基準を基に、DEREK、MCASE、AWORKS の予測率を再計算した (図 3)。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%以上向上した。

I-4. 考察

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。しかしながら染色体異常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。この偽陽性反応は非遺伝毒性作用であるため、予測が困難である。染色体異常試験にの予測に関していくつかの(Q)SAR モデルが開発されている。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。さらに、この偽陽性反応は QSAR におけるアラートの開発の大きな障害となる。従って、より正確な染色体異常の予測には、真に染色体異常と関連する構造アラートの精査と、真の染色体異常を誘発する事件条件の最適化が重要である。2011 年医薬品の遺伝毒性試験ガイドライン(ICH)では、*in vitro* ほ乳類細胞遺伝毒性試験において非生理的条件下での偽陽性反応をできるだけ排除するため、最高用量が 10mM から 1mM に引き下げられた。この動きは、一般化学物質にも波及し現在 OECD でも最高用量の見直しが進められているが、どの程度の濃度にまで低減可能かの科学的検討はなされていない。本研究班では、これまで報告された既存化学物質の CA データを再評価し、①医薬品同様に 1mM まで低減化した場合の染色体異常試

験結果の信頼性、②1mM 以外の最高用量の提案とその科学的妥当性、③1mM に低減化した場合の従来の(Q)SAR モデルの予測率の変化を、を検討した。

1994~2006 年実施された既存化学物質 249 物質のうち CA 陽性は 116 物質(46.6%)であったが、このうち 1mM に最高用量を変更した場合、に 38 物質が陰性と判断された(図 1、表 1)。WOE、MOA 解析の結果、38 の不検出物質のうち 13 物質が遺伝毒性に懸念が残るもの、25 物質が非懸念物質と判断された(表 2)。こらら 38 物質に関して更に 4 種類の暫定最高濃度を適用したところ、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(Morita 案)(表 3)。この最高濃度を 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、OECD には Morita 案として新最高用量を提案した(2012 年 1 月)。

医薬品に適用される 1mM の最高用量は、英国ラーサ社のデータベースの解析結果か

らも問題が指摘された。すなわち、信頼できる 403 物質について、各化合物の発がん性、非発がん性と CA データとの相関性を評価した結果、1mM を最高用量と設定すると、Sensitivity : 44.3%、Specificity : 75.7% であった (表 6b)。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。

1mM への最高用量低減化した場合の 3 種類の QSAR モデル (DEREK、MCASE、AWORKS) の予測率への影響についても検討した。従来、染色体異常試験の QSAR モデルに寄る予測率はエームス試験に比べて著しく劣ることが広告されている。事実、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%) と悪い成績であった。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 MCASE、AWORKS 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。これら 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 2)。この判定基準を基に、DEREK、MCASE、AWORKS の予測率を再計算した (図 3)。感受性は、DEREK (49.6→58.2%)、MCASE (42.4→52.3%) と向上した。AWORKS (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、先に示したラーサ社のデータベース等での検証作業も必要と考えられる。

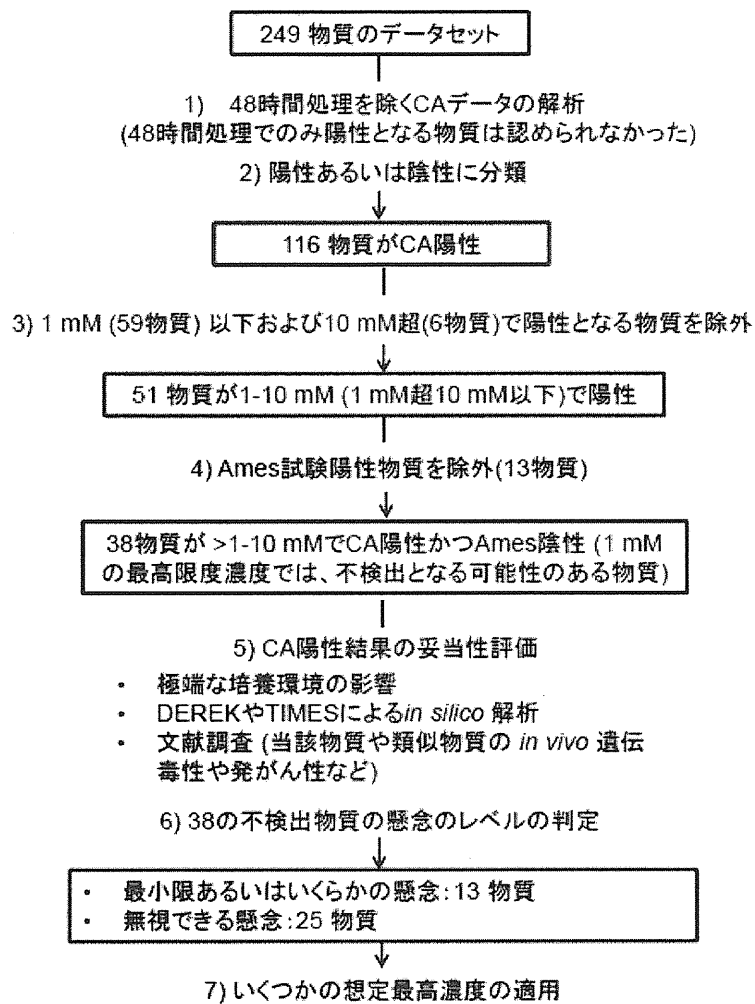


図1 データ解析のフローチャート

表1 試験最高濃度を1 mM とすることによって陰性となる38化合物

Application of different top concentrations to 38 missed chemicals (13 with minimal or some concern and 25 with negligible concern).

ID no.	Chemical name	CAS	MW	LEC (mM)	LEC (mg/mL)	Detection at different top concentration limit			
						1 mM or 0.5 mg/mL, whichever is higher	2 mM or 1 mg/mL, whichever is higher	4 mM or 2 mg/mL, whichever is lower	10 mM or 2 mg/mL, whichever is lower
13 missed chemicals with minimal or some concern									
84	Methyl acetoacetate	105-45-3	116.1	10.0	1.2	No	No	No	Yes
86	1,3-Bis(2-methylphenyl)guanidine	97-39-2	239.3	2.5	0.6	No	Yes	Yes	Yes
90	N-Ethylaniline	103-69-5	121.2	9.1	1.1	No	No	No	Yes
95	1,3,5-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid	27676-62-6	784.1	3.2	2.5	No	No	No	No
100	Ethenyltrimethoxysilane	2768-02-7	148.2	5.0	0.8	No	Yes	No	Yes
102	C.I. Fluorescent brightner 271	41267-43-0	1347.1	3.7	5.0	No	No	No	No
104	Dibutyl adipate	105-99-7	258.4	2.5	0.7	No	Yes	Yes	Yes
106	N,N-Dimethylbenzylamine	103-83-3	135.2	3.8	0.4	Yes	Yes	Yes	Yes
110	2-Hydroxypropanenitrile	78-97-7	71.1	10.0	0.7	No	Yes	No	Yes
111	2-Mercaptobenzimidazole	583-39-1	150.2	5.3	0.8	No	Yes	No	Yes
112	N-Methylaniline	100-61-8	107.2	5.5	0.6	No	Yes	No	Yes
115	Trimethoxyphosphine	121-45-9	124.1	10.0	1.2	No	No	No	Yes
116	Trimethylamine	75-50-3	59.1	6.4	0.4	Yes	Yes	No	Yes
	Number of chemicals detected among the 13 chemicals					2	8	3	11
25 missed chemicals with negligible concern									
79	3-Aminobenzenesulfonic acid	121-47-1	173.2	2.4	0.4	Yes	Yes	Yes	Yes
80	2-Amino-5-chloro-4-methylbenzenesulfonic acid	88-53-9	221.5	9.0	2.0	No	No	No	Yes
81	2-Amino-5-methylbenzenesulfonic acid	88-44-8	187.2	5.1	1.0	No	Yes	No	Yes
82	Glycerol triacetate	102-76-1	218.2	10.0	2.2	No	No	No	No
83	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	138.1	5.1	0.7	No	Yes	No	Yes
85	1-Naphthylacetic acid	86-87-3	186.2	9.1	1.7	No	No	No	Yes
87	tert-Butyl-methacrylate	585-07-9	142.2	2.8	0.4	Yes	Yes	Yes	Yes
88	o-Dichlorobenzene	95-50-1	147.0	1.6	0.2	Yes	Yes	Yes	Yes
89	Dicyclohexylamine	101-83-7	181.3	3.3	0.6	No	Yes	Yes	Yes
91	2-Hydroxyethyl methacrylate	868-77-9	130.2	5.0	0.7	No	Yes	No	Yes
92	4-Methylbenzoic acid	99-94-5	136.2	8.8	1.2	No	No	No	Yes
93	Triphosphoric acid aluminium salt	13939-25-8	317.9	6.3	2.0	No	No	No	Yes
94	4,4'-Sulfonyldiphenol	80-09-1	250.3	1.6	0.4	Yes	Yes	Yes	Yes
96	1,2-Dicyanobenzene	91-15-6	128.1	2.5	0.3	Yes	Yes	Yes	Yes
97	2-(Diethylamino)ethyl methacrylate	105-16-8	185.3	3.2	0.6	No	Yes	Yes	Yes
98	Methacrylic acid, monoester with propane-1,2-diol	27813-02-1	144.2	5.0	0.7	No	Yes	No	Yes
99	(Methacryloyloxyethyl) trimethylammonium chloride	5039-78-1	207.7	10.0	2.1	No	No	No	No
101	2-Chlorophenol	95-57-8	128.6	2.0	0.3	Yes	Yes	Yes	Yes
103	1,4-Dibromobenzene	106-37-6	235.9	2.3	0.6	No	Yes	Yes	Yes
105	2-(Di-n-butylamino)ethanol	102-81-8	173.3	1.9	0.3	Yes	Yes	Yes	Yes
107	2,4-Dinitrophenol	51-28-5	184.1	6.5	1.2	No	No	No	Yes
108	2-Ethylbutyric acid	88-09-5	116.2	3.4	0.4	Yes	Yes	Yes	Yes
109	Ferrous sulfate heptahydrate	7782-63-0	278.0	1.8	0.5	Yes	Yes	Yes	Yes
113	p-Nitrophenol sodium salt	824-78-2	161.1	3.8	0.6	No	Yes	Yes	Yes
114	Sorbitan mono-octadecanoate	1338-41-6	430.6	2.5	1.1	No	No	Yes	Yes
	Number of chemicals detected among the 25 chemicals					9	17	14	23

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 倍数体のみ誘発 (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

表4. カーランドの解析結果

	CA(-)	CA(+)	E	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, either as positive or negative

sensitivity(%) 65.6 231/ 352

specificity(%) 44.9 61/136

concordance(%) 59.8 292/488

表5 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6a 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: $197/300=65.7\%$

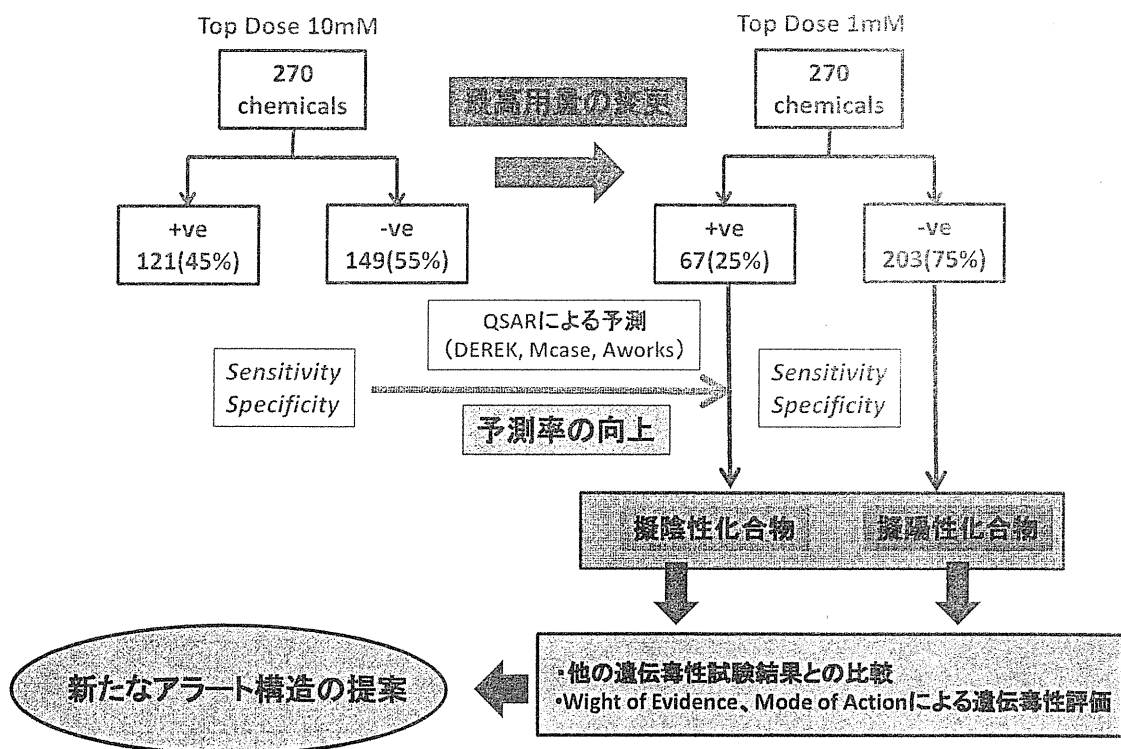
Specificity: $56/103=54.3\%$

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: $78/103=75.7\%$



3

図2 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			Prediction		
		+	-	?	71.1% (Concordance)		
CA	+	121	60	61	0	49.6% (Sensitivity)	
Results	-	149	17	132	0	88.6%(Specificity)	
		270	77	193	0		
MCASE (MIR6 Data)		Prediction			Prediction		
		+	-	?	54.4% (Concordance)		
CA	+	118	50	61	1	42.4% (Sensitivity)	
Results	-	144	40	93	17	64.6%(Specificity)	
		262	90	154	18		
AWORKS (SVM-KNN)		Prediction			Prediction		
		+	-	?	48.1% (Concordance)		
CA	+	118	27	91	0	22.9% (Sensitivity)	
Results	-	144	44	99	1	68.8%(Specificity)	
		262	71	190	1		
DEREK		Prediction			Prediction		
		+	-	?	75.6% (Concordance)		
CA	+	67	39	28	0	58.2% (Sensitivity)	
Results	-	203	38	165	0	81.3%(Specificity)	
		270	77	193	0		
MCASE (MIR6 Data)		Prediction			Prediction		
		+	-	?	61.5% (Concordance)		
CA	+	65	34	27	4	52.3% (Sensitivity)	
Results	-	197	56	127	14	64.5%(Specificity)	
		262	90	154	18		
AWORKS (SVM-KNN)		Prediction			Prediction		
		+	-	?	59.2% (Concordance)		
CA	+	65	15	50	0	23.1% (Sensitivity)	
Results	-	197	56	140	1	71.1%(Specificity)	
		262	71	190	1		

図3 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

II. Tissue Metabolic Simulator (TIMES) による染色体異常誘発性の予測に関する研究。

II-1. 研究目的

遺伝毒性の評価は、化学物質の承認及び登録における安全性確認に重要である。すべての遺伝毒性エンドポイントを検出する単一の試験はないため、遺伝毒性の評価にはエンドポイントが異なる一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験が推奨されている。遺伝毒性の予測に使用されるコンピュータプログラムは、これまで主にバクテリアでの復帰突然変異試験（エームス試験）の結果を変異原性の指標として予測することに焦点を合わせており、これに関しては比較的良好的な予測率が達成されている。エームス試験に対するモデルの性能が優れていることは、この試験システムに関して利用可能なデータが豊富であること、遺伝学的エンドポイントの基礎をなしている分子メカニズムが比較的良く理解されていること、化学構造と遺伝毒性を直接的に関連付けることが可能であることなどによる。一方、染色体異常を検出に関してはモデル開発のプロセスがより複雑である。染色体異常試験は標準化された試験であるが、利用可能な実験データベースはエームス試と比較し著しく少ない。さらに、化合物と DNA の直接的相互作用に加え、化合物と DNA 複製及び転写に関与する酵素や、染色体分配に関与するその他の核タンパク質（例、ヒストンタンパク質）との相互作用などのその他のメカニズムも染色体異常を引き起こす場合がある。染色体異常は、分裂中期における染色体の構造的・特性的結果として観察可能となり、

構造的又は数的異常として認識される。本研究では、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として、組織代謝シミュレータを組み入れた新たな QSAR モデルの適用を試みる。

II-2. 研究方法

染色体異常誘発性の予測には組織代謝シミュレータ (Tissue Metabolic Simulator ; TIMES) を利用した。TIMES モデルは確率的アプローチに基づく。これは、階層的に並べられたトランスフォーメーションのリスト、そしてこれらを実行するサブストラクチャーとマッチしたエンジンからなる。ブルガス大学が開発した確率的アプローチでは、トランスフォーメーションの階層は、実証された代謝トランスフォーメーションのデータベース、又は消失速度に関するデータを再現する過程において判定されたトランスフォーメーション確率により規定されている。トランスフォーメーション確率は、代謝試験の時間枠における様々な反応の発現の可能性に付随する速度定数と関連している。トランスフォーメーションは独立しており、経時的に行われると仮定されている。各分子のトランスフォーメーションは、親のサブ分子フラグメント、トランスフォーメーション産物、及び抑制マスク (inhibiting masks) からなる。抑制マスクは、反応抑制において役割を果たす。マスクとして割り当てられたフラグメントが標的のサブフラグメントに付着された場合、親化合物のトランスフォーメーションが妨げられる。代謝反応を促進又は抑制するグループの存在は、主要なトランスフォーメーション

オン数を著しく増加させる。中間代謝及び臓器特異的な代謝において知られている有機官能基の数は 60 種類以下であるが、多官能性化合物に関して起こる可能性のある反応は無数である。位置異性も、組み合わせが爆発的に多くなる原因の一つである。現在、343 種類の主要なトランスフォーメーションが、ラット肝臓における代謝のモデル化に使用されている。これらのトランスフォーメーションは、2 種類の主要な反応に分類されている。第 1 の分類には、試験の時間尺度において非常に速い速度で起こる 41 種類の非生物のおよび酵素制御反応が含まれる。高度に反応性のグループのトランスフォーメーション及び中間体はここに含まれる。互変異性などの様々な化学平衡プロセスもまた、この種類のトランスフォーメーションに含まれる。反応の第 2 の分類には、酸化的、酸化還元、還元的、加水分解的、及び合成反応などの第 1 相及び第 2 相解毒メカニズムの 302 種類の代謝トランスフォーメーションが含まれる。

シミュレータは、親分子を、発現する確率が最も高いトランスフォーメーションと関連した反応フラグメントとマッチさせることから開始される。マッチが同定された場合、分子は代謝され、トランスフォーメーション産物は次の変換工程の親分子として扱われる。この手順は、新規に形成された化合物に対し、継続的に実施されたトランスフォーメーションの確率の積が、ユーザーにより規定された閾値に達するまで繰り返される。初めに、親化合物はトランスフォーメーションリストにかけられ、付随するサブストラクチャーに適合するすべてのトランスフォーメーションが親化合物に

対して実行され、第 1 レベルの代謝物のリストが産生される。産生されたこれらの各代謝物は、第 2 レベルの代謝物を産生するために同一のトランスフォーメーションリストにかけられ、これが繰り返される。数学的形式論は、トランスフォーメーションが経時的に起こるという仮定に基づいている。つまり、最も可能性の高いトランスフォーメーションが最初に親化合物に適用され、その後残りの未代謝親分子がより確率の低い第 2 のトランスフォーメーションを受け、これが繰り返される。

代謝シミュレータの反応確率は、哺乳類（主にラット）の肝代謝に関する 332 種類の実証されたマップを含むデータベースを再現するように調整されている。トレーニング用セットが実証されたマップを再現する程度が、シミュレータの性能を規定し、これは新規の実験的エビデンスにより調節可能である。同様に、シミュレータの個々のトランスフォーメーションが実証された代謝物を再現する速度に基づき、産生された代謝物及び代謝マップの信頼性を評価するアセスメントが導入されている。

II-3. 結果と考察

ブルガス大学のメケニアン博士らは、DNA との共有結合的相互作用に関して過去に作成されているモデル（エームス試験モデル）を、染色体異常誘発活性を引き起こすタンパク質との付加的な相互作用のメカニズムを考慮した新規のモデルを組み合わせた新しい染色体異常を予測する QSAR を開発した。タンパク質との付加的なメカニズムとしてはトポイソメラーゼ阻害、及び DNA に関与する核タンパク質（例、ヒス

トタンパク質)との相互作用を計算に入れた。これらメカニズムはDNA合成を妨害し、染色体異常を引き起こす。この関連性を考慮し、染色体異常のQSARによる予測のために一連のモデルが開発された。これは、構造学的指標セットに基づく最適化アプローチ (Optimized Approach Based on Structural Indices Set : OASIS) の組織代謝シミュレータ (tissue metabolic simulator : TIMES) 構築基盤に組み入れられているエームス試験モデルと、染色体異常を引き起こす付加的な相互作用メカニズムを説明するためのモデルを組み合わせたものである。いずれのモデルも、古典的な反応性アラートの概念に基づくが、特定化されたアラートの一部は、DNA 又は核タンパク質と直接相互作用するが、その他は残りの分子によるアラートの活性化の程度を評価する 2 又は 3 次元定量的構造活性相関モデルとの組み合わせで構成されている。各アラートの使用は、相互作用の機構的解釈により検証されている。ラット肝臓 S9 の代謝シミュレータとの併用することにより、親化合物としては活性を誘発しないが、代謝的に活性化された化合物によって誘発された染色体異常誘発性を予測することが可能である。モデルを評価するために、化学物質を代謝活性化の有無別に識別したトレーニング用セットを用いた。代謝活性化を伴わないモデルの性能は、感度 77%、及び特異度 82%であった。一方、代謝シミュレータと組み合わせたモデルに関しては、感度は 75%であったが、特異度は 56%程度であった。このモデルの低い特異度を、特定のアラートと関連付けることは残念ながらできていない。モデルの性能は、さらなる S9 活性化化

合物をトレーニング用セットに組み入れるごとに改善されると考えられる (特に代謝活性化後に染色体異常陰性となる化合物)。また、染色体異常試験結果陽性の多くには実際の遺伝毒性とは無関係の非特異的反応も多く含まれることから、信頼性の高い試験データセットの利用も予測率の改善に重要と考えられる。

染色体異常試験結果陽性化合物の中で 1 mM 以上の高濃度のみで陽性を示すものは、非生理的条件下による非特異的な陽性反応であり、実際の遺伝毒性とは無関係との意見が多いことから、医薬品の遺伝毒性ガイドラインに関しては最高濃度の 1mM までの低減化が検討されている。これに伴い、これまでの染色体異常データベースの変更が必要となり、QSAR でのアラートの変更も必要となるかもしれない。また、非特異的陽性結果が減少することから予測率の向上が期待できる。一方、化学物質によっては逆に高濃度でのみ陽性を示す潜在的遺伝毒性物質を見逃す可能性があり、その予測には QSAR が有効であるかもしれない。

1994 年から 2006 年までに我が国で OECD ガイドラインに従い、GLP 管理の下に *in vitro* 染色体異常試験が行われた 249 化合物を調査した。この中で陽性結果を示すものは 113 化合物(45%)であり、この陽性化合物のうち 1mM 以上で陽性を示すものは 54 化合物 (48%) であった。1mM に最高用量を低減化することによってこれら化合物は陰性と判定される。この 54 化合物が陰性と判断される科学的妥当性、および健康リスクへの影響を検討した。54 化合物のうちエームス試験陽性化合物が 14 化合物、OECD ガイドラインで要求する濃度

(10mM) 以上で試験され、陽性となったものを除くと 37 化合物であった。37 化合物中、20 化合物で観察された陽性反応は低 pH(5 化合物)、高い細胞毒性 (13 化合物)、倍数体の誘発(2 化合物)と関連した非特異的陽性反応と判断された。残り 17 化合物に関しては陰性とすべき合理性は染色体異常試験結果、他の遺伝毒性試験データからは認められなかった。17 化合物については DEREK、TIMES によって染色体異常誘発

性に関する QSAR アラートの検索を行った。DEREK では 3 化合物、TIMES では 10 化合物 (代謝中間体を含む) でアラートが検出された (表 1)。TIMES での特異性は 56%と低いことが報告されており、この全てに遺伝毒性があるとは考えにくい、いくつかの化合物 (#99, #91) に関しては、さらなる検証が必要と考えられる。

表 1 DERK と TIMES のアラートの比較

Chemical	CA Alerts by DEREK	CA Alerts by TIMES
Positive only with S9		
1,4-Dibromobenzene (#65)		CA (M)
Dibutyl adipate (#70)		
2-Mercaptobenzimidazole (#71)		CA (P, M)
Sorbitan monoctadecanoate (#76)		
N,N-Dimethylbenzylamine (#79)		CA (M)
2-(Diethylamino)ethyl methacrylate (#83)		CA (M)
(Methacryloyloxyethyl) trimethylammonium chloride (#99)	CA	CA (P)
Ethenyltrimethoxysilane (#111)		CA (M)
Others		
2-Hydroxypropanenitrile (#60)		
N-Methylaniline (#68)		CA (M)
Methacrylic acid, monoester with propane-1,2-diol (#75)		CA (P, M)
2,4-Dinitrophenol (#91)	CA	CA (P, M)
Trimethylamine (#92)		
2-Chlorophenol (#96)	CA	
p-Nitrophenol sodium salt (#98)		CA (P, M)
2-(Di-n-butylamino)ethanol (#110)		

P: Parent, M: Metabolite

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

遺伝毒性の評価は、化学物質の承認及び登録における安全性確認に重要である。すべての遺伝毒性エンドポイントを検出する単一の試験はないため、遺伝毒性の評価にはエンドポイントが異なる一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験が推奨されている。遺伝毒性の予測に使用されるコンピュータプログラムは、これまで主にバクテリアでの復帰突然変異試験（エームス試験）の結果を変異原性の指標として予測することに焦点を合わせており、これに関しては比較的良好的な予測率が達成されている。エームス試験に対するモデルの性能が優れていることは、この試験システムに関して利用可能なデータが豊富であること、遺伝学的エンドポイントの基礎をなしている分子メカニズムが比較的良く理解されていること、化学構造と遺伝毒性を直接的に関連付けることが可能であることなどによる。一方、染色体異常を検出に関してはモデル開発のプロセスがより複雑である。染色体異常試験は標準化された試験であるが、利用可能な実験データベースはエームス試と比較し著しく少ない。さらに、化合物と DNA の直接的相互作用に加え、化合物と DNA 複製及び転写に関与する酵素や、染色体分配に関与するその他の核タンパク質（例、ヒストンタンパク質）との相互作用などのその他のメカニズムも染色体異常を引き起こす場合がある。染色体異常は、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り、構造的又は数的異常として認識される。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多様な計算的アプローチが必要である。さらに *in vivo* 遺伝毒性試験（小核試験等）の予測となると更に、*in vitro* とは異なる生理環境、特に薬物代謝の影響があるためより複雑である。*In vivo* では化学物質は代謝によって活性化されるよりも、解毒にシフトするため選択毒性を考慮する必要がある。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・条件をみつけだすことが困難であるため、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。

本研究の主目的は、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、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。

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 年代初め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 1)。

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。

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%) 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。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。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。

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。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。

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。

本研究結果を基に、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) を応用し *in vivo* 遺伝毒性モデル

の開発を行う予定である。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。

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した。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。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。

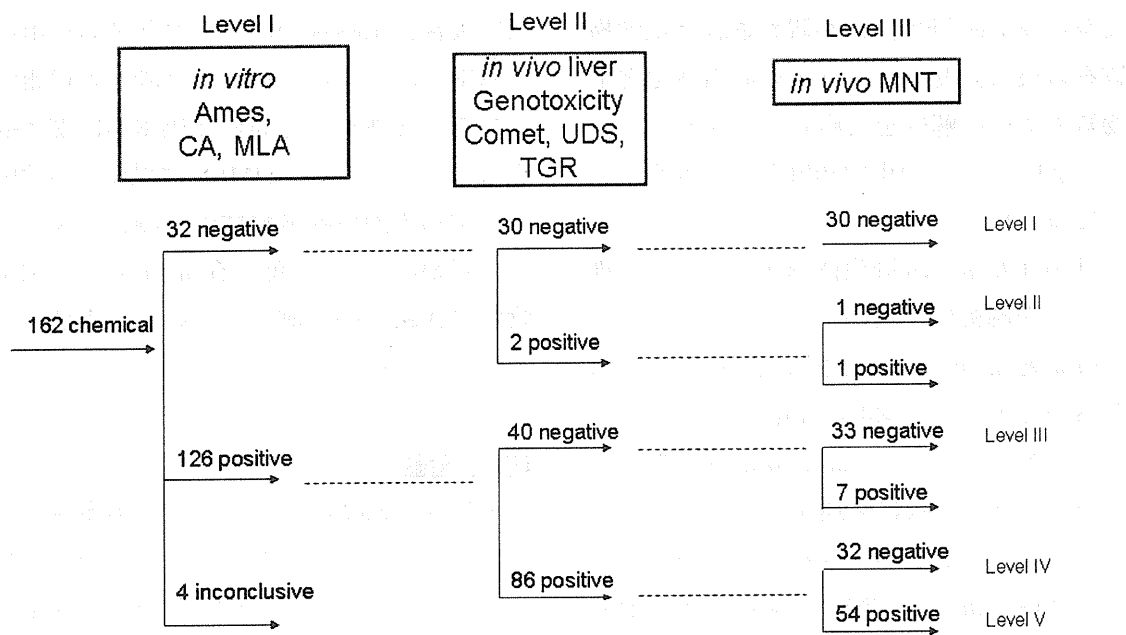


図1 ワークフローに組み込んだ 162 化合物の分類