

## G. 参考文献

- 1) Ashikaga T., Yoshida Y., Hirota M., Yoneyama K., Itagaki H., Sakaguchi H., Miyazawa Y., Ito Y., Suzuki H., Toyoda H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol, *Toxicology in Vitro*, **20**, 767-773, 2006.
- 2) Sakaguchi H., Ashikaga T., Miyazawa Y., Yoshida Y., Ito Y., Yoneyama K., Hirota M., Itagaki H., Toyoda H., Suzuki H., Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT, *Toxicology in Vitro*, **20**, 774-784, 2006.
- 3) Ashikaga T., Sakaguchi H., Sono S., Kosaka N., Ishikawa M., Nukada Y., Miyazawa M., Ito Y., Nishiyama N., Itagaki H., A comparative evaluation of in vitro skin sensitization tests: the human Cell-line Activation Test (h-CLAT) versus the Local Lymph Node Assay (LLNA), *ATLA*, **38**, 1-10, 2010..
- 4) Sakaguchi H. Ryan C., Ovigne JM., Schroeder KR., Ashikaga T., Predictiong skin sensitization potential and inter-laboratory reproducibility of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) in the European Cosmetics Association (COLIPA) ring trials. *Toxicology in Vitro*, **24**, 1810-1820, 2010.
- 5) Nukada Y, Ashikaga T. Sakaguchi H., Sono S, Mugita N, Hirota M, Miyazawa M, Ito Y, Sasa H, Nishiyama N., Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT) Contact Dermatitis. *65(6)*:343-53, 2011.
- 6) Ashikaga T., Sakaguchi H., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yamada T., Yoshida M., Ota N., Hasegawa S., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Kosaka N, Sono S and Ohno, Y., Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study, *AATEX*, **13** (1), 27-35, 2008.
- 7) Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Yamada T., Yoshida M., Kodama T., Sono S., Ashikaga T., Sato J., Ohta N., Hasegawa S., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H. and Ohno, Y., A study of the criteria for THP-1 cells selection in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) : Results of 2<sup>nd</sup> Japanese Inter-laboratory Study, *AATEX*, **13** (2), 55-62, 2008.
- 8) Sono S., Yamada T., Kosaka N., Okamoto K., Mizuno M., Sato J., Yoshida M., Ota N., Kodama T., Okamoto Y., Kuwahara H., Sakaguchi H., Hasegawa S., Ashikaga T. and Ohno, Y., A study on serum difference on test results in the human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 3<sup>rd</sup> Japanese inter-laboratory study, *AATEX*, **13** (2), 63-69, 2008.
- 9) Mizuno M., Yoshida M., Kodama T., Kosaka N., Okamoto K., Sono S., Yamada T., Hasegawa S., Ashikaga T., Kuwahara H., Sakaguchi H., Sato J., Ota N., Okamoto Y. and Ohno, Y., Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results: Results of the 4<sup>th</sup> Japanese inter-laboratory Study, *AATEX*, **13** (2), 70-82, 2008.
- 10) Kosaka N., Inaba H., Okamoto K., Mizuno M., Sono S., Kato Y., Kishi M., Ashikaga T., Okamoto Y., Kuwahara H., Nakamura T., Sakaguchi H., and Ohno, Y. 11. Results of the Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (5th Report): A study for evaluating preservative skin sensitization potential using h-CLAT, *AATEX*, **15** (2), 71-80, 2010.
- 11) Okamoto K., Kato Y., Kosaka N., Mizuno M., Inaba H., Sono S., Ashikaga T., Nakamura T., Okamoto Y., Sakaguchi H., Kishi M., Kuwahara H., and Ohno, Y., Results of a Japanese ring study of human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization (6th Report): A Study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT, *AATEX*, **15** (2), 81-88, 2010.
- 12) Sono S., Mizuno M., Kosaka N., Okamoto K., Kato Y., Inaba H., Nakamura T., Kishi M., Kuwahara H., Sakaguchi H., Okamoto Y., Ashikaga T. and Ohno, Y., Results of a Japanese ring study of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th Report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials, *AATEX*, **15** (2), 89-96, 2010.

## H 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nukada Y, Ashikaga T. Sakaguchi H., Sono S, Mugita N, Hirota M, Miyazawa M, Ito Y, Sasa H, Nishiyama N., Predictive performance for human skin sensitizing potential of the human cell line activation test (h-CLAT) Contact Dermatitis. *65(6)*:343-53, 2011
- 2) 大野泰雄、薬理学における動物実験代替法研究の重要性、日本薬理学雑誌138, 99-102, 2011.
- 3) Yodate HT, Kai T, Aoki M, Minowa Y, Yamada T, Kimura T, Ono A, Yamada H, Ohno Y, Urushidani T. Identification of a novel set of biomarkers for evaluating phospholipidosis-inducing potential of compounds using rat liver microarray data measured 24-h after single dose administration. *Toxicology*. **295**, 1-7, 2012.
- 4) Uehara T, Minowa Y, Morikawa Y, Kondo C, Maruyama T, Kato I, Nakatsu N, Igarashi Y, Ono A, Hayashi H, Mitsumori K, Yamada H, Ohno Y,

Urushidani T. Prediction model of potential hepatocarcinogenicity of rat hepatocarcinogens using a large-scale toxicogenomics database. Toxicol Appl Pharmacol. 255, 297-306, 2011.

## 2. 学会発表

- 1) Ohno, Y., Japanese regulation for food safety and role of National Institute of Health Sciences. 1<sup>st</sup> Pan Asia Conference on Food & Drug Safety Assessment Policies and Regulations in Different Countries I (2011.4.15)
- 2) 大野泰雄、ICH M3(R2)ガイドラインへの経緯、日本毒性学会(2011,7.13)
- 3) 大野泰雄、レギュラトリーサイエンスと国立衛研、名古屋市立大学大学院薬学研究科医薬品質保証学分野・医薬品安全性評価学分野発足公開シンポジウム (2011.7.16)
- 4) 大野泰雄、医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期とヒト初回投与について、国立精神・神経センター (2011.7.22)
- 5) 大野泰雄、MD試験および探索的INDをめぐる最近の国際的動向、APDD シンポジウム (2011.12.16)
- 6) 大野泰雄、安全性評価における動物実験と in vitro 代替法の利点および問題点、その現状について、東京都健康安全研究センター技術懇話会 (111208)
- 7) Yasuo Ohno, Reliability of Data for New Drug Application in Japan -Non-GLP Tests-, Global Quality Assurance Conference (2011.11.15)

## I. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
国際協調により公的な試験法を確立するための手順に関する研究  
分担研究報告書

バリデーション研究における被験物質の選択法に関する研究  
－コメットアッセイにおける被験物質の選択－

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

研究要旨

コメットアッセイのバリデーション研究における被験物質の選択にあたり、化学物質の発がん性、既存 in vivo コメットアッセイや in vivo 小核試験を含む標準的遺伝毒性試験結果、特性（化学物質クラスおよび Mode of Action）、急性毒性、ならびに入手可能性を検討した。本バリデーション研究では、最大 43 物質の使用が計画されていることから、第 1 次選択では主に発がん性、遺伝毒性、化学物質クラスなど科学的観点から 88 物質を選択し、次いで第 2 次選択では、化学物質の類似性や価格、取扱い容易性、入手可能性など実務的観点を加味し、それを 47 物質（陽性対照物質および新規追加物質を含む）に絞り込んだ。ここで「遺伝毒性物質」は、Ames 試験陽性あるいは標準的 in vivo 試験陽性とした。さらに本バリデーション研究における最大規模の検討事項である発がん予測性に関する研究（phase 4 - step 2）においては、最終的に 40 物質を選択した（陽性対照の 1 物質を除く）。その内訳は、遺伝毒性発がん物質 19、遺伝毒性非発がん物質 6、非遺伝毒性発がん物質 7、非遺伝毒性非発がん物質 8 である。これらの選択した被験物質は、本バリデーション研究において、コメットアッセイの特性評価の検証（発がん感受性、特異性および UDS 試験代替性等）に妥当であると考えられる。また、ここで検討した内容は、バリデーション研究における被験物質選択のための一般原則として、以下の検討が有効であることを示唆している：①当該バリデーション研究の主目的に応じた最小限の被験物質数の導出、②当該毒性分野や関連分野で検討された十分な数の候補物質の収集、③科学的絞込み（化学物質クラス、化学物質構造、作用機序・作用様式、物性や既存情報の充実性）、④実務的絞込（毒性値、入手可能性、取扱い容易性、価格）。

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

森川 馨 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部部長

オンとは、当該試験法について、その信頼性および妥当性を確立するためのプロセスのことであり、バリデーション研究はそのための科学的活動と理解される。

遺伝毒性試験は、安全性試験の主要な試験項目の 1 つであり、医薬品や工業化学物質など、基本的にはすべての新規化学物質に対して試験を実施し、その有無（特性）を評価する必要がある。遺伝毒性試験は、その用いる試験系に応じ、in vitro 試験と in vivo 試験に分けられるが、in vivo 試験は in vitro での知見の生体内での確認ならびにリスク評価の観点から極めて重要であり、重みが高い。

A. 研究目的

行政への申請のための安全性試験の新規開発あるいは改良のためには、OECD Guidance Document 34 (GD34)<sup>1)</sup>により規定されたバリデーション研究および専門家による第三者評価を経なければ、一般的には行政的には受け入れられない。バリデーション

しかしながら、従来の *in vivo* 遺伝毒性試験は、試験対象臓器が主に血液系、ならびに一部の試験で肝臓に限られ、*in vivo* 試験の感受性の低さならびに試験手法の複雑性/煩雑性/経済性などの観点から、小核試験に加えて実施できる適切な試験法がなかった。しかしながら、単細胞に分離可能な組織/臓器の全てが評価対象となり、かつ方法が簡便な *in vivo* 試験法としてコメットアッセイが開発され、その利用価値が注目されている。特に、小核試験に次ぐ第2の *in vivo* 試験として UDS 試験の代替としての利用が考慮されている。しかしながら、コメットアッセイを行政的に受入れ可能な試験とするためには、先に述べたバリデーションを実施し、その信頼性および妥当性を評価して容認可能なものと認識されなければならない。遺伝毒性試験の目的の1つは発がん物質の検出であり、当該遺伝毒性試験で発がん物質を試験した場合に陽性結果を示す割合（感受性）が高いのが望ましい一方で、非発がん物質では陰性結果を示す割合（特異性）も高いのが理想的である。そのため、遺伝毒性試験のバリデーション研究では、発がん物質および非発がん物質の両者を用いて、試験法の妥当性を検証する必要がある。そこで、コメットアッセイのバリデーション研究には、どのような物質を被験物質として選択すれば効果的かを検討した。

## B. 研究方法

コメットアッセイには、遺伝毒性試験において肝 UDS 試験に代わる第2の *in vivo* 試験としての役割が求められていることから、被験物質の選択に関しては、発がん性、GHS 分類、遺伝毒性、化学物質特性、急性毒性および入手可能性を考慮する必要がある。以下、各項目について述べる。

### 1) 発がん性

発がん性については、動物ならびにヒトについて考慮する必要があり IARC 評価<sup>2)</sup>に基づいた。IARC で評価されていない物質については、動物における発がん性試験結果のデータベースである Carcinogenicity Potency Database (CPDB)<sup>3)</sup>に基づいた。また、Kirkland ら<sup>4)</sup>は、*in vitro* 遺伝毒性試験の実効性を評価するための遺伝毒性物質ならびに非遺伝毒性物質のリストを報告しており、当リストに準じ、遺伝毒性発がん物質、遺伝毒性非発がん物質、非遺伝毒性発がん物質および非遺伝毒性非発がん物質の4種に分類することとした。

### 2) GHS 分類

化学物質の GHS 分類は、国連勧告に基づく新たなハザード分類である。EU では、従来の Annex I

による EU 危険物分類から、REACH 施行にあわせ GHS 分類に転換してきており、2008 年 12 月にリストが発表された<sup>5)</sup>。当該リストに記載されている物質については、EU による GHS 分類（発がん性および生殖細胞変異原性）を調査した。

### 3) 遺伝毒性

遺伝毒性は、原則的には *in vitro* 試験および *in vivo* 試験を組み合わせたバッテリー試験で評価する。そこで、標準的バッテリーの構成試験である Ames 試験、*in vitro* 染色体異常試験および *in vivo* 小核試験（血液系細胞）の結果を調査した<sup>2,4,6)</sup>。加えて、UDS 試験の代替法としての位置づけから、肝 UDS 試験<sup>2,7-9)</sup>、既存のコメットアッセイ<sup>9,10)</sup>ならびに最近の *in vivo* 遺伝毒性試験の評価結果<sup>11)</sup>について調査した。

なお、発がん性分類も含めここでは、「遺伝毒性物質」を、Ames 試験陽性あるいは標準的 *in vivo* 試験（主に赤血球小核試験）陽性の物質とした。

### 4) 化学物質特性

発がん物質は、遺伝毒性発がん物質と非遺伝毒性発がん物質に大別される。遺伝毒性試験の目的の1つは、遺伝毒性発がん物質の検出にあるが、遺伝毒性発がん物質は、その化学物質クラスあるいは作用様式 (Mode of Action, MOA) が多種多様である。コメットアッセイが種々の遺伝毒性発がん物質に広く適用化可能か否かを検証するために、被験物質のクラスや発がんの MOA など、関連する特性を、主に Kirkland ら<sup>4,11)</sup>、Morita ら<sup>6)</sup>、Sasaki ら<sup>9)</sup>の報告および HSDB<sup>13)</sup>を利用して調査した。

### 5) 急性毒性

コメットアッセイのバリデーション研究における使用動物種はラットである。コメットアッセイの実施において、提供する被験物質質量ならびにその投与量の設定は重要である。それらの一助とするために、経口投与によるラット急性毒性 (LD<sub>50</sub>) 値を、原則として RTECS データベース<sup>13)</sup>を、また、必要に応じ ChemIDPlus<sup>14)</sup>等を利用して調査した。

### 6) 入手可能性

科学的に妥当で被験物質として必要と考えられても、必要量の市販品の有無、取り扱いや輸送の規制、高価格による経費的制限などの観点から、国際的バリデーション研究としての使用には適当ではなく、結果として被験物質として採用できないものがある。そこで、一般的試薬メーカーにおける市販品や在庫の有無、包装量、ならびに価格を調査した。

## C. 研究結果

候補被験物質の選択は第1次、第2次および最終と3段階で行った。

### 1) 第1次選択物質

候補被験物質の発がん性、遺伝毒性、急性毒性、化学物質特性および入手可能性を調査した。本バリデーション研究のコメントアッセイの発がん予測性に関する検討では、最大43物質の使用が計画されているため、まず第1次選択として、約2倍の88物質を選択した。その結果を発がん性、遺伝毒性および急性毒性情報、化学物質特性や価格とともに、Table 1に示す。

遺伝毒性発がん物質として40物質を選択し、そのうちAmes試験陽性が31物質、陰性(equivocalを含む)が9物質(いずれもin vivo小核試験陽性)、UDS試験では陽性が14物質、陰性が12物質、データなしが14物質であった。なお、Thioacetamideを、肝毒性を有する遺伝毒性発がん物質(Ames試験およびin vitro染色体異常試験で陰性だが、in vivo小核試験で陽性)として選択した。遺伝毒性非発がん物質として13物質を選択し、そのうちAmes試験陽性が11物質、陰性が2物質(いずれもin vivo小核試験陽性)、UDS試験では陽性が2物質、陰性が2物質、データなしが9物質であった。非遺伝毒性発がん物質として19物質(すべてAmes試験陰性)を選択し、UDS試験について陽性が0物質、陰性が8物質、データなしが11物質であった。本バリデーション研究では、コメントアッセイの評価対象臓器を肝および胃としている。肝臓における評価を検証するために、3種の非遺伝毒性発がん性肝毒性物質(Chloroform, Ethanol, Methyl carbamate)を含めた。非遺伝毒性非発がん物質として15物質(すべてAmes試験陰性)を選択し、そのうちUDS試験陽性が0物質、陰性が2物質、データなしが13物質であった。前項の肝毒性物質の場合と同様、胃における評価を検証するために1種の非遺伝毒性非発がん性胃毒性物質(Sodium chloride)を含めた。また、コメントアッセイの陽性対照物質(遺伝毒性発がん物質)として、phase 1から始まったこれまでの研究同様、Ethyl methanesulfonateを選択した。

### 2) 第2次選択物質

これらの暫定候補被験物質の中から、第2次選択として、化学物質類似性や入手可能性等による選別を行った。すなわち、phase 4試験では、1物質で1実施機関あたり、1群5匹のラットを用い、用量設定試験で1回ならびに本試験で3回の計4回の経口投与が予定されている。被験物質必要量は、急性毒性値に基づく試験最高用量により異なってくるが、最高用量を100 mg/kgとした場合の

最低必要量は次のようになる: 100 mg/kg は、ラット体重 200 g として 20 mg/匹に相当する。1実施機関あたりの実消費量は、20 mg/匹 x 5 匹 x 2 (2倍希釈系列作成) x 4 (投与回数) = 800 mg となる。これに加え、実際は、溶媒検討あるいはより高用量からの用量設定試験の開始が考えられ、1 g は最低必要と考えられる。試験最高用量の 2000 mg/kg の場合、実消費量は 16 g、最低必要量は 20 g となる。したがって、経費的観点から価格が ¥ 10000/g を超えるものは、原則として除くこととした。また、本邦の大手試薬メーカーによる取扱がないもの、在庫切れ(同一ロットによる必要量が確保できないもの)や重複した類似の化学物質クラスならびに適切な既存情報のあるものなどを除いた。また、必要に応じ代替品を検討した。

その結果、第2次選択では遺伝毒性発がん物質 24、遺伝毒性非発がん物質 6、非遺伝毒性発がん物質 7、非遺伝毒性非発がん物質 9 および陽性対照物質 1 の計 47 物質を選択した。2次選択されなかった 44 物質については、その理由を Table 1 に示したが、以下に集約される:

- ✓ 高価 (16 物質、取扱が不便な 2 物質を含む)
- ✓ 類似性 (16 物質)
- ✓ 発がん性あるいは遺伝毒性データの不備 (7 物質)
- ✓ 取扱あるいは在庫なし (5 物質)

第2次選択 47 物質について、Table 1 記載内容に EU の GHS 分類情報(発がん性および生殖細胞変異原性)を加え、Table 2 にまとめた。なお、DNA 架橋剤の Mitomycin C および核酸アナログの Azidothymidine は、ともに遺伝毒性発がん性物質であり、その特徴的特性から候補物質としたが、購入経費が異常にかかることが判明した(施設間再現性をも考慮した 4 施設による検討では、Mitomycin C で計 228 万円、Azidothymidine で計 32 万円)。そのため、Mitomycin C の代替として Daunomycin あるいは Busulfan を、Azidothymidine の代替として Ganciclovir を検討することとし、それらの情報を Table 2 に加えた。

第2次選択物質は以下のとおりである (Table 2 参照):

#### ➤ 遺伝毒性発がん物質 (24 物質)

- ✓ 2-Acetylaminofluorene
- ✓ Acrylamide
- ✓ Acrylonitrile
- ✓ o-Anisidine
- ✓ Azidothymidine (AZT)
- ✓ (Ganciclovir : AZT の代替候補)
- ✓ Benzene
- ✓ Cadmium chloride
- ✓ p-Chloroaniline

- ✓ Cisplatin
- ✓ 2,4-Diaminotoluene
- ✓ 1,2-Dibromoethane
- ✓ 1,3-Dichloropropene
- ✓ 1,2-Dimethylhydrazine HCl
- ✓ Hydroquinone
- ✓ Methyl methanesulfonate
- ✓ *N*-Methyl-*N*-nitrosourea
- ✓ Mitomycin C (MMC)
- ✓ (Daunomycin HCl : MMC の代替候補)
- ✓ (Busulfan : MMC の代替候補)
- ✓ *N*-Nitrosodimethylamine
- ✓ 4,4'-Oxydianiline
- ✓ Sodium arsenite
- ✓ Thioacetamide

➤ 遺伝毒性非発がん物質 (6 物質)

- ✓ 9-Aminoacridine
- ✓ *p*-Anisidine
- ✓ 2,6-Diaminotoluene
- ✓ 5-Fluorouracil
- ✓ 8-Hydroxyquinoline
- ✓ *p*-Phenylenediamine 2HCl

➤ 非遺伝毒性発がん物質 (7 物質)

- ✓ Chloroform
- ✓ Diethanolamine
- ✓ Di(2-ethylhexyl)phthalate
- ✓ Ethanol
- ✓ Methyl carbamate
- ✓ Phenylphenol Na
- ✓ Saccharin

➤ 非遺伝毒性非発がん物質 (9 物質)

- ✓ Ampicillin trihydrate
- ✓ Anthranilic acid
- ✓ *t*-Butylhydroquinone
- ✓ Ethionamide
- ✓ Isobutyraldehyde
- ✓ D-Mannitol
- ✓ D,L-Menthol
- ✓ Sodium chloride
- ✓ Trisodium EDTA

➤ 陽性対照物質 (1 物質、遺伝毒性発がん物質)

- ✓ Ethyl methanesulfonate

3) 最終選択物質

本バリデーション研究では、最終的にコメントアッセイの発がん予測性を検証することとしている。そのための広範な検討が phase 4 - step 2 において実施されることとなり、最終選択物質として第 2 次選択 47 物質から 41 を選択した (陽性対照の 1 物質を含む)。選択から除かれたものは、以下の 6 物質である：

- 遺伝毒性発がん物質
  - ✓ Acrylamide (phase 2 で使用)
  - ✓ *N*-Methyl-*N*-nitrosourea (phase 3 および phase 4 - step 1 で使用)
  - ✓ Mitomycin C (代替として Busulfan を使用)
  - ✓ Daunomycin HCl (MMC の代替)
  - ✓ Ganciclovir (AZT の代替)
- 非遺伝毒性非発がん物質
  - ✓ D-Mannitol (phase 3 および phase 4 - step 1 で使用)

なお、既使用物質の中では、phase 2 で使用した遺伝毒性発がん物質の 2,4-Diaminotoluene および遺伝毒性非発がん物質の 2,6-Diaminotoluene は、phase 4 - step 2 においても使用することとなった。

最終選択の 41 物質は以下のとおりである。Table 3 には、それらの構造式と in vivo 遺伝毒性試験の方法と結果詳細をまとめた (陽性対照物質を除く)。

➤ 遺伝毒性発がん物質 (19 物質)

- ✓ 2-Acetylaminofluorene
- ✓ Acrylonitrile
- ✓ *o*-Anisidine
- ✓ Azidothymidine (AZT)
- ✓ Benzene
- ✓ Cadmium chloride
- ✓ *p*-Chloroaniline
- ✓ Cisplatin
- ✓ 2,4-Diaminotoluene
- ✓ 1,2-Dibromoethane
- ✓ 1,3-Dichloropropene
- ✓ 1,2-Dimethylhydrazine HCl
- ✓ Hydroquinone
- ✓ Methyl methanesulfonate
- ✓ *N*-Methyl-*N*-nitrosourea
- ✓ Busulfan
- ✓ *N*-Nitrosodimethylamine
- ✓ 4,4'-Oxydianiline
- ✓ Sodium arsenite
- ✓ Thioacetamide

➤ 遺伝毒性非発がん物質 (6 物質)

- ✓ 9-Aminoacridine
- ✓ *p*-Anisidine
- ✓ 2,6-Diaminotoluene
- ✓ 5-Fluorouracil
- ✓ 8-Hydroxyquinoline
- ✓ *p*-Phenylenediamine 2HCl

➤ 非遺伝毒性発がん物質 (7 物質)

- ✓ Chloroform
- ✓ Di(2-ethylhexyl)phthalate
- ✓ Ethanol
- ✓ Methyl carbamate
- ✓ Phenylphenol Na

- ✓ Saccharin
- ✓ Diethanolamine

➤ 非遺伝毒性非発がん物質 (8 物質)

- ✓ Ampicillin trihydrate
- ✓ Anthranilic acid
- ✓ *t*-Butylhydroquinone
- ✓ Ethionamide
- ✓ Isobutyraldehyde
- ✓ D,L-Menthol
- ✓ Sodium chloride
- ✓ Trisodium EDTA monohydrate

➤ 陽性対照物質 (1 物質、遺伝毒性発がん物質)

- ✓ Ethyl methanesulfonate

遺伝毒性非発がん物質として選択した 5-Fluorouracil は、IARC では発がんの陽性知見は認められないとしている一方、CPDB ではマウスにおいて発がん性陽性としている。しかしながら、一般的には、オランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) による発がん性・変異原性・生殖毒性物質 (CMR) 分類にあるように、発がん性は陰性と考えられている<sup>15)</sup>。非遺伝毒性非発がん物質として選択した Ethionamide は、CPDB ではマウスにおいて発がん性陽性としている。しかしながら、Kirkland らは、非発がん物質として分類しているとともに<sup>4)</sup>、米国立がん研究所 (NCI) の報告書では陰性と報告されていることから<sup>16)</sup>、非発がん物質とした。

#### D. 考察

バリデーション研究における被験物質の選択は、当該研究の成否に大きな影響を与える。バリデーション研究の目的に沿う特性を有する化学物質を適切な数で選択しなければならない。これらは、まず、科学的観点から選択するが、続いて研究で用いる試験系や試験プロトコルにあわせ、必要量や包装形態も考慮する必要がある。バリデーション研究では、被験物質はブラインドで扱われるため、何 10 本もの小バイアルともなれば、それらのブラインド化は、被験物質配布にあたり、ラベル剥離、容器詰替えともに容易ではない。また、必要量が多くなるほど同一ロットを揃えることも困難となる。また、昨今では発がん性物質などのいわゆる危険物は、特に、海外に送付する場合には、輸出入規制対象に該当していないことも確認しなければならない。さらに、価格も重要な選択要因であり、限られた予算の中で最大限の効果を上げるよう検討しなければならない。

今回のコメットアッセイバリデーション研究における被験物質の選択においては、化学物質の発

がん性、既存 *in vivo* コメットアッセイや *in vivo* 小核試験を含む標準的遺伝毒性試験結果、特性 (化学物質クラスおよび Mode of Action) および入手可能性を考慮し、第 1 次選択 88 物質から最終選択の 40 物質 (陽性対照 1 物質を除く) を抽出した。これらは、多様な化学物質クラスならびに MOA から構成されており、本バリデーション研究において、コメットアッセイの特性評価の検証 (発がん感受性、特異性および UDS 試験代替性等) に妥当なものであると考えられる。

また、本検討をもとにバリデーション研究における被験物質選択のための原則をまとめた (Table 4)。すなわち、まず、施設内・施設間再現性の他に当該バリデーション研究の主目的を達成するために必要と考えられる最小限の被験物質数を導出する。この数は、試験の目的、種類、内容により異なってくる。次に、対象試験の毒性分野や種類に応じ、試験系の類似性 (*in vitro/in vivo* 試験、使用動物種、毒性項目など) を考慮して、当該毒性分野や関連分野で検討され、その知見を有する物質を選出する。以降の種々の制約 (絞込み) に対応できるよう十分な数の候補物質を収集する。候補物質の中から、科学的絞込みを行う。これには、化学物質クラス、化学物質構造、作用機序・作用様式、物性や既存情報の充実性が含まれる。この科学的絞込みと並行して、実際に候補物質を用いてバリデーション研究の実施が可能か否かを検証する実務的絞込みを行う。これには、毒性値、入手可能性、取扱い容易性、価格などが含まれる。これらの絞込み操作により、バリデーション研究に用いる最終被験物質を候補物質から選択する。

この選択法は、試験の毒性分野や種類、*in vitro/in vivo* 試験を問わず、基本となる物質選定の一般原則として活用できるものと思われる。

#### 参考文献

- 1) OECD, Series on testing and assessment Number 34, Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment, ENJ/JM/MONO, 14 2005. <[http://appli1.oecd.org/olis/2005doc.nsf/linkto/env-jm-mono\(2005\)14](http://appli1.oecd.org/olis/2005doc.nsf/linkto/env-jm-mono(2005)14)> OR <[http://www.olis.oecd.org/olis/2005doc.nsf/LinkTo/NT00002EAE/\\$FILE/JT00188291.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/2005doc.nsf/LinkTo/NT00002EAE/$FILE/JT00188291.PDF)>
- 2) International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. <<http://monographs.iarc.fr/>>
- 3) Gold, L.S. The carcinogenic potency database (CPDB) <<http://potency.berkeley.edu/>>
- 4) Kirkland, D., Kasper, P., Muller, L., Corvi, R., Speit, G., Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: A

follow-up to an ECVAM workshop, *Mutat. Res.*, 653, 99-108, 2008.

5) European Union, REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, Official Journal of the European Union, L 353/1, 31.12.2008. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:353:0001:1355:en:PDF>>

6) Morita, T., N. Asano, T. Awogi, Y.F. Sasaki, S. Sato, H. Shimada, S. Sutou, T. Suzuki, A. Wakata, T. Sofuni and M. Hayashi: Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A, and 2B), The summary report of the 6th collaboration study by CSGMT/JEMS · MMS, *Mutation Res.*, 389, 3-122, 1997 [Erratum, *Mutation res.*, 391, 259-267, 1997].

7) S. Madle, S.W. Dean, U. Andae, G. Brambilla, B. Burlinson, D.J. Doolittle, C. Furihata, T. Hertner, C.A. McQueen, H. Mori, Recommendations for the performance of UDS tests in vitro and in vivo, *Mutat Res.*, 312, 263-285, 1994.

8) COM (Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment), A comparison of the sensitivities of the in vivo rat liver UDS assay with the in vivo COMET assay, 2006. <[http://www.iacom.org.uk/papers/documents/mut063\\_000.pdf](http://www.iacom.org.uk/papers/documents/mut063_000.pdf)>

9) Sasaki, Yu F., K. Sekihashi, F. Izumiyama, E. Nishidate, A. Saga, K. Ishida, S. Tsuda, The comet assay with multiple mouse organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP carcinogenicity database, *Crit. Rev. Toxicol.*, 30, 629-799, 2000.

10) K. Sekihashi, A. Yamamoto, Y. Matsumura, S. Ueno, M. Watanabe-Akanuma, F. Kassie, S. Knasmuller, S. Tsuda, Y.F. Sasaki, Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay, *Mutat Res.*, 517, 53-74, 2002.

11) Kirkland, D., G. Speit, Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens, III. Appropriate follow-up testing in vivo, *Mutat Res.*, 654, 114-132, 2008.

12) HSDB: Hazardous Substance Data Bank, Micromedex. <<http://csi.micromedex.com/fraMain.asp?Mnu=&Rest ore=Y>> OR TOXNET, NLM <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CHEM>>

13) RTECS: Registry of Toxic Effects of Chemical Substances, Micromedex. <<http://csi.micromedex.com/fraMain.asp?Mnu=&Rest>

[ore=Y](#)>

14) ChemIDPlus: TOXNET, NLM <<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CHEM>>

15) Muller and Bos, The occurrence of Carcinogenic, Mutagenic and Reprotoxic (CMR) substances in consumer preparations, RIVM report 32001001/2004. <<http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/8883/1/320010001.pdf>>

16) NCI-CG-TR-46, National Cancer Institute, Carcinogenesis, Technical Report Series, No. 46, 1978. <[http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT\\_rpts/tr046.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr046.pdf)>

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa, Effect of reducing the top concentration used in the in vitro chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research*, 741, 32-56, 2012.
- 2) Takeshi Morita, James T. MacGregor and Makoto Hayashi, Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow, *Mutagenesis*, 26, 223-230, 2011.
- 3) Sheila Galloway, Elisabeth Lorge, Marilyn J. Aardema, David Eastmond, Mick Fellows, Bob Heflich, David Kirkland, Dan D. Levy, Anthony Lynch, Daniel Marzin, Takeshi Morita, Maik Schuler, Günter Speit, Workshop summary: Top concentration for in vitro mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for in vitro cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research*, 723, 77-83, 2011.
- 4) Takeshi Morita and Kaoru Morikawa, Expert Review for GHS Classification of Chemicals on Health Effects, *Industrial Health*, 49, 559-565, 2011.

### 2. 学会発表

- 1) Takeshi Morita, Masamitsu Honma, Kaoru Morikawa, Analysis of *in vitro* chromosomal aberration test data with CHL cells for reducing top test concentration for industrial chemicals, 42<sup>nd</sup> EMS 2011 Annual Meeting, Montreal, Canada, October 2011.
- 2) Shuichi Hamada, Rie Takashima, Keisuke Shimada, Kazuyo Zaizen, Satoru Kawakami, Jin Tanaka, Hirotaka Matsumoto, Tomohiro Nakai, Hiroshi Suzuki, Shoji Matsumura, Hisakazu Sanada, Kenji Inoue, Shigeharu Muto, Soichiro Hagio, Aya Hayashi, Tomomi Takayanagi,



Yousuke Ogiwara, Akihisa Maeda, Kazunori Narumi, Hironao Takasawa, Izumi Ogawa, Wakako Ohyama, Madoka Nakajima, Takeshi Morita, Hajime Kojima, Makoto Hayashi, and Masa Honma, Evaluation of Repeated Dose Liver Micronucleus Assay in Rats- Summary of The Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS, 42<sup>nd</sup> EMS 2011 Annual Meeting, Montreal, Canada, October 2011.

- 3) 濱田修一、高島理恵、嶋田圭祐、財前和代、川上哲、田中仁、松本浩孝、中井智博、鈴木洋、松村奨士、真田尚和、井上健司、武藤重治、萩尾宗一郎、林亜耶、高柳智美、萩原庸介、前田晃央、成見香瑞範、高沢博修、小川いづみ、大山ワカ子、中嶋圓、森田健、小島肇、林真、本間正充：反復投与肝臓小核試験法の有用性の検討（MMS 共同研究）、第40回日本環境変異原学会、東京、2011.11
- 4) 森田 健、生殖細胞変異原性に関する国際的規制動向、第40回日本環境変異原学会、シンポジウム、東京、2011.11

### 3. 公刊図書

- 1) 城内 博、宮川宗之、森田 健：英和对訳 最新 OECD 毒性試験ガイドライン、追録版、化学工業日報社、東京、2011

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1 Primary Candidate Chemicals for International Validation Study of Comet Assay for Phase 4 Studies

20120308

230

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	Comet <sup>\$</sup> (route/ species)	Other Genotoxicity Data <sup>\$\$</sup>			LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Price	Note	
						Ames CA	in vitro MN**	Liver UDS					
<b>● Genotoxic* carcinogens (40)</b>													
1	2-Acetylaminofluorene (2-AAF)	53-96-3	NL	+	+(ip, po/M)	+	+	+	+	mouse po 810	Aromatic amine, metabolic activation	JPY3800/1g (W)	
2	Acrylamide	79-06-1	2A	+	+(ip/M)	-	+	+	-	124	Amide	JPY1200/25g (W)	
3	Acrylonitrile	107-13-1	2B	+	+(ip/M)	+	+	+	-	78	Aliphatic cmpd, +ve in rat MN by iv treatment	JPY2100/500mL (W)	
4	Aflatoxin B1	1162-65-8	1	+	+(ip/M&R)	+	+	+	+	2.7	Polycyclic hydrocarbon, metabolic activation	JPY45000/5mL (W)	Non-selection due to expensive
5	<i>o</i> -Anisidine ( <i>o</i> -Anisidine HCl)	90-04-0 (134-29-2)	2B	+	+(po/M&R)	+	+	-	-	1150	Aromatic amine, +ve in Ames with norharman, +ve in mouse TG (bladder, but -ve in liver)	JPY1350/25mL (W)	
6	Azidothymidine	30516-87-1	2B	+		-	+	+		3084	Heterocyclic cmpd, nucleoside analogue	JPY2500/100mg (W) (Expensive)	
7	Benomyl	17804-35-2	NL	NL		-	+	+		>10 g	Heterocyclic amine, aneugen,	JPY17400/250mg (S)	Non-selection due to no evaluation of carcinogenicity by IARC or CPDB
8	Benzene	71-43-2	1	+	+(po/M&R; ip/M)	-	+	+		930- 1800	Aromatic cmpd	JPY780/500mL(W)	
9	Benzidine	92-87-5	1	+	+(po/M&R)	+	+	+	+	309	Aromatic amine	JPY9200/5mg/mL (1 mL ample) (S)	Non-selection due to expensive and unhandly
10	Benzo[a]pyrene	50-32-8	2A	+	+(ip, po/M)	+	+	+	-	rat sc 50	Polycyclic hydrocarbon, metabolic activation	JPY10000/100mg (W)	Non-selection due to expensive
11	Cadmium chloride	10108-64-2	1	+	-(ip/M)	-	+	+		88	Inorganic metal cmpd	JPY2500/25g (W)	

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	Comet <sup>s</sup> (route/ species)	Other Genotoxicity Data <sup>ss</sup>				LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Price	Note
						Ames	in vitro CA	in vivo MN**	Liver UDS				
12	Chlorodibromomethane	124-48-1	3	+	+	+	+	-	-	370	Aliphatic halide	JPY13500/10g (S)	Non-selection due to slimilarity to 1,2- dibromomethane and 1,3- dichloropropene
13	<i>p</i> -Chloroaniline	106-47-8	2B	-	+	+	+	+		300	Aromatic amine, no adducts	JPY2400/25g (W)	
14	Cisplatin	15663-27-1	2A	NL	+	+	+	+		25.8	Metal cmpd, cross-linking	JPY123400/5g (S) (Expensive)	
15	Cyclophosphamide	50-18-0	1	+	+	+	+	-		100	Aziridine, metabolic activation, DNA alkylation	JPY27400/5g	Non-selection due to no stock in the supplier
16	2,4-Diaminotoluene (2,4-DAT)	95-80-7	2B	+	+	+	+	+,-	+	590	Aromatic amime, metabolic activation, weak +ve in rat MN, but -ve in mouse MN	JPY2000/25g (W)	
17	1,2-Dibromoethane (Ethylene dibromide)	106-93-4	2A	+	+	+	-	+		108	Aliphatic halide	JPY1600/25mL (W)	
18	3,3'-Dichlorobenzidine	91-94-1	2B	+	+	+	+	+		No data (>1000 mg/kg)	Aromatic amine	JPY12600/25g (W)	Non-selection due to similarity to 2-AAF, o- anisidine, and others
19	1,3-Dichloropropene	542-75-6	2B	+	+	-	-	-		470	Aliphatic halide	JPY11600/25g (S)	
20	Dichlorvos	62-73-7	2B	+	+	+	-	-		17	Aliphatic halide	JPY4000/200mg (W)	Non-selection due to expensive
21	3,3'-Dimethoxybenzidine (3,3'-Dimethoxybenzidine 2HCl)	119-90-4 (20325-40-0)	2B	+	+	-	+	-		1920	Aromatic amine	JPY5000/25g (W)	Non-selection due to similarity to 2-AAF, o- anisidine, and others
22	1,2-Dimethylhydrazine HCl	306-37-6	2B	+	+	+	+	+		100	Hydrazine	JPY8800/25g (T)	
23	7,12-Dimethylbenz[a]anthracene	57-97-6	NL	+	+	+	+	-		327	Polycyclic hydrocarbons, metabolic activation	JPY35000/1g (W)	Non-selection due to expensive

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	Comet <sup>s</sup> (route/ species)	Other Genotoxicity Data <sup>\$\$</sup>				LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Price	Note
						Ames CA	in vitro MN**	in vivo UDS	Liver				
24	2,4-Dinitrotoluene	121-14-2	2B	+		+	-	-	+	268	Cyclic nitro cmpd	JPY1600/25g (W)	Non-selection due to similarity to 2,4- and 2,6-DAT
25	2,6-Dinitrotoluene	606-20-2	2B	+		+	+	-	+	mouse 621, 714	Cyclic nitro cmpd	JPY5500/25g (W)	Non-selection due to similarity to 2,4- and 2,6-DAT
26	Etoposide	33419-42-0	2A	NL		E	+	+		1784	Heterocyclic cmpd, topoisomerase inhibitor, -ve in TG	JPY10200/25mg (W)	Non-selection due to expensive
27	Hydroquinone	123-31-9	3	+		-	+	+		302	Aromatic cmpd, aneugen	JPY1300/25g (W)	
28	IQ	76180-96-6	2A	+	+	+	+	-		No data	Aromatic amine, metabolic activation	JPY31000/100mg (W)	Non-selection due to expensive
29	4,4'-Methylenedianiline (4,4'-Methylenedianiline 2HCl)	101-77-9 (13552-44-8)	2B	+	+	+	+	+	-	No data	Aromatic amine, highest dose of 350 mg/kg in UDS test (rat, po)	JPY2300/25g (T)	Non-selection due to similarity to 2-AAF, o-anisidine, and others
30	Methyl methanesulfonate (MMS)	66-27-3	2B	+	+	+	+	+	+	225	Sulfonate, DNA alkylation	JPY8500/25g (W)	
31	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine (MNNG)	70-25-7	2A	+	+	+	+	+	+, -	90	<i>N</i> -nitroso cmpd, DNA alkylation	JPY8000/5g (S)	Non-selection due to similarity to MMS and MNU
32	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea (MNU)	684-93-5	2A	+		+	+	+		110	<i>N</i> -nitroso cmpd, DNA alkylation	JPY35800/25g (S)	
33	Mitomycin C (MMC)	50-07-7	2B	+	+	+	+	+		30	Aziridine, DNA alkylation, DNA cross linker	JPY6800/10mg (W)	
34	2-Nitropropane (2-NP)	79-46-9	2B	-	+	+	-	-	+	720	Aliphatic cmpd	JPY1900/25g (T)	Non-selection due to similarity to acrylonitrile
35	<i>N</i> -Nitrosodiethylamine (DEN)	55-18-5	2A	+	+	+	+	-	+	220	<i>N</i> -nitroso cmpd, metabolic activation, DNA alkylation	JPY11300/1g, JPY21400/10mL (S)	Non-selection due to similarity to DMN
36	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine (DMN)	62-75-9	2A	+	+	+	+	+	+	26	<i>N</i> -nitroso cmpd, metabolic activation, DNA alkylation	JPY3400/1g (W)	

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	Comet <sup>s</sup> (route/ species)	Other Genotoxicity Data <sup>ss</sup>				LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Price	Note
						Ames	in vitro CA	in vivo MN**	Liver UDS				
37	4,4'-Oxydianiline	101-80-4	2B	+	+	+	+	-	725	Aromatic amine	JPY2600/25g (W)		
					(po/M)								
38	Sodium arsenite	7784-46-5	1	-		-	+	+	41	Inorganic metal cmpd	JPY1900/25g (W)		
39	Styrene-7,8-oxide	96-09-3	2A	+	+	+	+	-	2000	Epoxide, DNA alkylation	JPY1800/25mL (W)	Non-selection due to similarity to other DNA alkylators	
					(ip/M)								
40	Thioacetamide	62-55-5	2B	+	+	-	-	+	301	Amide, liver toxicity	JPY2500/25g (W)		
					(ip/M)								
<b>● Genotoxic non-carcinogens (13)</b>													
41	4-Acetylaminofluorene	28322-02-3	NL	-		+	-	-	mouse ip 364	Aromatic amine, analogue of 2-AAF		Non-selection due to no suitable supplier	
42	9-Aminoacridine (9-Aminoacridine Hydrochloride monohydrate)	90-45-9 (52417-22-8)	NL	NL		+	+		mouse ip 68	Aromatic amine, DNA intercalation	JPY15000/250g (W)		
43	<i>p</i> -Anisidine ( <i>p</i> -Anisidine HCl)	104-94-9 (20265-97-8)	3	-		+	+		1320	Aromatic amine, analogue of <i>o</i> -anisidine	JPY4600/100g (W)		
44	Methyl chloride (Chloromethane)	74-87-3	3	NL		+		+	1800	Aliphatic halide, weak +ve in UDS by inhalation, water soluble gas	JPY3500/0.2 mg/mL (1 mL ampule) (S)	Non-selection due to expensive and unhandly	
45	2,6-Diaminotoluene (2,6-DAT) (2,6-Diaminotoluene HCl)	823-40-5 (15481-70-6)	NL	-	-	+	+	+	>ca. 300	Aromatic amine, metabolic activation, analogue of 2,4- DAT	JPY6500/25g (W)		
46	5-Fluorouracil (5-FU)	51-21-8	3	+	-	-	+	+	230	Heterocyclic cmpd, nucleoside analogue, thymidylate synthase inhibitor, +ve only in mice in CPDB	JPY2100/1g (W)		
					(ip/M)								
47	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	3	-	-	+	+	-	1200	Polycyclic hydrocarbon	JPY2450/25g (W)		
					(po/M)								
48	4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	99-56-9	3	-	-	+	+	-	681	Aromatic amine	JPY3000/25g (W)	Non-selection due to similarity to 2,6-DAT	
					(po/M)								

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	Comet <sup>s</sup> (route/ species)	Other Genotoxicity Data <sup>\$\$</sup>			LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Price	Note
						Ames CA	in vitro MN**	in vivo UDS				
49	3-Nitropropionic acid	504-88-1	NL	-		+	+		ip 67, mouse po 68	JPY56600/10g (S)	Non-selection due to no in vivo genotoxicity data	
50	6-Mercaptopurine	50-44-2	3	-		+	+	+	277	Polycyclic hydrocarbon, nucleoside analogue	JPY26600/100g (W)	Non-selection due to similarity to 5-FU
51	Phenol	108-95-2	3	-	+	-	+	+	317, 512	Aromatic cmpd, +ve in MN might be due to decreasing body temperature	JPY9400/25g (W)	Non-selection due to questionable in vivo genotoxicity
52	<i>p</i> -Phenylenediamine 2HCl <i>p</i> -Phenylenediamine	624-18-0 (106-50-3)	3	-		+	+	-	147	Aromatic amine	JPY5500/25g (W)	
53	Thiabendazole	148-79-8	NL	-	+	+	+	+	2080	Polycyclic hydrocarbon	JPY8200/200mg (W)	Non-selection due to expensive
<b>● Non-genotoxic carcinogens (19)</b>												
54	Amitrole	61-82-5	3	+		-	-	-	1100	Aromatic amine, hormonal effects and prolactin secretion	JPY9000/200mg (W)	Non-selection due to expensive
55	Benzyl acetate	140-11-4	3	+	+	-	-	-	2490	Aromatic cmpd	JPY900/25g (W)	Non-selection due to similarity to di(2-ethylhexyl)phthalate and <i>o</i> -phenylphenol Na
56	Chloramphenicol	56-75-7	2A	-	-	-	+	+,-	2500	Cyclic nitro cmpd	JPY6000/200mg (W)	Non-selection due to expensive
57	Chloroform	67-66-3	2B	+	-	-	-	-	695	Aliphatic halide, liver toxicity	JPY1700/100mL (W)	
58	Diethanolamine	111-42-2	2B	NL		-	-	-	ca. 620	Aliphatic cmpd, tumors of mouse liver and renal tubules due to choline deficiency (Kirkland et al., 2008)	JPY1350/25mL (W)	
59	Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	2B	+	-	-	-	-	30	Aromatic cmpd, peroxisome proliferation	JPY2600/1g (W)	

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	Comet <sup>\$</sup>	Other Genotoxicity Data <sup>\$\$</sup>			LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup>	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Price	Note
					(route/species)	Ames	in vitro CA	in vivo MN**	Liver UDS			
60	Diethylstilbestrol	56-53-1	1	+	- (ip/M)	-	+	-	>3000	Aromatic cmpd	JPY8000/200mg (W)	Non-selection due to expensive
61	Ethanol	64-17-5	1	+		-	-	-	7000	Aliphatic cmpd	JPY1260/500mL(W)	
62	Griseofluvin	126-07-8	2B	+		-	+	-	>10g	Aromatic halide	JPY2700/5g (W)	Non-selection due to no stocks in the supplier
63	Lead acetate	301-04-2	2B	+	- (ip/M)	-	+	-	ip 150	Inorganic metal cmpd, +ve in rat peripheral blood MN for 10 weeks treatment	JPY5700/25g (W)	Non-selection due to questionable genotoxicity
64	Melamine	108-78-1	3	+		-	-	-	3161	Aromatic amine, bladder and ureteral carcinomas due to calculus formation	JPY6000/100mg (W)	Non-selection due to expensive
65	Methapyrilene HCl	135-23-9	NL	+		E	+	-	200	Aromatic amine		Non-selection due to no suitable supplier
66	Methyl carbamate	598-55-0	3	+		-	-	-	2500	Amide, inflammation and hyperplasia resulting from bioaccumulatoin, toxic to liver	JPY3700/25g (W)	
67	o-Phenylphenol Na	132-27-4	2B	+	+ (po/M&R)	-	+	-	591	Aromatic cmpd, -ve in vivo bone marrow CA test	JPY4400/100g (W)	
68	Polybrominated biphenyl	67774-32-7	2B	+		-	-	-	>1000	Aromatic cmpd	JPY28500/1mL (W)	Non-selection due to expensive
69	Progesterone	57-83-0	1	NL		-	-		>100, ip 327	Steroid, hormonal effects	JPY12500/5g (W)	Non-selection due to no stocks in the supplier
70	Saccharin Na	128-44-9	3	+	+ (?/M)	-	-	-	mouse po 17g	Heterocyclic cmpd, -ve in TG test and adduct, carcinogenicity to male rats only (bladder)	JPY1750/25g (W)	
71	Terephthalic acid	100-21-0	NL	NL		-	+	-	>6400	Aromatic cmpd, rat bladder tumors will be secondary effect due to calculi	JPY1300/25g (W)	Non-selection due to no evaluation of carcinogenicity by IARC or CPDB

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	Comet <sup>\$</sup>	Other Genotoxicity Data <sup>\$\$</sup>			LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup>	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Price	Note	
					(route/species)	Ames	in vitro CA	in vivo MN**	Liver UDS				rat, po (mg/kg)
72	Trichloroethylene	79-01-6	2A	+	- (po/M)	-	-	+, -	-	4920	Aliphatic halide	JPY1060/500mL (W)	Non-selection due to slimilarity to chloroform
<b>● Non-genotoxic non-carcinogens (15)</b>													
73	Allyl alcohol	107-18-6	NL	-	-	-	-	-	-	64	Aliphatic cmpd, liver tox	JPY2800/25mL (W)	Non-selection due to slimilarity to ethanol
74	Ampicillin trihydrate	7177-48-2	3	-	-	-	-	-	-	10g	Heterocyclic cmpd, beta-lactam antibiotics	JPY19100/25g (W)	
75	<i>o</i> -Anthranilic acid	118-92-3	3	-	-	+	-	-	-	5410	Aromatic cmpd	JPY2200/25g (W)	
76	<i>t</i> -Butylhydroquinone	1948-33-0	NL	-	-	+	-	-	-	700	Aromatic cmpd	JPY2000/25g (W)	
77	Camptothecine	7689-03-4	NL	NL	-	-	-	-	-	153	Heterocyclic cmpd, topo I inhibitor	JPY4500/100mg (W)	Non-selection due to expensive
78	Cycloheximide	66-81-9	NL	NL	-	-	-	-	-	2; mouse 133	Heterocyclic cmpd, protein synthesis inhibitor	JPY140400/25g (W)	Non-selection due to no evaluation of carcinogenicity by IARC or CPDB
79	Ethionamide	536-33-4	3	+	-	+	-	-	-	1320	Amide, carcinogenicity -ve in rats; possible thyroid tumours in mice (Kirkland et al., 2008), +ve only in female mice in CPDB, -ve in both species in NCI-CG-TR-46, liver toxicity	JPY12500/5g (W)	
80	Eugenol	97-53-0	3	-	-	+	-	-	-	1930	Aromatic cmpd	JPY8000/200mg (W)	Non-selection due to expensive
81	Isobutyraldehyde	78-84-2	NL	-	-	+	-	-	-	>2000	Aliphatic cmpd	JPY1200/25mL (W)	
82	D-Mannitol	69-65-8	NL	-	-	-	-	-	-	13500	Aliphatic cmpd	JPY1500/25g (W)	
83	D,L-Menthol	15356-70-4	NL	-	- (po/M)	-	+	-	-	2900	Heterocyclic cmpd	JPY10400/10g (W)	
84	1-Nitropropane	108-03-2	NL	-	-	-	-	-	-	455	Aliphatic cmpd, analogue of 2-NP	JPY2500/25mL (W)	Non-selection due to non-selection of 2-NP



No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	Comet <sup>\$</sup>	Other Genotoxicity Data <sup>\$\$</sup>			LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Price	Note
					(route/ species)	Ames	in vitro CA	in vivo MN**				
85	Sodium chloride	7647-14-5	NL	-	-	-	-	-	3000	Inorganic metal compd, stomach toxicity	JPY800/500g (W)	
86	Trisodium EDTA (monohydrate)	150-38-9 (10378-22-0)	NL	-	- (po/M)	-	-	-	2150	Aliphatic compd, chelating agent	JPY2400/50g (W)	
87	Triton X(-100)	9002-93-1	NL	NL	-	-	-	-	1800	Aromatic compd, surfactant	JPY2200/500mL (W)	Non-selection due to no evaluation of carcinogenicity by IARC or CPDB

● **Positive Control (Genotoxic carcinogen)**

88	Ethyl methanesulfonate (EMS)	62-50-0	2B	NL	+	+	+	+	ip 350, mouse po 470	Sulfonate, DNA alkylation	JPY8000/25g (W)	
----	------------------------------	---------	----	----	---	---	---	---	----------------------------	---------------------------	-----------------	--

\*: Genotoxic was defined as Ames +ve and/or standard in vivo assay +ve.

\*\* : Erythrocytes (bone marrow or peripheral blood) MN assay with mouse or rat

\$: Data from Sasaki et al (2000), Sekihashi et al (2002), COM (2006), Kirkland et al (2008), Kirkland and Speit (2008) and other sources

\$\$: Data from IARC monographs, Morita et al (1997), Sasaki et al (2000), Madle et al (1994), Kirkland and Speit (2008) and other sources

\$\$\$ : Data from RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances)

Abbreviations: CPDB, carcinogenic potency data base; CA, chromosomal aberration; MN, micronucleus; UDS, unscheduled DNA synthesis; TG, rodent transgenic mutation model  
M, mice; R, rats; ip, intraperitoneal injection; iv, intravenous injection; po, per os; NL, not listed; E, equivocal; Inc, inconclusive; W, Wako; T, Tokyo Kasei; S, Sigma-Aldrich;  
+, positive; -, negative

References: IARC, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>

CPDB, <http://potency.berkeley.edu/>

COM, MUT/06/03, Draft, 2006.

Kirkland et al, Mutat Res, 653, 99-108, 2008.

Kirkland and Speit, Mutat Res, 654, 114-132, 2008.

Maddalena et al, Mutat Res, 312, 263-285, 1994.

Morita et al, Mutat Res, 389, 1-122, 1997.

NCI-CG-TR-46, National Cancer Institute, Carcinogenesis, Technical Report Series, No. 46, 1978.

[http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT\\_rpts/tr046.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr046.pdf)

Sasaki et al, Cri Rev in Toxicol, 30, 629-799, 2000.

Sekihashi et al, Mutat Res, 517, 53-74, 2002.

RIVM, Muller and Bos, The occurrence of Carcinogenic, Mutagenic and Reprotoxic (CMR) substances in consumer preparations, RIVM report 32001001/2004.

<http://rivm.openrepository.com/rivm/bitstream/10029/8883/1/320010001.pdf>

Table 2 Secondary Candidate Chemicals for International Validation Study of Comet Assay for Phase 4 studies

20120308

238

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	EU GHS <sup>s</sup>	Genotoxicity Data <sup>ss</sup>					LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Note
						In vivo Comet	Ames	in vitro CA	in vivo MN <sup>ss</sup>	Liver UDS			
<b>● Genotoxic carcinogens (24)</b>													
1	2-Acetylaminofluorene (2-AAF)	53-96-3	NL	+	NL	+	+	+	+	+	mouse po 810	Aromatic amine, metabolic activation	Used in phase 4 step 1
2	Acrylamide	79-06-1	2A	+	Carc. 1B Muta. 1B	+	-	+	+	-	124	Amide	Non-selection due use in phase 2
3	Acrylonitrile	107-13-1	2B	+	Carc. 1B	+	+	+	+	-	78	Aliphatic cmpd, +ve in rat MN by iv treatment	
4	<i>o</i> -Anisidine ( <i>o</i> -Anisidine HCl)	90-04-0 (134-29-2)	2B	+	Carc. 1B Muta. 2	+	+	+	+	-	1150	Aromatic amine, +ve in Ames with norharman, +ve in mouse TG (bladder, but negative in liver)	
5	Azidothymidine	30516-87-1	2B	+	NL	-	+	+			3084	Heterocyclic cmpd, nucleoside analogue	
6	Ganciclovir (alternative of azidothymidine)	82410-32-0	NL	NL	NL	-	+	+			mouse po >2000	Heterocyclic cmpd, nucleoside analogue, termination of DNA synthesis	Non-selection due to use of azidothymidine
7	Benzene	71-43-2	1	+	Carc. 1A Muta. 1B	+	-	+	+		930-1800	Aromatic cmpd	
8	Cadmium chloride	10108-64-2	1	+	Carc. 1B Muta. 1B	-	-	+	+		88	Inorganic metal cmpd	
9	<i>p</i> -Chloroaniline	106-47-8	2B	-	Carc. 1B	+	+	+	+		300	Aromatic amine, no adducts	
10	Cisplatin	15663-27-1	2A	NL	NL	+	+	+	+		25.8	Metal compound, cross-linking	
11	2,4-Diaminotoluene (2,4-DAT)	95-80-7	2B	+	Carc. 1B	+	+	+	+, -	+	590	Aromatic amine, metabolic activation, weak +ve in rat MN, but -ve in mouse MN	Used in phase 2
12	1,2-Dibromoethane (Ethylene dibromide)	106-93-4	2A	+	Carc. 1B	+	+	+	-	+	108	Aliphatic halide	

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	EU GHS <sup>§</sup>	Genotoxicity Data <sup>§§</sup>					LD <sub>50</sub> <sup>§§§</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Note
						In vivo Comet	Ames	in vitro CA	in vivo MN <sup>§§</sup>	Liver UDS			
13	1,3-Dichloropropene	542-75-6	2B	+	Not classified	+	+	-	-	-	470	Aliphatic halide	
14	1,2-Dimethylhydrazine HCl	306-37-6	2B	+	Carc. 1B	+	+	+	+	+	100	Hydrazine	
15	Hydroquinone	123-31-9	3	+	Carc. 2 Muta. 2		-	+	+		302	Aromatic cmpd, aneugen	
16	Methyl methanesulfonate (MMS)	66-27-3	2B	+	NL	+	+	+	+	+	225	Sulfonate, DNA alkylation	
17	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitrosourea (MNU)	684-93-5	2A	+	NL		+	+	+		110	<i>N</i> -nitroso cmpd, DNA alkylation	Non-selection due to use in phase 3 and phase 4 step 1
18	Mitomycin C (MMC)	50-07-7	2B	+	NL	+	+	+	+		30	Aziridine, DNA alkylation, DNA cross linker	Non-selection due to use of alternative, busulfan
19	Daunomycin HCl (alternative of MMC)	23541-50-6	NL	NL	NL		+	+			290	Heterocyclic cmpd, DNA intercalation, inhibition of topoisomerase II, generation of oxygen free radicals	Non-selection due to use of alternative, busulfan
20	Busulfan (Myleran) (alternative of MMC)	55-98-1	1	-	NL	+	+	+	+		mouse 110	Sulfonate, bifunctional alkylating agent (DNA cross-linking)	
21	<i>N</i> -Nitrosodimethylamine (DMN)	62-75-9	2A	+	Carc. 1B	+	+	+	+	+	26	<i>N</i> -nitroso cmpd, metabolic activation, DNA alkylation	
22	4,4'-Oxydianiline (4,4'-Diaminodiphenyl ether)	101-80-4	2B	+	Carc. 1B Muta. 1B	+	+	+	+	-	725	Aromatic amine	
23	Sodium arsenite	7784-46-5	1	-	NL		-	+	+		41	Inorganic metal cmpd	
24	Thioacetamide	62-55-5	2B	+	Carc. 1B	+	-	-	+		301	Amide, liver toxicity	

● Genotoxic non-carcinogens (6)

No.	Candidate chemical	CAS	IARC group	CPDB	EU GHS <sup>s</sup>	Genotoxicity Data <sup>\$\$</sup>					LD <sub>50</sub> <sup>\$\$\$</sup> rat, po (mg/kg)	Chemical profiles (class, mode of action, etc)	Note
						In vivo Comet	Ames	in vitro CA	in vivo MN <sup>\$\$</sup>	Liver UDS			
25	9-Aminoacridine (9-Aminoacridine Hydrochloride monohydrate)	90-45-9 (52417-22-8)	NL	NL	NL		+	+			mouse ip 68	Aromatic amine, DNA intercalation	
26	<i>p</i> -Anisidine ( <i>p</i> -Anisidine HCl)	104-94-9 (20265-97-8)	3	-	Not classified		+	+			1320	Aromatic amine, analogue of <i>o</i> -anisidine	
27	2,6-Diaminotoluene (2,6-DAT) 2,6-Diaminotoluene HCl	823-40-5 (15481-70-6)	NL	-	Muta. 2	-	+	+	+	+, -	>ca. 300	Aromatic amine, metabolic activation, analogue of 2,4-DAT	Used in phase 2
28	5-Fluorouracil (5-FU)	51-21-8	3	+	NL	-	-	+	+		230	Heterocyclic compd, nucleoside analogue, thymidylate synthase inhibitor, +ve only in mice in CPDB	
29	8-Hydroxyquinoline	148-24-3	3	-	NL	-	+	+	-	-	1200	Polycyclic hydrocarbon	
30	<i>p</i> -Phenylenediamine 2HCl <i>p</i> -Phenylenediamine	624-18-0 (106-50-3)	3	-	Not classified		+	+	-		147	Aromatic amine	
<b>● Non-genotoxic carcinogens (7)</b>													
31	Chloroform	67-66-3	2B	+	Carc. 2	-	-	-	-	-	695	Aliphatic halide, liver toxicity	
32	Diethanolamine	111-42-2	2B	NL	NL		-	-	-		ca. 620	Aliphatic compd, tumors of mouse liver and renal tubules due to choline deficiency (Kirkland et al., 2008)	
33	Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	2B	+	Not classified	-	-	-	-	-	30	Aromatic compd, peroxisome proliferation	
34	Ethanol	64-17-5	1	+	Not classified		-	-	-		7000	Aliphatic compd	
35	Methyl carbamate	598-55-0	3	+	NL		-	-	-		2500	Amide, inflammation and hyperplasia resulting from bioaccumulatoin, liver toxicity	
36	<i>o</i> -Phenylphenol Na	132-27-4	2B	+	Not classified	+	-	+, -	-		591	Aromatic compd, -ve in vivo bone marrow CA test	