

JEC ID	Chemical Name	CAS No.	MW	CA (Original call)	Equiv. to 10 mM (mg/mL)	LEC (mg/mL)	LEC (mM)	1997-OECD ^a	r-OECD ^b	ICH ^c
								CA	CA	CA
35	Dibutyl adipate	105-99-7	258.4	+	2.58	0.7	2.5	+	+	-
36	2-(Di- <i>n</i> -butylamino)ethanol	102-81-8	173.3	+	1.73	0.3	1.7	+	+	-
37	2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-ethylphenol	4130-42-1	234.4	+	2.34	0.045	0.19	+	+	+
38	2,4-Di- <i>tert</i> -butylphenol	96-76-4	206.3	+	2.06	0.01	0.05	+	+	+
39	<i>o</i> -Dichlorobenzene	95-50-1	147.0	+	1.47	0.2	1.4	+	+	-
40	3,4-Dichloro-1-butene	760-23-6	125.0	+	1.25	0.01	0.08	+	+	+
41	1,2-Dichloro-3-nitrobenzene	3209-22-1	192.0	+	1.92	0.1	0.6	+	+	+
42	1,4-Dichloro-2-nitrobenzene	89-61-2	192.0	+	1.92	0.15	0.8	+	+	+
43	α -4-Dichlorotoluene	104-83-6	161.0	+	1.61	0.0125	0.08	+	+	+
44	1,2-Dicyanobenzene	91-15-6	128.1	+	1.28	0.3	2.3	+	+	-
45	Dicyclohexylamine	101-83-7	181.3	+	1.81	0.6	3.3	+	+	-
46	<i>N,N</i> -Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide	4979-32-2	346.6	+	3.47	0.2	0.6	+	+	+
47	2-(Diethylamino)ethyl methacrylate	105-16-8	185.3	+	1.85	0.6	3.2	+	+	-
48	<i>O,O'</i> -Diethyl dithiophosphate	298-06-6	186.2	+	1.86	0.12	0.6	+	+	+
49	Diethyl fumarate	623-91-6	172.2	+	1.72	0.01	0.06	+	+	+
50	2-(Dimethylamino)ethyl acrylate	2439-35-2	143.2	+	1.43	0.05	0.3	+	+	+
51	2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate	2867-47-2	157.2	+	1.57	0.6	3.8	+	+	-
52	2,3-Dimethylaniline (2,3-Xylidine)	87-59-2	121.2	+	1.21	0.6	5.0	+	+	-
53	2,6-Dimethylaniline (2,6-Xylidine)	87-62-7	121.2	+	1.21	0.3	2.5	+	+	-
54	3,5-Dimethylaniline (3,5-Xylidine)	108-69-0	121.2	+	1.21	0.9	7.4	+	+	-
55	<i>N,N</i> -Dimethylbenzylamine	103-83-3	135.2	+	1.35	0.4	3	+	+	-
56	<i>N</i> -(1,3-Dimethylbutyl)- <i>N'</i> -phenyl- <i>p</i> -phenylenediamine	793-24-8	268.4	+	2.68	0.005	0.02	+	+	+
57	2,4-Dinitrophenol	51-28-5	184.1	+	1.84	1.2	6.5	+	+	-
58	Diphenyl cresyl phosphate	26444-49-5	340.3	+	3.40	0.04	0.1	+	+	+
59	Disperse Red 206	26630-87-5	580.1	+	5.80	2.5	4.3	+	-	-
60	Disperse Yellow 42	5124-25-4	369.4	+	3.69	0.08	0.2	+	+	+
61	2,3-Epoxypropyl methacrylate	106-91-2	142.2	+	1.42	0.02	0.1	+	+	+
62	Ethyltrimethoxysilane	2768-02-7	148.2	+	1.48	0.8	5.4	+	+	-
63	4-Ethoxybenzylamine (<i>p</i> -Phenetidin)	156-43-4	137.2	+	1.37	0.05	0.4	+	+	+
64	<i>N</i> -Ethylaniline	103-69-5	121.2	+	1.21	1.1	9.1	+	+	-
65	2-Ethylanthraquinone	84-51-5	236.3	+	2.36	0.16	0.6	+	+	+
66	2-Ethylbutyric acid	88-09-5	116.2	+	1.16	0.4	3.4	+	+	-
67	3-Ethylphenol	620-17-7	122.2	+	1.22	0.05	0.4	+	+	+
68	4-Ethylphenol	123-07-9	122.2	+	1.22	0.04	0.3	+	+	+
69	Ferrous sulfate heptahydrate	7782-63-0	278.0	+	2.78	0.5	1.8	+	+	-
70	Glycerol triacetate	102-76-1	218.2	+	2.18	2.2	10.0	+	-	-

JEC ID	Chemical Name	CAS No.	MW	CA (Original call)	Equiv. to 10 mM (mg/mL)	LEC (mg/mL)	LEC (mM)	1997-	r-OECD ^b	ICH ^c
								OECD ^a	CA	CA
71	Hydrazine monohydrate	7803-57-8	50.1	+	0.50	0.06	1.2	+	+	-
72	2-Hydroxybenzaldehyde	90-02-8	122.1	+	1.22	0.1	0.8	+	+	+
73	4-Hydroxy-benzenesulfonic acid, tin (2+) tetrahydride	70974-33-3	465.1	+	4.65	0.528	1.1	+	+	-
74	4-Hydroxybenzoic acid	99-96-7	138.1	+	1.38	0.7	5.1	+	+	-
75	2-Hydroxyethyl methacrylate	868-77-9	130.2	+	1.30	0.7	5.4	+	+	-
76	3-Hydroxy-2-naphthalenecarboxylic acid	92-70-6	188.2	+	1.88	0.75	4.0	+	+	-
77	2-Hydroxypropanenitrile	78-97-7	71.1	+	0.71	0.7	10.0	+	+	-
78	2-Mercaptobenzimidazole	583-39-1	150.2	+	1.50	0.8	5.3	+	+	-
79	Methacrylic acid, monoester with propane-1,2-diol	27813-02-1	144.2	+	1.44	0.7	4.9	+	+	-
80	(Methacryloyloxyethyl)trimethylammonium chloride	5039-78-1	207.7	+	2.08	2.1	10.0	+	-	-
81	Methacrylonitrile (Methyl Acrylonitrile)	126-98-7	67.1	+	0.67	0.07	1.0	+	+	+
82	3-Methoxybenzylamine	536-90-3	123.2	+	1.23	0.8	6.5	+	+	-
83	Methoxymethanol	4461-52-3	62.1	+	0.62	0.02	0.3	+	+	+
84	1-Methoxynaphthalene	2216-69-5	158.2	+	1.58	0.02	0.1	+	+	+
85	Methyl acetoacetate	105-45-3	116.1	+	1.16	1.2	10.0	+	+	-
86	N-Methylaniline	100-61-8	107.2	+	1.07	0.6	5.6	+	+	-
87	3-Methylbenzoic acid	99-04-7	136.2	+	1.36	1.5	11.0	-	-	-
88	4-Methylbenzoic acid	99-94-5	136.2	+	1.36	1.2	8.8	+	+	-
89	4,4'-Methylenebis(2-chloroaniline)	101-14-4	267.2	+	2.67	0.04	0.1	+	+	+
90	Methylenediphenol	1333-16-0	200.2	+	2.00	0.01	0.05	+	+	+
91	4,4'-Methylenediphenol	620-92-8	200.2	+	2.00	0.2	1.0	+	+	+
92	4-(1-Methylethenyl)phenol	4286-23-1	134.2	+	1.34	0.06	0.4	+	+	+
93	Methyl isothiocyanate	556-61-6	73.1	+	0.73	0.003	0.03	+	+	+
94	3-Methyl-4-nitrophenol	2581-34-2	153.2	+	1.53	0.04	0.3	+	+	+
95	3-Methylphenol (<i>m</i> -Cresol)	108-39-4	108.1	+	1.08	0.03	0.3	+	+	+
96	2-(4-Morpholinylthio)benzothiazole	95-32-9	284.4	+	2.84	0.1	0.3	+	+	+
97	1-Naphthylacetic acid	86-87-3	186.2	+	1.86	1.7	9.1	+	+	-
98	4-Nitro- <i>o</i> -anisidine	97-52-9	168.2	+	1.68	0.08	0.5	+	+	+
99	3-Nitrobenzylamine	99-09-2	138.1	+	1.38	1.6	11.6	-	-	-
100	<i>p</i> -Nitrophenol sodium salt	824-78-2	161.1	+	1.61	0.6	3.7	+	+	-
101	4,4'-Oxybis(benzenesulfonylhydrazide)	80-51-3	358.4	+	3.58	0.6	1.7	+	+	-
102	2-Pentylanthraquinone	13936-21-5	278.4	+	2.78	0.06	0.2	+	+	+
103	N-Phenylmaleimide	941-69-5	173.2	+	1.73	0.01	0.02	+	+	+
104	N-Phenyl-N'-isopropyl- <i>p</i> -phenylenediamine	101-72-4	226.3	+	2.26	0.01	0.01	+	+	+
105	Phosphoric acid, dodecyl ester, sodium salt	50957-96-5	288.3	+	2.88	0.05	0.16	+	+	+
106	Phthalimide	85-41-6	147.1	+	1.47	2.5	17.0	-	-	-

JEC ID	Chemical Name	CAS No.	MW	CA (Original call)	Equiv. to 10 mM (mg/mL)	LEC (mg/mL)	LEC (mM)	1997-OECD ^a	r-OECD ^b	ICH ^c
								CA	CA	CA
107	Sorbitan monooleate	1338-41-6	430.6	+	4.31	1.1	2.5	+	+	-
108	4,4'-Sulfonyldiphenol	80-09-1	250.3	+	2.50	0.4	1.6	+	+	-
109	3a,4,7,7a-Tetrahydro-1H-indene	3048-65-5	120.2	+	1.20	0.004	0.8	+	+	+
110	2,3,4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	31127-54-5	246.2	+	2.46	0.0148	0.06	+	+	+
111	2,2,6,6-Tetramethyl-4-hydroxypiperidine	2403-88-5	157.3	+	1.57	2.0	12.7	-	-	-
112	Thiourea dioxide	4189-44-0	108.1	+	1.08	0.6	5.5	+	+	-
113	Thymol	89-83-8	150.2	+	1.50	0.002	0.01	+	+	+
114	Toluene diisocyanate (Toluene diisocyanate)	26471-62-5	174.2	+	1.74	0.3	1.8	+	+	-
115	2,4,6-Tribromophenol	118-79-6	330.8	+	3.31	0.05	0.2	+	+	+
116	1,3,5-Trihydroxybenzene	108-73-6	126.1	+	1.26	0.1	1.0	+	+	+
117	2,4,6-Trimercapto-S-triazine	638-16-4	177.3	+	1.77	0.8	4.5	+	+	-
118	Trimethoxyphosphine	121-45-9	124.1	+	1.24	1.2	10.0	+	+	-
119	Trimethylamine	75-50-3	59.1	+	0.59	0.4	6.8	+	+	-
120	2,3,6-Trimethylphenol	2416-94-6	136.2	+	1.36	0.05	0.4	+	+	+
121	2,4,6-Trinitrophenol (Picric acid)	88-89-1	229.1	+	2.29	1.6	7.0	+	+	-
122	Triphosphoric acid aluminium salt	13939-25-8	317.9	+	3.18	2.0	6.3	+	+	-
123	1,3,5-Tris(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)isocyanuric acid	27676-62-6	784.1	+	7.84	2.5	3.2	+	-	-
124	2-Vinylpyridine	100-69-6	105.2	+	1.05	0.01	0.1	+	+	+

MW, Molecular weight; CA, Chromosomal aberration test; LEC, Lowest effective concentration;

+, Positive; -, Negative;

a: Current OECD test guideline adopted in 1997 (10 mM or 5 mg/mL whichever is lower)

b: Draft revised OECD test guideline (10 mM or 2 mg/mL whichever is lower)

c: ICH S2(R1) guideline (1 mM or 0.5 mg/mL whichever is lower)

 : Highlight to the negative result by the re-evaluation

表3 JEC DB における CA 陰性 148 物質

#	Chemical Name	CAS	MW	CA
1	1-Aminoanthraquinone	82-45-1	223.2	-
2	2-Amino-2-ethyl-1,3-propanediol	115-70-8	119.2	-
3	7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid	87-02-5	239.3	-
4	2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile)	78-67-1	164.2	-
5	1,3-Bis(aminomethyl) benzene	1477-55-0	136.2	-
6	1,1-Bis(tert-butylidioxy)-3,3,5-trimethylcyclohexane	6731-36-8	302.5	-
7	3,3-Bis(p-dimethylaminophenyl)-6-dimethylaminophthalide	1552-42-7	415.5	-
8	Bis(2-ethylhexyl) azelate	103-24-2	412.7	-
9	Bis(1-methyl-1-phenylethyl) peroxide	80-43-3	270.4	-
10	1,2-Bis(staeroylamino) ethane	110-30-5	593.0	-
11	Bumetrizole	3896-11-5	315.8	-
12	1,2-Butanediol	584-03-2	90.1	-
13	1,4-Butanediol	110-63-4	90.1	-
14	2-tert-Butoxyethanol	7580-85-0	118.2	-
15	2-sec-Butyl-4,6-dinitrophenol	88-85-7	240.2	-
16	Butyl methacrylate	97-88-1	142.2	-
17	6-tert-Butyl-2,4-xyleneol	1879-09-0	178.3	-
18	N-(Carboxymethyl)-N,N-dimethyl-1-dodecanaminium, inner salt	683-10-3	271.4	-
19	Cesium chloride	7647-17-8	168.4	-
20	4-Chlorobenzoyl chloride	122-01-0	175.0	-
21	1-Chlorobutane	109-69-3	92.6	-
22	Chlorocyclohexane	542-18-7	118.6	-
23	C.I.Pigment Red 22	6448-95-9	426.4	-
24	C.I.Pigment Yellow 53	8007-18-9	488.6	-
25	Citral	5392-40-5	152.2	-
26	Cyanoguanidine	461-58-5	84.1	-
27	3-Cyanopyridine	100-54-9	104.1	-
28	Cyclohexene	110-83-8	82.1	-
29	N-Cyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide	95-33-0	246.3	-
30	D&C Red No.7	5281-04-9	424.3	-
31	Decahydronaphthalene	91-17-8	138.3	-
32	Diacetone alcohol	123-42-2	116.2	-
33	4,4'-Diamino-2,2'-stilbenedisulfonic acid	81-11-8	370.4	-
34	Dibenzyltoluene	26898-17-9	272.4	-
35	2,3-Dibromosuccinic acid	526-78-3	275.9	-
36	Dibutyl phosphate	107-66-4	210.2	-
37	2,4-Dichloro-1-methylbenzene	95-73-8	161.0	-
38	2,4-Dichloronitrobenzene	611-06-3	192.0	-
39	2,6-Dichlorotoluene	118-69-4	161.0	-
40	1,3-Dicyanobenzene	626-17-5	128.1	-
41	1,4-Dicyanobenzene	623-26-7	128.1	-
42	Dicyclohexylcarbodiimide	538-75-0	206.3	-
43	Dicyclopentadiene	77-73-6	132.2	-
44	Dicyclopentylsilanediol	211495-85-1	200.4	-
45	1,4-Diethylbenzene	105-05-5	134.2	-
46	Diethylbiphenyl	28575-17-9	210.3	-
47	N,N-Diethyl-m-toluamide	134-62-3	191.3	-
48	Diheptyl phthalate	3648-21-3	362.5	-
49	2,3-Dihydroxypropyl 9-cis-octadecenoate	111-03-5	356.5	-
50	Diisopropylbenzene	25321-09-9	162.3	-
51	3,4-Dimethylaniline (3,4-Xylidine)	95-64-7	121.2	-
52	Dimethyl 2,6-naphthalenedicarboxylate	840-65-3	244.3	-
53	1,4-Dimethyl-2-(1-phenylethyl) benzene	6165-51-1	210.3	-
54	2,2-Dimethyl-1,3-propanediol	126-30-7	104.2	-
55	1,3-Diphenylguanidine	102-06-7	211.3	-
56	Diphenyl disulfide	882-33-7	218.3	-
57	Diphenyl 2-ethylhexyl phosphate	1241-94-7	362.4	-
58	Disodium succinate hexahydrate	6106-21-4	270.1	-
59	Ditridecyl phthalate	119-06-2	530.8	-
60	Divinylbenzene	1321-74-0	130.2	-
61	Docosanoic acid	112-85-6	340.6	-
62	4-Ethylbiphenyl	5707-44-8	182.3	-
63	Ethylcyclohexane	1678-91-7	112.2	-
64	2-Ethylhexyl methacrylate	688-84-6	198.3	-
65	2-Ethylhexyl vinyl ether	103-44-6	156.3	-
66	2-Ethyl-2-hydroxymeth-1,3-propanediol	77-99-6	134.2	-

#	Chemical Name	CAS	MW	CA
67	5-Ethylidene-2-norbornene	16219-75-3	120.2	-
68	Ethyl methyl ketoxime	96-29-7	87.1	-
69	4-Ethylmorpholine	100-74-3	115.2	-
70	2,2,4,4,6,6,8-Heptamethylnonane	4390-04-9	226.5	-
71	Hexabromocyclododecane, isomers	3194-55-6	641.7	-
72	<i>n</i> -Hexadecane	544-76-3	226.5	-
73	2-Hydro-4-(octyloxy)benzophenone	1843-05-6	326.4	-
74	2-(2'-Hydroxy-3',5'-di- <i>tert</i> -butylphenyl) benzotriazole	3846-71-7	323.4	-
75	2-Imidazolidinethione	96-45-7	102.2	-
76	Indene	95-13-6	116.2	-
77	Isocyanuric acid	108-60-5	129.1	-
78	4,4'-Isopropylidenebis (2,6-dibromophenol)	79-94-7	543.9	-
79	Lithium bromide	7550-35-8	86.9	-
80	Methacrylamide	79-39-0	85.1	-
81	4-Methoxybenzaldehyde	123-11-5	136.2	-
82	3-Methoxy-3-methyl-1-butanol	56539-66-3	118.2	-
83	4-Methylbenzenesulfonamid	70-55-3	171.2	-
84	4-Methyl-2,4-diphenyl-1-pentene	6362-80-7	236.4	-
85	Methyl dodecanoate	111-82-0	214.4	-
86	1-Methylethenylbenzene	98-83-9	118.2	-
87	4-(1-Methylethyl) aniline	99-88-7	135.2	-
88	2-(1-Methylethoxy) ethanol	109-59-1	104.1	-
89	2-Methyl-5-nitrobenzenesulfonic acid	121-03-9	217.2	-
90	3-Methyl-1,5-pentanediol	4457-71-0	118.2	-
91	4-Methyl-1-pentene	691-37-2	84.2	-
92	4-(1-Methyl-1-phenylethyl) phenol	599-64-4	212.3	-
93	2-Methyl-2-propanethiol	75-66-1	90.2	-
94	4-(1-Methylpropyl)phenol	99-71-8	150.2	-
95	Monosodium 4-amino-5-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonate	5460-09-3	341.3	-
96	1-Naphthol-4-sulfonic acid sodium salt	6099-57-6	160.2	-
97	2,2'-Nethylenebis(6- <i>tert</i> -butyl- <i>p</i> -cresol)	119-47-1	340.5	-
98	Nickel(II) carbonate hydroxide tetrahydrate	39430-27-8	376.2	-
99	Nonylphenol	25154-52-3	220.4	-
100	1-Octanethiol	111-88-6	146.3	-
101	<i>p</i> - <i>tert</i> -Octylphenol	140-66-9	206.4	-
102	<i>n</i> -Pentadecane	629-62-9	212.4	-
103	Pentaerythritol	115-77-5	136.2	-
104	Pentaerythritol tetra(2-ethylhexanoate)	7299-99-2	640.9	-
105	3-Phenoxytoluene	3586-14-9	184.3	-
106	Phthalocyanine Blue	147-14-8	576.1	-
107	Pigment Green No.7 (Hexadecachloro)	14832-14-5	1127.2	-
108	Pigment Green No.7 (Plychloro, unspecified)	1328-53-6	1127.2	-
109	Pigment Orange 16	6505-28-8	620.7	-
110	Potassium 7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonate	842-18-2	360.5	-
111	1-Propene, tetramer	6842-15-5	168.3	-
112	Propylene glycol monomethyl ether acetate	108-65-6	132.2	-
113	Silicone nitride	12033-89-5	140.3	-
114	Sodium 4-amino-1-naphthalenesulfonate	130-13-2	245.2	-
115	Sodium 1-methoxycarbonylpentadecane-2-sulfonate	4016-24-4	372.5	-
116	Sodium 2-naphthol-3,6-disulfonate	135-51-3	348.3	-
117	Sodium 3-nitrobenzenesulfonate	127-68-4	225.2	-
118	Sodium <i>p</i> -toluenesulfonate	657-84-1	194.2	-
119	Tetrabromoethane	79-27-6	345.7	-
120	Tetrahydrofurfuryl alcohol	97-99-4	102.1	-
121	Tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione	11070-44-3	166.2	-
122	Tetrahydrothiophene 1,1-dioxide	126-33-0	120.6	-
123	Tetramethylammonium hydroxide	75-59-2	91.2	-
124	Tetrasodium monosilicate hydrate	13472-30-5	180.0	-
125	4,4'-Thiobis(6- <i>tert</i> -butyl- <i>m</i> -cresol)	96-69-5	358.5	-
126	3,3'-Thiobispropanoic acid	111-17-1	178.2	-
127	Thiophene	110-02-1	84.1	-
128	<i>o</i> -Toluenesulfonamide	88-19-7	171.2	-
129	<i>m</i> -Toluidine	108-44-1	107.2	-
130	Trifluoromethylbenzene	98-08-8	146.1	-
131	Triisobutylene	7756-94-7	168.3	-
132	1,2,3-Trimethylbenzene	526-73-8	120.2	-
133	1,2,4-Trimethylbenzene	95-63-6	120.2	-
134	3,5,5-Trimethylhexan-1-ol	3452-97-9	144.3	-
135	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	6846-50-0	286.5	-
136	Trimethyl phosphate	512-56-1	140.1	-

#	Chemical Name	CAS	MW	CA
137	Trimethylsilanol	1066-40-6	90.2	-
138	Trioctylbenzene-1,2,4-tricarboxylate	89-04-3	546.8	-
139	Triphenylchloromethane	76-83-5	278.8	-
140	Tripropylene glycol	24800-44-0	192.3	-
141	Tris(2-butoxyethyl) phosphate	78-51-3	398.5	-
142	Tris(p-cumenyl) phosphate	26967-76-0	452.6	-
143	Tris(2-ethylhexyl) 1,2,4-benzenetricarboxylate	3319-31-1	546.9	-
144	Tris(2-ethylhexyl) phosphate	78-42-2	434.6	-
145	1,3,5-Tris(2-hydroxyethyl)-1,3,5-triazine-2,4,6-(1H,3H,5H)-trione	839-90-7	261.2	-
146	1,1,1-Tris(hydroxymethyl)ethane	77-85-0	120.2	-
147	1,3,5-Tris(2-propenyl) isocyanuric acid	1025-15-6	249.3	-
148	Undecane	1120-21-4	156.3	-

MW, Molecular weight; CA, Chromosome aberration test,
-, Negative; MW, Molecular weight.

表 4 CGX DB の 435 物質による適用ガイドラインごとの発がん感受性および特異性

Test guideline	Dataset	CA-negative	CA-positive	Total
Original call ^a	Carcinogen	107	210	317
	Non-carcinogen	61	57	118
	Total	168	267	435
	Calculation	Sensitivity, 66.2% (210/317) Specificity, 51.7% (61/118)		
1997-OECD ^b	Carcinogen	117	200	317
	Non-carcinogen	70	48	118
	Total	187	248	435
	Calculation	Sensitivity, 63.1% (200/317) Specificity, 59.3% (70/118)		
r-OECD ^c	Carcinogen	117	200	317
	Non-carcinogen	70	48	118
	Total	187	248	435
	Calculation	Sensitivity, 63.1% (200/317) Specificity, 59.3% (70/118)		
ICH ^d	Carcinogen	173	144	317
	Non-carcinogen	86	32	118
	Total	259	176	435
	Calculation	Sensitivity, 45.4% (144/317) Specificity, 72.9% (86/118)		

a: Call in CGX database [12], including 19 CA-positives (10 carcinogens and 9 non-carcinogens) at >10 mM

b: Current OECD test guideline adopted in 1997 (10 mM or 5 mg/mL whichever is lower)

c: Draft revised OECD test guideline (10 mM or 2 mg/mL whichever is lower)

d: ICH S2(R1) guideline (1 mM or 0.5 mg/mL whichever is lower)

表 5 JEC DB における CA 陽性 124 物質の適用ガイドラインごとの陽性物質数

Dataset	Original call ^a	1997-OECD ^b	r-OECD ^c	ICH ^d
124 CA-positives	124	118	113	60

a: Call in JEC database [19], including 6 CA-positives) at >10 mM

b: Current OECD test guideline adopted in 1997 (10 mM or 5 mg/mL whichever is lower)

c: Draft revised OECD test guideline (10 mM or 2 mg/mL whichever is lower)

d: ICH S2(R1) guideline (1 mM or 0.5 mg/mL whichever is lower)

表 6 適用ガイドラインで結果の異なる CA 陽性かつ Ames 陽性の 15 物質の
in vivo 遺伝毒性と発がん性の要約

JEC ID	Chemical name	CAS No.	Ames	in vivo MN	Carcinogenicity ^a
5	<i>N</i> -(Aminoethyl)ethanolamine	111-41-1	+	-	
7	2-Amino-1-naphthalenesulfonic acid	81-16-3	+		
10	Azodicarbonamide	123-77-3	+	-	
13	1,3-Bis(aminomethyl)cyclohexane (mixtures of cis-, trans-)	2579-20-6	+		
17	1-Bromo-3-chloropropane	109-70-6	+		
51	2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate	2867-47-2	+	-	
52	2,3-Dimethylaniline (2,3-Xylidine)	87-59-2	+		
53	2,6-Dimethylaniline (2,6-Xylidine)	87-62-7	+	-	2B
54	3,5-Dimethylaniline (3,5-Xylidine)	108-69-0	+		
71	Hydrazine monohydrate	7803-57-8	+	+ ^b	2B ^b
82	3-Methoxybenzylamine	536-90-3	+	+	
101	4,4'-Oxybis(benzenesulfonylhydrazide)	80-51-3	+	-	
112	Thiourea dioxide	4189-44-0	+		
114	Toluene diisocyanate (Toluene diisocyanate)	26471-62-5	+	-	2B
121	2,4,6-Trinitrophenol (Picric acid)	88-89-1	+	-	

+, Positive; -, Negative; MN, Micronucleus;

a: In terms of IARC classification

b: As hydrazine (CAS No. 302-01-2)

表 7 適用ガイドラインで結果の異なる 53 物質のヒト健康リスクへの懸念のレベル評価

Level of concern	Number of chemicals with different result based on the different top concentration limit between r-OECD and ICH TGs (Chemical JEC ID) ^a
Negligible	25 (JEC IDs 3, 4, 6, 19, 28, 33, 36, 39, 44, 45, 47, 57, 66, 69, 74, 75, 76*, 79, 88, 97, 100, 107, 108, 117*, 122)
Minimal	8 (JEC IDs 1*, 16, 55, 62, 64, 78, 85, 119)
Some	16 (JEC IDs 5*, 7*, 10*, 13*, 17*, 35, 51*, 52*, 54*, 73*, 77, 86, 101*, 112*, 118, 121*)
Real	4 (JEC IDs 53*, 71*, 82*, 114*)

a: Positive by revised OECD test guideline, but negative by ICH S2(R1) guideline

*: Evaluated in this paper. Other chemicals without astariask were evaluated by Morita et al ¹⁾.

表 8 CGX DB の CA 陽性 267 物質および JEC DB の CA 陽性 124 物質の分子量分布

Database	Dataset	Number of chemicals (%) in various ranges of molecular weight					
		<100	100 – <200	200 – <300	300 – <400	400 – <500	≥500
CGX	267 CA-positives	25 (9.4)	116 (43.4)	76 (28.5)	36 (13.5)	7 (2.6)	7 (2.6)
JEC	124 CA-positives	6 (4.8)	79 (63.7)	27 (21.8)	7 (5.6)	1 (0.8)	4 (3.2)

III. 遺伝毒性エンドポイント予測のための段階的アプローチ：化学物質の変異原性を予測するためのパスウェイベースのワークフロー（研究分担：本間正充）

III-1. 研究目的

遺伝毒性試験は、工業用有機化学物質を含む幅広い化学物質について実施される。これらの試験の結果を用いて、化学物質を分類することができる。1つの化学物質の遺伝毒性を正しく評価するためには、様々な種類の化学物質-生物相互作用を評価する必要がある。従来、これは一連の試験系の結果から検討されてきたが、それぞれの試験の結果は、*in vivo* 試験については統計学的に重みが付けられていたが、他に關してはほぼ同じ重み付けがされている。しかし、遺伝毒性、特に変異原性と関連する DNA への直接の影響は、*in vivo* の有害な影響とは異なるものである。したがって構造活性の見地からすると、変異原性にはさらなる重み付けが妥当と考えられる。遺伝毒性とは、DNA 及び/又は DNA 以外の標的と化学物質との相互作用を介して、遺伝子の構造又は数が増加するプロセスを指す、幅広い用語である。一方、変異原性は、DNA の量又は構造に永続的で伝達性の変化が誘導されることを指す。したがって、すべての変異原性化学物質は常に遺伝毒性であるが、すべての遺伝毒性化学物質が必ずしも変異原性なのではない。このような違いは重要であるものの、特定の試験法で定義される場合を除き、「遺伝毒性」という用語が一般的に使用されている。

逐次的評価に基づく試験アプローチ（1つのレベルの結果から次の行動が決定される）は、段階的試験法（*tiered testing scheme*）と呼ばれる。段階的アプローチは通常、既存の文献データ、並びに SAR/QSAR のプレスクリーニングを一次評価するところから、単純な *in vitro* スクリーニングアッセイに進む。最後の手段としてのみ、標準的な動物試験が実施される。この目的は、潜在の変異原性を予測するための科学的に重要な情報を提供することである。

これまで 30 年間にわたり、遺伝毒性試験は 2 段階試験アプローチの中で用いられてきた。すなわち Tier I の *in vitro* 遺伝毒性試験と、それに続く、*in vitro* 試験で陽性であった化学物質の生物学的重要性を判定するための Tier II の *in vivo* 遺伝毒性試験である。一般的な遺伝毒性試験バッテリーには、遺伝子変異（単一遺伝子又は遺伝子ブロックに影響する点突然変異）を測定する試験法、染色体異常（染色体構造異常）を測定する試験法、並びに異数性（数的染色体異常）を測定する試験法がある。*In vitro* の遺伝毒性に関する陽性の結果は、化学物質に固有の遺伝毒性活性を示しているが、極端な状況下であるため *in vivo* の遺伝毒性に外挿するためには重要でないことも多い。現在の *in vitro* 遺伝毒性試験系は最終的には、動物試験に比べて発がん性予測に対して高い感度（80%超）を示すが、その特異度は低い。すなわち「偽陽性」を示す傾向があり、複数の *in vitro* 遺伝毒性試験において陽性でも、動物に変異原性

でない場合が多い。変異原性の Mode of Action (MoA)に関する理解は、特に分子的作用と細胞学的作用といった実験結果の解析に頼ることが多い。そのようなアプローチは重要なエビデンスを提供できるが、プロセスの重要な面を個々にすべてカバーしていることは稀である。多くの変異原性化学物質は、代謝活性化を受けて反応体となり DNA に共有結合するが、他のものは解毒される。試験プロトコルがどれほど広範囲に及ぶものであっても、遺伝毒性をもつすべての化学物質を検出できるという単一試験系は存在していないことから、ある化学物質が遺伝毒性をもつか否かを評価するためには多数の試験を実施するということが、一般には受け入れられている。その究極の結果として、遺伝毒性試験のための多数の戦略とガイドラインが開発されている。米国環境保護庁 (EPA) の試験バッテリーは、3 段階のスキームになっている。第一段階は、遺伝子変異に関する細菌を用いた復帰突然変異試験 (AMES 試験)。第二段階は *in vitro* のほ乳類細胞を使った遺伝子変異アッセイ (マウスリンパ腫試験)。第三段階は *in vivo* の骨髄を使った哺乳類染色体異常試験又は *in vivo* の赤血球小核試験である。我が国においても、基本的に 3 試験のアセスメントスキームによる同様の遺伝毒性試験戦略をとっている。

予測性を改善しようという取組みの中で、戦略的試験は総合的試験戦略 (Integrated testing strategies : ITS) という形をとってきた。ITS の目的は、科学的な全関連情報を最大限に利用し、

可能であれば動物試験を避けようというものである。簡単にいえば、遺伝毒性について様々な種類のデータと情報 (個々のアッセイ、試験バッテリー及び/又は段階的試験法など) の ITS を意思決定プロセスに統合する。ITS アセスメントの重要な要素は、MoA とエビデンスの重み付け (WoE) という概念を導入していることである。例えば、REACH の技術的指針に記載されている ITS では、化学物質の変異原性を評価する際に最も多く使用されている *in vitro* 及び *in vivo* システムが概説されている。我々は、未試験の化学物質の遺伝毒性を予測するために、陽性 / 陰性評価 (positive/negative evaluation) を用いた 3 段階の ITS 法を開発した。簡単にいえば、第一段階では *in vitro* の変異原性試験結果に基づき、化学物質を陽性又は陰性のカテゴリーに細分する。第二段階は *in vivo* の、肝臓の遺伝毒性作用に基づく同様の区別を行う。第三段階は *in vivo* の骨髄における小核形成の結果に基づく区別である。この究極の結果は 5 レベルのエキスパートシステムであり、3 段階で陰性-陰性-陰性の結果であった場合はレベル 1 とし、陽性-陽性-陽性の結果はレベル 5 とした。

近年、分子レベルの毒性の原因となる開始反応 (molecular initiating event : MIE) と規制上関心がもたれる *in vivo* の結果との間の、機序的に信憑性のある因果的な関連性を示すため、Adverse outcome pathway (AOP) という概念が導入されている。この AOP という概念の重要な目的は、化学物質の管理に関する意思決定プロセスにおいて、透明性を向

上させ、効率を改善し、不確実性を減らすことである。さらにこの AOP という概念により、*in vitro* 試験を含む代替法の結果を、*in vivo* の既存の知識とメカニズム的に統合した実践的なワークフローを描くことが可能となる。この目的は、関連する科学的情報を組み合わせ、様々なレベルの生物学的構造（さらにその他の影響力のある要素）に沿って構築することである。AOP は直線的に描かれることもあるが、毒性は一般に多次元であるため、1 つの毒性物質の生体分子的な相互作用と、その最終的な有害作用との間のパスウェイは大きく変わっていく可能性がある。これは、ヒトの健康に係るエンドポイントについて特にあてはまる。AOP は本来、中間的なレベルの生物学的構造（皮膚感作など）での、明確で限定的な作用をもつエンドポイントのために開発されたものであった。しかし、それ以外の規制上関心がもたれる健康関連エンドポイント、例えば変異原性などは、高いレベルでの生物学的構造では明確な因果効果をもたない。このような、明確な中間的効果の欠如により、AOP の開発と利用が困難となっている。化学物質カテゴリーは一般に、化学的類似性又は *molecular initiating event* (MIE) により、特定の化学物質-生物相互作用の可能性に基づき構築される。この化学物質カテゴリーにより、試験中の *chemical-by-chemical* のアプローチから離れ、1 つのカテゴリー内での類推 (*read-across*) を介したデータギャップの穴埋めが可能となる。これにより、カテゴリーに含まれる化学物質のアセスメント完了に必要なリソースを削

減できる。規制上関心がもたれる *in vivo* エンドポイントに基づく化学物質カテゴリーを組み立てることが最も有用であるが、このためには MIE と明確な因果関係をもつ広範な *in vivo* データが必要である。そのようなデータは多くが得られておらず、特に慢性的な健康への作用については得られていない。

本研究の目的は、過去に Mekenyan らにより記述されていた *in vitro* と *in vivo* の予測法を、試験能力という次元を加えることで精緻化することである。具体的には、一連のパスウェイから構成されるワークフローを、以下によりカバーされる主要イベントに置き換える。特定の *in vitro* 変異原性、*in vivo* の肝臓における体細胞作用、*in vivo* の遠隔組織における体細胞作用、及び *in vivo* の遠隔組織における生殖細胞作用。代謝活性と解毒の主要部位（肝臓）と、遠隔部位（循環系を介して肝臓とつながっている組織）の両方における *in vivo* 作用を検討し、同様の能力をもつアッセイを 1 つのパスウェイに並べることで、化学物質カテゴリーを形成することができ、それにより機構的に正しく理解され、高い確度をもつ予測が可能になるという仮説を立てる。

III-2. 研究方法および材料

以下に示す遺伝毒性試験結果を基に、1) 能力、2) *in vitro* か *in vivo* か、3) エンドポイントの種類（遺伝毒性か変異原性か）、4) 身体部位（主要代謝組織 [肝臓] か、代謝から離れた組織 [骨髄など] か）といった基準に基づき、異なるレベルの生物学的構造（1、2、3）と異なる能

力 (A、B、C) から構成されるパスウェイを、変異原性に至る様々な MoA について作成し、単一のワークフローとして表示する。さらに、ワークフロー内のレベルと能力に関する実験結果を調べ、パスウェイを WoE スキームの中で評価した。

a) In vitro 変異原性試験

Ames 試験は、遺伝子変異を検出するために最も広く使用されている細菌試験である。これは、ヒスチジン栄養要求性のネズミチフス菌株を、ヒスチジン非存在下での増殖能により選択する、「復帰」突然変異試験である。簡単にいえば、ヒスチジン遺伝子内に一定の突然変異をもつ菌株に、一定の試験濃度範囲でインキュベートし、最初の突然変異が復帰又は抑制される 2 つ目の突然変異を誘発し、機能性の遺伝子を回復させる。最も多く使用されているネズミチフス菌株は TA98 と TA100 の 2 種である。TA98 株には hisD3052 の変異があり、フレームシフト型復帰突然変異を検出する。一方、TA100 株には hisG46 の変異があり、塩基対置換型復帰突然変異を検出する。Ames 試験のメリットは、比較的大規模な未変異の細菌集団から、少数の突然変異を同定しスコア化できることである。細菌は、真核生物には共通の多数の内因性代謝経路を欠いているため、外因性の活性化系として、Aroclor 1254 等で前処理したラット肝の抽出液 (S9 画分) を試験系に加える。本研究において、これは Ames-S9 とする。染色体異常とは、化学物質の曝露により生じる染色体の構造、又は数の異常である。このような異常には、DNA に対する作用 (直接の DNA 切断、破損した DNA

鋳型上の複製、DNA 合成の阻害など) と、染色体蛋白に対する傷害が含まれる。ヒト末梢血リンパ球、又は不死化細胞株は、*in vitro* 染色体異常の評価に最も多く用いられる細胞系である。簡単にいえば、分裂中期で停止した細胞中の異常をギムザ染色後にスコア化する。*In vitro* の哺乳類の染色体異常試験では、試験期間の時間枠後に細胞死により有害作用が消失するため、この試験は完全な変異原性試験と考えられないかもしれない。本研究において、この検出型は *in vitro* CA 試験とする。

マウスリンフォーマ試験は、最も広く利用されている哺乳類の遺伝子変異アッセイである。この試験では、L5178Y/Tk+/- 3.6.2C マウスのリンパ腫細胞における Tk 遺伝子に生じる、様々な突然変異を検出する。簡単に言えば、チミジンキナーゼをコードする遺伝子をもつことから、細胞は代謝に利用するヌクレオチドを培地から取り出すことができるが、これは細胞の生存に不可欠ではない。真核生物細胞は二倍体であるため、Tk 遺伝子のコピーを 2 つもつヘテロ接合細胞が存在するが、このアッセイのためには一方のコピーが不活化されている必要がある。チミジンアナログであるトリフルオロチミジンを含む培地に細胞を播種することで、突然変異体を検出することができる。未変異の Tk+/- 細胞はトリフルオロチミジンによって死亡するが、トリフルオロチミジンに抵抗性となった Tk-/- 変異細胞は生き残り、これが形成したクローンを計数する。本研究において、この試験は MLA とする。

b) In vivo 変異原性試験

トランスジェニックげっ歯類を用いる突然変異試験は 1980 年代後半から 1990 年代前半に開発された。Muta™マウス、Big Blue®マウス、及びラットによる試験が最も広く用いられている。最近試験法が OECD でガイドライン化された (TG488)。Muta™マウスには、完全な大腸菌 lacZ (β-ガラクトシダーゼ) を含む組換え λ バクテリオファージベクターが導入されており、細菌株 (E. coli lacZ-galE-) を用いてフェニルガラクトシダーゼ含有培地上で lacZ 変異体をポジティブ選択することで、lacZ 遺伝子中の変異を評価する。簡単にいえば、フェニルガラクトシダーゼの存在下では lacZ 変異体のみが増殖しプラークを形成する。対照的に、未変異体である lacZ+は、フェニルガラクトシダーゼをガラクトースに転換する β-ガラクトシダーゼ酵素を産生し、ガラクトースはさらに毒性の中間体であるウリジン二リン酸 (EDP) -ガラクトースとなり、E. coli galE-を死滅させる。Big Blue®アッセイでは、λ バクテリオファージベクターに含まれる lacI をレポーター遺伝子とする。lacI 遺伝子内で生じる突然変異を、E. coli lacI 株を使って X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) 培地上で選択する。未変異の lacI は β-ガラクトシダーゼをコードする lac オペロンを抑制し、透明プラークを形成するが、一方で変異 lacI は基質として X-gal を使う β-ガラクトシダーゼを生成し、青いプラークを形成する。これを計数する。突然変異検出のための標的となるレポーター遺伝子がトランスジェ

ニック動物の染色体に取り込まれていることから、変異の誘導と、実際の腫瘍発現組織における測定によって、曝露された動物のすべての組織で体細胞変異を測定することができる。トランスジェニックげっ歯類突然変異試験は点突然変異の検出に非常に適しているが、染色体異常イベントの検出にはあまり適していない。本研究において、このアッセイは TRM としている。

上述の通り、構造的染色体異常には DNA と蛋白質の両方に対する作用が含まれる。末梢血リンパ球は in vivo の染色体異常の測定に最も一般的に使用されている系であり、その異常を分裂中期で停止した細胞をギムザ染色し、スコア化する。本研究において、このアッセイは in vivo CA としている。In vivo のげっ歯類小核試験は、in vivo での染色体損傷の評価に広く利用され、広範にバリデーションされているアッセイである。また、標準的なげっ歯類毒性スクリーニングアッセイに組み込まれている。解析には、骨髓 (又は末梢血) 中の未成熟赤血球 (多染性赤血球、網赤血球) も許容されている。試験デザインと実験手順の詳細が発表されている。本研究において、このアッセイは in vivo BMMNT としている。

c) In vivo 遺伝毒性試験

肝臓の不定期 DNA 合成試験は、in vivo での DNA 損傷の評価に適した試験と考えられている。変異原性のイベントは DNA 損傷部位の未修復、修復ミス、又は複製ミスの結果と考えられているため、不定期 DNA 合成試験は修復プロセスの忠実性を示すものではなく、さらに変異

原性に関する試験というより遺伝毒性の試験と考えられる。本研究において、このアッセイは UDS としている。コメットアッセイは、哺乳動物細胞の DNA におけるアルカリ感受性部位と DNA 鎖切断を評価するための、簡単で高感度の単細胞ゲル電気泳動法である。あらゆる組織のほぼすべての細胞種又は単一細胞の懸濁液を使用できることから、コメットアッセイは、*in vitro* と *in vivo* の遺伝毒性試験で幅広く利用されてきた。コメットアッセイは *in vivo* 遺伝毒性試験と同様、組織や肝臓などの臓器からの細胞懸濁液に応用できるという利点がある。慣例として、コメットアッセイは DNA 損傷及び/又は DNA 修復メカニズムを検出できることから、DNA 損傷指標試験と考えられている。しかし、コメットアッセイにより検出される主要損傷部位が、正しく修復され永続的な遺伝子異常を生じないこともあるため、これは変異原性試験とはみなされない。

III-3. 結果

上述の基準に基づき、特定のアッセイを生物学的構造の様々なレベル (*in vitro* 対 *in vivo*、肝臓対遠隔組織) で一覧にした。同じ 1 つのレベルで異なる枠内に記載している試験系は、その能力が異なる (図 1)。

細菌を用いた *in vitro* 変異原性に関する「レベル 1A」は、ラット肝 S9 の外因性活性化系存在下での Ames 試験による評価である。このアッセイは、短鎖の DNA 損傷 (2~3 塩基) のみを検出する。

「レベル 1B」は *in vitro* の変異原性に関

するもので、哺乳類の染色体異常試験 (DNA 及び/又は蛋白損傷を検出する) と、マウスリンフォーマ試験 (構造的染色体異常、異数性、ヘテロ接合性の消失に至る組換え [遺伝子変換など] を検出する) において評価される。したがって、レベル 1 が 2 つに細分されているのは、その能力が異なっていることを示し、結果として相補的なものと考えることができる。

レベル 2 は A、B、C のサブグループに細分される。グループ A は *in vivo* の肝臓における遺伝毒性で、コメットアッセイと不定期 DNA 合成試験により評価される。コメットアッセイは、長鎖の DNA 損傷 (20~30 塩基) を検出する。肝臓の不定期 DNA 合成 (UDS) 試験は、DNA 修復の役割を評価する。これら 2 試験はレベル 1A の Ames 試験と類似した能力をもつが、DNA 損傷の程度が異なることから若干の不一致が生じることも考えられる。

グループ B は *in vivo* の TRM に関するもので、点突然変異を検出する。この試験は、同じ種類 (DNA) と同じ程度 (短鎖長) の損傷を検出することから、レベル 1A の Ames 試験と同様の能力をもつ。グループ C は、哺乳類の染色体異常試験において評価される *in vivo* 変異原性に関するもので、染色体異常イベントを検出する (構造的染色体異常、異数性など)。したがって *in vivo* の哺乳類染色体異常試験は、レベル 1B にある *in vitro* 染色体異常試験と能力の点で類似している。

レベル 3 には、唯一のカテゴリーの *in vivo* 変異原性が含まれ、骨髓小核試験が唯一の試験である。この試験により、変

異原性の化学物質の主要な代謝活性化が行われる肝臓から、離れた部位での染色体異常誘発性が検出される。レベル 2A のコメントアッセイ、レベル 2B の *in vivo* 肝臓 TRM 試験、及びレベル 2C の *in vivo* 哺乳類染色体異常試験は、*in vivo* 骨髄小核試験の補足となるものである。

III-4. 考察

a) 変異原性予測のための従来のワークフロー

我々が以前に作成したワークフローでは、始め *in vitro* の変異原性試験結果に基づき、化学物質を陽性又は陰性のカテゴリーに細分した。その後の区分けは *in vivo* の肝臓の遺伝毒性作用と、さらに *in vivo* の骨髄小核形成の結果に基づくものであった (図 2)。後者のワークフローにより陽性/陰性のプロファイルが得られたが (一番左の列のレベル I からレベル V)、試験能力の類似性に応じてアッセイを並べるといふ試みは行わなかった。むしろ、異なる MoA による変異原性操作に幅広いスキャンを実行できるよう、異なる能力をもつアッセイを集めることを目指し、様々なレベルの生物学的構造のアッセイをグループ化した。

In vitro で陰性と判定された化学物質は、肝臓と遠隔組織の骨髄でも *in vivo* で陰性である (レベル I)。*In vitro* で陰性が認められ、かつ *in vivo* で陽性が得られたデータをもつ化学物質の存在は、1 つの化学物質 (酢酸シプロテロン) についてのみ妥当性が確認されている (レベル II)。Mekenyan らは、*in vitro* で陽性であった化学物質の運命 (fate) も検討している。

興味深いことに、*in vitro* で陽性であった化学物質が、必ずしもすべて *in vivo* で陽性ではない。その一部は、*in vivo* の肝臓と骨髄での試験の両方で陰性のこともあった (レベル III)。このようなデータの矛盾は、*in vivo* のみで認められる作用を考慮することで正当に説明される。例えば、化学物質の代謝的解毒をもたらすいわゆる基質チャネリング (substrate channeling) と呼ばれるもので、これがない *in vitro* では陽性作用が引き起こされたと考えられる。別のタイプの *in vitro* 陽性化学物質は、*in vivo* の肝臓で陽性であったが、骨髄では陰性であった (レベル IV)。このような反応は、肝臓内では DNA 損傷を引き起こす能力を有するが、骨髄に移行する過程で、骨髄に損傷を誘発するのに十分ではないレベルまで低下するものと考えられる。その他の *in vitro* 陽性化学物質は、*in vivo* の肝臓及び骨髄で陽性であった (レベル V)。

上述のようなパスウェイのワークフローは妥当性が確認されているものの、予測上の問題が明らかになっている。各レベル (レベル 1~3) に最終的な変異原性陽性データを割り当てるためには、少なくとも 1 つの変異原性陽性データが文献中に確認されている必要がある。例えばレベル 1 では、Ames-S9、CA 又は MLA 試験からの陽性データに基づき、最終的に陽性の変異原性を割り当てる。同じアプローチがレベル 2 と 3 に *in vivo* 変異原性を割り当てるためにも用いられる。しかし、レベル 1 に現在含まれている試験系は、変異原性を評価する能力が異なっている (Ames 試験と CA 試験)。例えば、

もし Ames 試験陰性と CA データ陽性に基づいて、レベル 1 の最終変異原性が陽性に割り当てられたとき、レベル 2 における特定の試験のいずれもが変異原性を評価するための CA 試験の能力をもっていないために、この化学物質はレベル 2 で陰性となる可能性がある。レベル III について上に示した作業仮説によれば、この化学物質は *in vitro* 陽性で *in vivo* で肝臓について陰性と考えられ、肝臓の解毒に関わるという仮説が立てられる。これは、試験能力という次元を考慮していないために信憑性に欠けるかもしれない。本研究では、高分子に損傷を与える同等の能力をもつ試験法を選択し、それに基づいた新たな *in vitro* から *in vivo* の予測ワークフローを構築することにより、このような欠点を解決した。

b) Ames 試験陽性化学物質のワークフロー全体でのマッピング

図 1 に示したワークフローが意図した目的は、現在は異なるレベルの生物学的構造を通じた変異原性評価に依存している、様々な試験の能力を考慮することである。このワークフローを評価する取組みの中で、結果の連続性について様々なアッセイの試験データを検討した。図 3 は、レベル 1A (Ames 試験) で陽性である化学物質に関する、ワークフロー全体での結果を示している。

9 種類の化学物質については比較できなかったものの、*in vitro* Ames 試験陽性化学物質の大半 (78 種類中 70 種類) は *in vitro* CA 試験でも陽性である。Ames 試験陰性データの化学物質は CA も陰性であるはずため、このような Ames/CA デ

ータの不一致については徹底してデータ解析を行うべきである。肝臓の *in vivo* コメットアッセイ、又は UDS 試験と比較したとき、*in vitro* CA 試験で陰性又は評価されなかった化学物質の大半 (17 種中 14 種類) は陽性である。この知見は、試験能力の一貫性を表している。In vitro Ames 試験及び CA 試験の結果と比較したとき、*in vivo* のコメット又は UDS 試験陽性の化学物質には、2 つの異なるシナリオが示された。レベル 1A とレベル 1B で陽性であった 37 種の化学物質は、レベル 2A の試験でも陽性である。このような化学物質の肝臓での陽性反応を確認できるレベル 2B 又はレベル 2C のデータはなかった。それにもかかわらず、このような化学物質の多くは骨髄 (すなわちレベル 3) で陰性である。

レベル 2B のデータがない 17 種の化学物質については、レベル 2B の肝臓 *in vivo* TRM 試験において、レベル 1 で陽性結果が確認されている。これらの化学物質は、Ames S9 試験と同じ能力をもっている。16 種の Ames 試験陽性化学物質は、レベル 2A で陰性である。これらの化学物質について、レベル 2 で陰性結果を確認できるレベル 2B 又は 2C のデータは得られていないものの、骨髄 (レベル 3) では陰性である。我々は、これらの化学物質は肝臓で解毒されるものと考えている。In vitro CA 試験陽性化学物質の、*in vivo* CA (MNT) 試験における運命を調べるための、十分なデータは得られていない。

まとめると、試験の能力という次元を考察することで、Ames 試験陽性でコメットアッセイ (UDS) 陰性という結果から、

代謝的解毒が関係する化学物質の「真の事例」を特定することができたが、CA 陽性／陰性反応は説明できなかつた。

c) Ames 試験陰性化学物質のワークフロー全体でのマッピング

In vitro Ames 試験陰性化学物質の全体の生物学的構造レベルでの運命を図 4 に示している。74 種のレベル 1A 陰性化学物質のうち 28 種のみがレベル 1B でも陰性である。これら 28 種のうち、6 種はレベル 2A で評価されていなかったが、22 種のうち 21 種はレベル 2A で陰性である。これらの化学物質のレベル 3 での運命も同じである。

対照的に、74 種のレベル 1A 陰性化学物質のうち 41 種がレベル 1B で陽性である。CA 試験陽性であることは DNA か蛋白質のいずれかの損傷を示しており、一方、Ames 試験では DNA 損傷のみを評価するため、上記のような結果は予想できるものである。レベル 1A で陰性、かつレベル 1B で陽性の 41 種の化学物質について、in vivo の運命を分析したところ、2 種類のシナリオが得られた。21 種のレベル 1B 陽性化学物質はレベル 2A で陰性で、レベル 1A の結果と同じである。この観察により、図 2 で示している当初開発したワークフローの大きな欠点が明らかになった。試験能力という次元を考慮したとき、CA 試験陽性だがコメットアッセイ陰性というデータから示されたように、これらの化学物質は肝臓での解毒が関わらないことは明白である。

興味深いことに、レベル 1A 陰性であり、レベル 1B とレベル 2A の両方で陽性である化学物質が 15 種確認されている。先に

述べたとおり、コメットアッセイは長鎖の DNA 損傷 (20~30 塩基) を検出する一方、Ames 試験は短鎖の DNA 損傷 (2~3 塩基) を検出するものである。In vitro Ames 試験陰性だが in vivo コメットアッセイ陽性というデータが存在することは、Ames 試験とコメットアッセイの能力が異なることを示している。これらの試験はいずれも DNA 損傷を検出することから、上記の差は損傷の種類に関するものではなく、DNA 損傷の程度に関するものと推察される。これらの化学物質のレベル 2B での運命を解析するデータは得られていないが、レベル 3 で得られている陽性の結果により、これらの化学物質は in vivo 試験全体でも陽性のままである。

まとめると、変異原性陰性 (すなわち解毒) を考察するとき、コメットアッセイは Ames 試験と同等の能力をもっている。しかし、変異原性陽性を考察するときは、コメットアッセイと UDS 試験は Ames 試験よりも CA 試験と類似している。

III-5. 結論

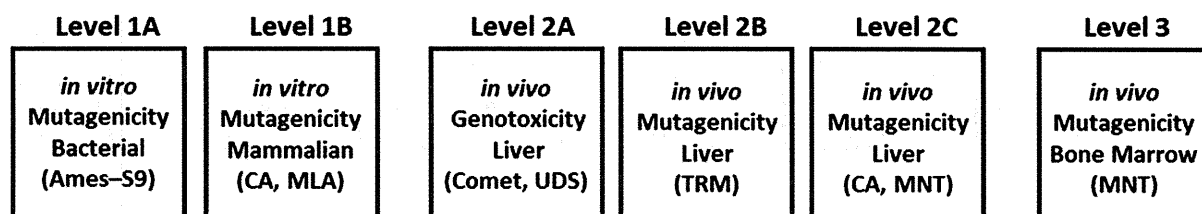
試験の能力を考慮した遺伝毒性の予測は、in vitro と in vivo の効果の差を十分に説明するものとなる。さらにこれは、in vitro と in vivo の遺伝毒性／変異原性に関する明白な SAR モデルを導出する、機構的背景としても用いることができる。我々は、生体分子に対する親化合物又はその代謝物の反応性は、生物学的構造のレベル全体で同じであると想定した。したがって、Ames 試験、コメットアッセイ及び UDS 試験に基づく細菌の変異原性

は、同じ生物分子-DNA ヌクレオチドの相互作用に依存する。一方、CA 及び MN アッセイといった染色体異常試験は、DNA と蛋白質に対する 2 種類の相互作用により条件付けられる。

In vitro と in vivo の作用の基本的な差はバイオアベイラビリティであり、これは主に代謝により制御されている。In vitro と in vivo の代謝活性化は同程度であるが、解毒の作用は in vivo の方が顕著である。したがって in vitro の環境では、親分子とその代謝物への生体分子の曝露は比較的大きい。一方で in vivo の環境では、基質チャネリングとの形成によって曝露がより大きく制限され、多くの場合は解毒パスウェイが解明される。ここに示した予測では、「組織化された」代謝とその後の解毒パスウェイの効果が十分に描かれる。同様に、Ames 試験で陰性の化学物質が、なぜ in vitro CA 試験と in vivo コメットアッセイにおいて陽性になりえるのかを、試験能力の差によって説明した。遠隔の標的臓器（骨髄など）に関連

するその他の効果は、in vitro 及び in vivo の肝臓試験陽性の化学物質が、遠隔組織を用いた in vivo アッセイで陰性になりえる理由を説明することができる。例えば、非常に反応性の高い親化合物又は代謝物はグルタチオンと相互作用し、遠隔標的臓器に達する前に生体外に排出される可能性がある。活性化と解毒の上述のすべての作用は、SAR モデルの作成に利用されるべきである。

試験能力という次元と、in vivo 環境の特異的な特性を考慮した、in vitro と in vivo モデルを用いることで、未知の化学物質の変異原性を評価するための一連のスクリーニング試験を構築できると考えられる。適切な IT 技術（パイプラインテクノロジーなど）を用いることで、ユーザーは、個別の in vitro と in vivo モデルを組み合わせた優先化スキームを柔軟に作成できる。意図するタスクに応じて、ユーザーは同じ又は異なる能力をもつ試験を組み合わせ、試験バッテリーとして構築することができる。



Ames-S9 : 外因性代謝活性化系存在下の細菌遺伝子変異試験、CA : 染色体異常試験、
 MLA : マウスリンフォーマ試験、Comet : コメットアッセイ、UDS : 不定期 DNA 合成、
 TRM : トランスジェニックげっ歯類突然変異試験、MNT : 小核試験

図 1. 試験の能力を考慮した *in vitro* から *in vivo* へのワークフロー

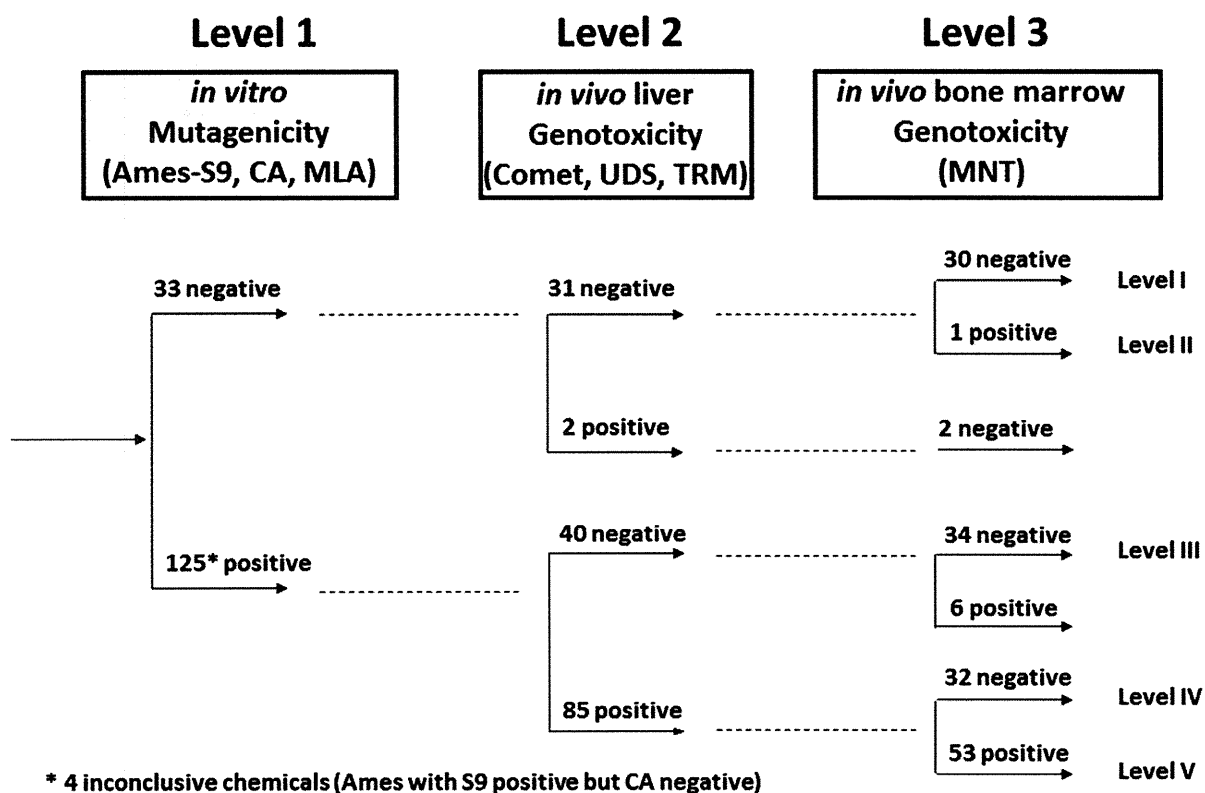


図 2. Mekenyan らによるワークフロー (2012)

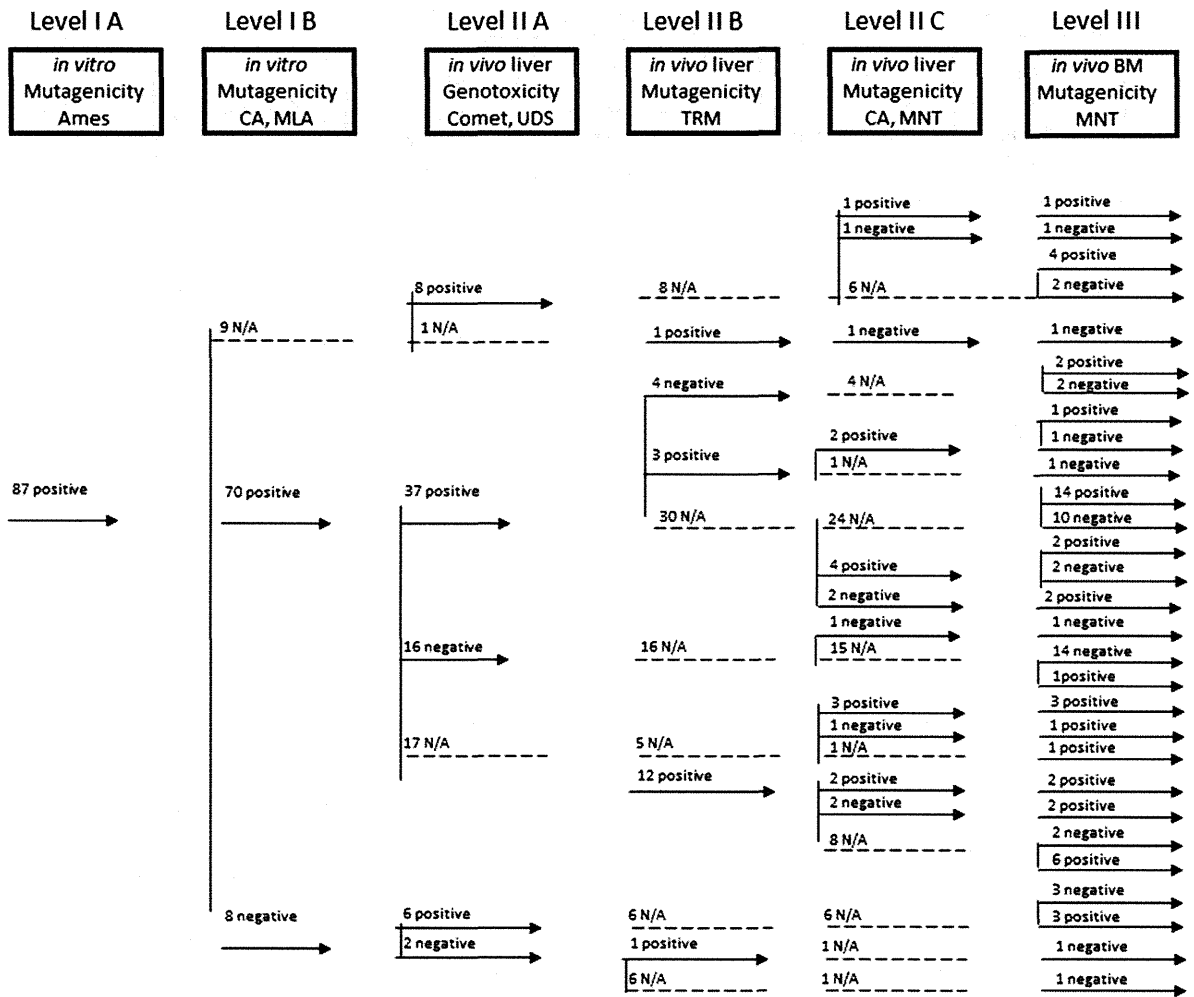


図 3. Ames 試験陽性化学物質のワークフロー全体における結果の内訳