

## I. 微生物試験を用いた発がんリスクの定量的評価手法の構築

### —世界最大規模の Ames 試験データベース構築— (研究分担：山田雅巳)

研究分担者 山田 雅巳 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 第一室長

研究協力者 北澤 愛莉 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 第一室

#### I-1. 研究目的

OECD を初めとしたEU 諸国および米国EPA においては、既存化学物質のリスク管理の目的で、安全性評価未実施の物質を対象にカテゴリーアプローチおよび(定量的)構造活性相関((Q)SAR)の利用が検討されている。特に、医薬品における変異原性不純物の評価には実際に(Q)SARの利用を取り入れたICH M7ガイドラインが整備され2014年7月にweb公開されたことから、一般化学物質のヒト健康リスク評価・管理への適用にも拍車がかかると思われる。

本研究課題では、初年度より(Q)SARソフトによるAmes試験結果の予測精度向上を目的に、我が国で行われたGLP試験データを収集し、遺伝毒性試験の大規模データベースを再構築してきた。本データベースは世界最大規模になると予想され、かつ、信頼性の高いデータベースである。したがって、そこから抽出される遺伝毒性アラートは、遺伝毒性の予測精度の向上および、QSARモデルの開発に大いに貢献できると期待される。

#### I-2. 研究方法

##### (1) Ames試験データベースの再構築：

労働安全衛生法 第五十七条の三 第一項では、新規化学物質を製造もしくは輸入し

ようとする事業者には、あらかじめその有害性の調査を義務付け、物質名称と共に調査結果の届け出を義務付けている。有害性の調査はAmes試験の実施による。現在までに、20,000を超える化学物質が届け出られており、その中で、強い変異原性を示すとされた物質(平成27年4月時点：新規化学物質831物質、既存化学物質169物質)は厚生労働省ホームページの関連サイト(<http://anzeninfo.mhlw.go.jp/user/anzen/kag/ankgc02.htm>)にその名称が公開されている。今年度は、厚生労働省 労働基準局 安全衛生部 化学物質対策課より昨年度入手した、現在までにAmes試験が実施された化学物質の情報(物質名称と試験結果(陽性、陰性等の判定))の、データベース作成ソフトJChemへの入力を終了した。

##### 【精査手順】

労働安全衛生法による届け出のあった化学物質には、混合物・ポリマーなども含まれている。構造活性相関はあくまでも化学物質の構造に基づく予測を行うので、そのような、「構造式が特定できない物質」は、Ames試験結果があっても対象にならない。また、構造情報を得るために有用なCAS番号の情報がない物質が約半数であったことから、CAS番号の有無による振り分けが必要になった。それに付随して、CAS番号が

正しいものであるかどうかの確認作業も発生した。さらに、Ames試験結果（判定）は基本的に3種類（陰性・陽性〈強いものとそうでないもの〉）だが、中には判定が保留

になっているもの、データが2つあって判定が一致しないものも含まれていた。以上を踏まえ、以下のフローチャート（図1）で入手したデータを精査した。

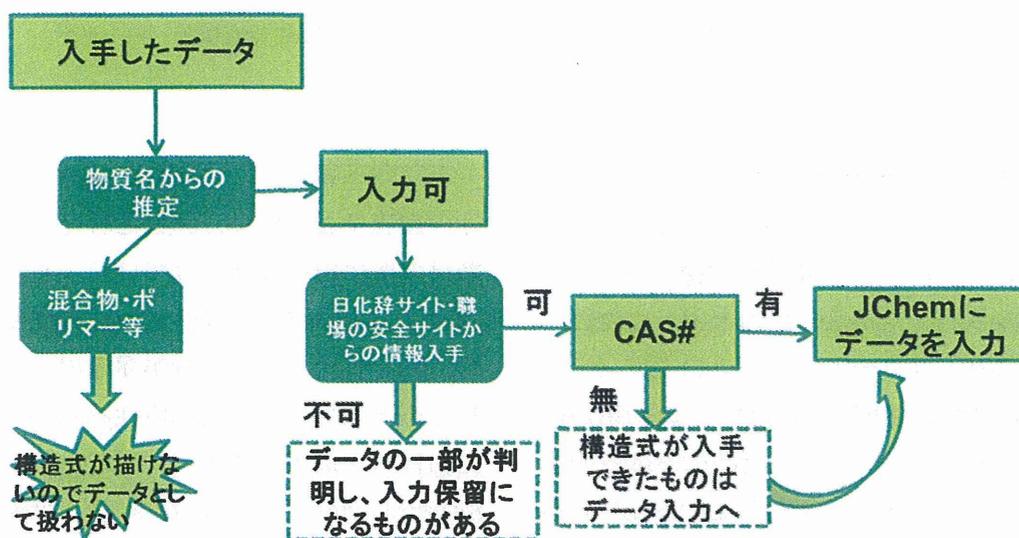


図1 20,761化合物のデータの振り分けフローチャート

### I-3. 研究結果及び考察

#### (1) Ames試験データベースの再構築

図1のフローチャートに沿って振り分けたデータの数は以下のとおり。

- ・ 入手したデータ数：20,761
- ・ 構造式が描けないと判断したデータ数：7,257（混合物・ポリマー等）
- ・ 入力済み：12,692（CAS#有：7,972 / CAS#無：4,990）
- ・ 入力保留中のデータ数（CAS#に関わらず）：467
- ・ 重複しているデータ数（CAS#に関わらず）：75

入力データの中で、陽性判定物質（表1、内

訳AとB）の割合は約14%で、そのうち3分の1が強い陽性（表1、内訳A）とされるものであった。陰性判定物質（表1、内訳C）は86%である。

図2は、JChemに入力したデータベースの一部を示すものである。左端カラムのSerial\_Idにより7,058の物質が特定できる。resultのカラムはAmes試験結果の判定（陽性、陰性の別、及び、陽性の程度）を示す。ANEI\_No.は官報公示番号を示している。SMILES (Simplified molecular input line entry specification syntax) は、化学構造 (Structure) をASCII符号の英数字で文字列化した表記方法であり、多くの種類の分子エディタでインポート可能であるため、付記している。SMILESを入力することで

QSARソフトに構造式が自動的に入力できる。Chemical\_Nameは英語表記と日本語表記があるが、適用するソフトウェアは海外製が多いため、英語表記を使用した。

入力データの総数は約 2 万である。データを公開し QSAR ソフト精度向上のための国際共同研究を開始した。

#### I-4. 結 論

Ames データベースの再構築を終了した。

表1 有害性の調査が実施された物質

20,761	未入力物質(ポリマー、有機金属、縮合物等)	入力済み	内訳	入力保留	重複除外
総数	7,257	12,962	A: 652 B: 1161 C: 11149	467	75
CAS#有	1,811	7,972	A: 396 B: 721 C: 6855	263	63
CAS#無	5,446	4,990	A: 256 B: 440 C: 4294	204	12

Serial Id	Rebut	ANEI No.	CAS#	SMILES	Structure	Chemical Name
73		4-(7)-1305	66391-42-4	[O-][N+](=O)c2ccc(N=Nc1ccc(N)ccc1)cc2		2-[(2-Cyanoethyl)(4-[(E)-4-nitrophenyl]oxazonyl]phenylaminoethylacetate
75	A					1,3-Bis(4,5-dihydro-2-oxazolyl)benzene
76	B		34052-90-9	C1COO(N1)C2=CC=CC=C2)C3=NC		1,3-Bis(4,5-dihydro-2-oxazolyl)benzene
70						1,2-dihydroxypropylbis(2-cyanoethyl)amine
77	C		90327-04-1	CC(C)C(C1=CC(C)=CC1)C(C)C1=CC=C1		1-(2-Hydroxy-3,5-dimethylphenyl)-1-(2-benzoyloxy-3,5-dimethylphenyl)-3,5,5-trimethylhexane

図2 JChemソフトで作成したAmes試験データベースの一部

表2 データベース再構築に用いたデータのソース別総数一覧 (2015年4月17日現在)

データ名称	データ出典	データ入手総数	重複を除いた数*
Ames_DB903	<ul style="list-style-type: none"> <li>労働安全衛生法に基づき実施された変異原性試験結果</li> <li>医薬品関連情報</li> <li>既存化学物質毒性データベース</li> <li>微生物を用いる変異原性試験データ集</li> </ul>	903	903
labor	労働安全衛生法に基づき実施された変異原性試験結果	20,761	12,962**
Kasinhou	化審法 審査シート	379	379
food	食品安全委員会 評価書	104	104
JECFA	Food and Chemical Toxicology, 50, 1538-1546 (2012) 掲載分	367	283
Hansen	J. Chem. Inf. Model., 49, 2077-2081 (2009) 掲載分	6512	5978
合計		29,015	20,609

\*AmesDB903、Kasinhou、foodの間で重複は無く、重複があった物質のデータは国内>JECFA>Hansenの順で計数しているため、JECFAとHansenの数が入手総数から減っている

\*\*未入力を除いた数

## II. *In vivo* 遺伝毒性試験の発がん物質検出性との関連

(研究分担：森田健)

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  
研究協力者 増村 健一 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第三室室長  
研究協力者 小宮佐知子 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部第四室

### II-1. 研究目的

(定量的)構造活性相関 (QSAR) による染色体異常誘発性の予測においては、これまで、哺乳類培養細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験 (CA) の試験最高濃度の低減化の影響を検討し、一般化学物質に対する影響は、その分子量の大きさから極めて小さいことを示してきた。一方、染色体異常誘発性については、*in vitro* 試験では陽性を示すものの *in vivo* 試験では陽性が示されないケースも多く知られている。そのため、より精度の高い染色体異常予測率を示す QSAR モデルの構築には、*in vivo* 試験の発がん物質検出性を評価し、*in vitro* と *in vivo* のギャップの要因を検証することが必要と考えられる。ここでは、*in vivo* 染色体異常誘発性として赤血球小核試験 (骨髄あるいは末梢血) を選択し、*in vivo* 小核試験 (MN) の齧歯類発がん物質に対する感受性ならびに非発がん物質に対する特異性を検証した。加えて、トランスジェニック齧歯類による *in vivo* 遺伝子突然変異試験 (TG) についても同様の検証を行い、Ames 試験を含めた遺伝毒性 QSAR モデルの予測率の向上に資することとした。

### II-2. 研究方法

#### 2.1. 使用データベース

カークランドらによる発がん性・遺伝毒性データベース (CGX DB、ver. 2、2007 年4月、<http://www.lhasalimited.org/cgx.htm>) を用いた。CGX DBは、756の齧歯類発がん物質と183の非発がん物質について、4種の *in vitro* 遺伝毒性試験情報 (Ames, MLA, *in vitro* MN, *in vitro* CA) が収録されている。

#### 2.2. *In vivo* 遺伝毒性データの検索

*In vivo* MNに関するレビュー論文あるいは大規模試験報告書、EUリスク評価書や OECD SIDS文書などの国際的化学品評価文書、US NTPのデータベースサーチ、ならびにPubMed文献サーチを用いた (表1)。また、*in vivo* TGについては、OECDのレビュー文書 (Detailed review paper on transgenic rodent mutation assays, Series on testing and assessment, Number 103, OECD, Paris, July 23, 2009. ENV/JM/MONO(2009)7, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)7&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)7&doclanguage=en)) および食品添加物の遺伝毒性試験報告書 (厚生労働省、2008~2012年、非公表) を用いた。

#### 2.3. データの評価

*In vivo* MNの結果はCGX DB (2005年版)における記載に基づき以下の3つに分類した。すなわち、+ : 陽性、- : 陰性、およびE (equivocal) : 反応が弱いものや、試験間あるいは試験施設間での再現性が認められないなどの、あいまいな結果。また、*in vivo* TGの結果は、以下の4つに分類した。すなわち、+ : 少なくとも1つの発がん標的部位で陽性、- : TGで評価したすべての発がん標的部位で陰性、na (+) : TGで陽性だが発がん標的部位ではない、na (-) : TG陰性だが発がん標的部位ではない。なお、*in vitro*試験結果については以下を追加した。すなわち、TC (technically compromised) : 試験の適切性において、本質的な基準的規範に適合していないことなどにより試験結果に疑問がある(技術的問題点あり、CGX DBの記載による)および + at >10 mM : 10 mM超の濃度での陽性(*in vitro* CAのみで評価、最終判断は陰性評価(-))。なお、+ at >10 mM (10 mM超の濃度での陽性)の知見は、昨年度までの研究成果<sup>2)</sup>に基づいた。すなわち、CGX DB (2005年版)で*in vitro* CA陽性と評価された19物質(10発がん物質および9非発がん物質)は、10 mMを超えての陽性知見であったため、本解析では陰性と評価した。

## II-3. 研究結果

### 3.1. 収集された*in vivo*遺伝毒性試験データ

CGX DB記載の939物質(発がん物質756、非発がん物質183)について認められた*in vivo*遺伝毒性試験データは、*in vivo* MNにおいては379物質(発がん物質293、非発がん物質86)であり、うち、発がん物質およ

び非発がん物質について、それぞれ陽性が120および22物質、陰性が163および52物質、あいまいが10および12物質であった(表2)。また、*in vivo* TGにおいては78物質(発がん物質74、非発がん物質4)であり、非発がん物質のデータは極めて少なくそれらはすべて陰性であった。74の発がん物質について陽性(na(+))を含むが54物質、陰性(na(-))を含むが20物質であった(表3)。

*In vivo* MNにおける特記すべき個別物質の評価は以下のとおり :

#### 発がん物質

- C179, Chlorpromazine hydrochloride  
低体温による陽性知見とされている。
- C197, C.I. Sovent yellow 3 (o-aminoazotoluene)  
マウスの陽性知見に基づいたが、ラットでは陰性であり、種差が認められた。
- C246, 1,2-dibromoethane  
本物質は液体であるが、経口投与では陰性だが吸入曝露では陽性であり、妥当性評価が困難であることからE (equivocal、あいまい)とした。
- C285, 3,3'-dimethoxybenzidine 2HCl  
遊離塩基(119-90-4)の陰性知見に基づいた。
- C378, Haloperidol  
マウスでは低体温による陽性知見とされている。ラットでは陰性知見がある。
- C466, 4,4'-methylenedianiline 2HCl  
本物質についての陽性知見に基づいたが、遊離塩基(101-77-9)については陰性とされている。
- C478, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyrridyl)-1-(butanone) (NNK)  
陰性と陽性の知見がそれぞれ1つずつあり、

妥当性評価が困難であることからEとした。

● C509, Nitrite, sodium

陰性と陽性の知見がそれぞれ1つずつあり、妥当性評価が困難であることからEとした。なお、OECDのSIDSでは陽性と評価している。

● C631, Phenylhydrazine HCl

遊離塩基 (100-63-0) の陽性知見に基づいた。

● C691, 1,1,2,2-tetrachloroethane

長期投与によるマウス赤血球における陽性知見に基づいた。

● C711, o-Toluidine

ラットの陽性知見に基づいたが、マウスで陰性であり、種差が認められた。

非発がん物質

● NC8, dl-Amphetamine sulfate

遊離塩基 (300-62-9) の陽性知見に基づいた。

● NC52, 2,6-Diaminotoluene.2HCl

カークランドらの総説3)での評価に基づきEとしたが、遊離塩基 (823-40-5) を用いた最近の試験における陰性知見がある。

● NC73, EDTA, trisodium salt trihydrate

disodium salt (6381-92-6) の陰性知見に基づいた。

● NC91, Fluoride, sodium

総説3)での評価は単一の試験に基づき陽性 (+) だが、別の試験における陰性知見が認められたため、Eとした。

● NC138, Phenol

低体温による陽性知見とされている。

● NC151, Propyl gallate

総説3)での評価は単一の試験に基づき陽性

(+) だが、別途陽性知見1件、陰性知見2件が認められたため、Eとした。

また、*in vivo* TGにおいてna (+) (TGで陽性だが発がん標的部位ではない) とされた6物質ならびにna (-) (TG陰性だが発がん標的部位ではない) とされた4物質 (計10物質、いずれも発がん物質) の評価対象臓器は以下のとおり：

na (+) (TGで陽性だが発がん標的部位ではない)

● C16, Acrylamide

骨髄で陽性だが、肝臓および精巣生殖細胞で陰性

● C244, 1,2-dibromo-3-chloropropane

精巣で陽性だが、肝臓で陰性

● C340, Ethyl methanesulphonate

骨髄精巣上体精子および肝臓で陽性だが、脳および小腸で陰性

● C457, 3-methylcholanthrene

肝臓で陽性

● C492, Mitomycin C

骨髄および肝臓で陽性だが、小腸および精巣で陰性

● C702, Thio-tepa

脾臓リンパ細胞で陽性

na (-) (TG陰性だが発がん標的部位ではない)

● C17, Acrylonitrile

骨髄、脳、肺および脾臓リンパ細胞で陰性

● C257, 1,2-dichloroethane

肝臓および精巣で陰性

● C489, Metronidazole

胃で陰性

● C683, SX Purple

肝臓および胃で陰性

### 3.2. 感受性・特異性解析

*In vivo* MNの発がん性に対する感受性、特異性および一致性を表4に示す。E (Equivocal) を陽性にも陰性にも計数しなかった場合、感受性は41.0% (120/293)、特異性は60.5% (52/86) であり、一致性は45.4% (172/379) で良好といえるものではなかった。一方、*in vivo* TGの発がん性に対する感受性は、na(+)を陽性、na(-)を陰性に加えた場合、72.9% (54/74) と比較的高いものであった(表4)。なお、*in vivo* TGにおいては、非発がん物質に対するデータが合計4件と極めて少なかったため、特異性ならびに一致性については計算しなかった。

また、Amesと*in vivo* MNを組合せた場合の感受性および特異性をそれぞれ表5および表6に示した。発がん物質についてAmesと*in vivo* MNの両試験を実施して、少なくとも1つの試験で陽性となる感受性は68.7%で、カークランドらが2005年に報告1)したAmesと他の*in vitro*試験(MLA, MN, CA)との組合せによる感受性の75.3%~81.0%に比べると低かった。一方、非発がん物質についてAmesと*in vivo* MNの両試験を実施して、両方の試験で陰性となる特異性は45.3%で、Amesと他の*in vitro*試験(MLA, MN, CA)との組合せによる特異性の12.0%~34.6%に比べると高かった。

### 3.3. *In vitro* - *in vivo* 間の比較

CGX DBでは*in vitro* MNのデータが記載されているが、発がん物質に対する試験データ数は89件であり、*in vitro* CAの352件に比べ圧倒的に少ない。そこで、*in vivo*

MNに対する染色体異常を指標とする*in vitro*試験との比較においては*in vitro* CAを選択した。*In vivo* MNと*in vitro* CAの一致性を発がん物質については表7に、非発がん物質については表8に、両物質を合計した場合については表9に示した。*In vivo* MNと*in vitro* CAの一致性、すなわち両試験結果共に陽性あるいは陰性を示したのは、発がん物質では53.2% (118/222)、非発がん物質では37.3% (28/75) であり、発がん物質に対する一致性の方が高かった。両物質を合計した場合の一致性は49.2% (146/287) であった。また、CGX DBでは遺伝子突然変異を指標とする*in vitro*試験として、哺乳類細胞を用いたMLAのデータが記載されているが、MLAは染色体異常誘発性をも検出可能な試験系であることから、細菌を用いた系ではあるが、Ames試験を*in vivo* TGの対照*in vitro*試験として選択した。*In vivo* TGとAmesの一致性を発がん物質および非発がん物質を合計して表10に示した。評価対象物質数は*in vivo* MNと比べ少ないものの、高い一致性(78.4%、58/74)を示した。

## II-3. 考察

CGX DBによる756の齧歯類発がん物質と183の非発がん物質について、*in vivo* MNと*in vivo* TGのデータを収集・解析した結果、*in vivo* MNでは379物質の、*in vivo* TGでは78物質の知見が得られ、*in vivo* MNの感受性は41.0%で、特異性は60.5%、*in vivo* TGの感受性は72.9%であることが判明した。なお、非発がん物質に対する*in vivo* TGのデータは極めて少なかったため、*in vivo* TGの特異性評価は行わなかった。また、

Amesと*in vivo* MNを組合せた場合の感受性は68.7%で、特異性は45.3%であった。*In vivo* MNの感受性(41.0%)は*in vitro*試験(Ames 58.8%、MLA 73.1%、MN 78.7%、CA 65.6%)と比較して低いものであったが、一方、特異性(60.5%)はAmesに次いで高いものであった(Ames 73.9%、MLA 39.0%、MN 30.8%、CA 44.9%)。ICHにおける医薬品の遺伝毒性試験の組合せにおけるオプション2(Amesおよび2種の*in vivo*試験、1種は通常*in vivo* MN)において検討される可能性のあるAmesと*in vivo* MNの組合せによる感受性(68.7%)は*in vitro*試験同士の組合せ(Ames+MLA 81.0%、Ames+MN 85.9%、Ames+CA 75.3%、MLA+MN 87.0%、MLA+CA 81.3%)と比較すると低かったが、特異性(45.3%)は高かった(Ames+MLA 32.4%、Ames+MN 12.0%、Ames+CA 34.6%、MLA+MN 10.0%、MLA+CA 27.1%)。このことは、2つ目の*in vivo*試験を適切に選択すれば、発がん物質あるいは*in vivo* 遺伝毒性物質を偽陽性なく的確に検出できることを示しており、オプション2の妥当性が傍証された。*In vivo* TGの感受性(72.9%)はAmes(58.8%)よりも高く、偽陽性が多いとされる*in vitro*哺乳類細胞試験(65.6%~78.7%)と同程度であった。*In vivo* - *in vitro*比較においては、*in vivo* MNと*in vitro* CAの一致性を検証した。発がん物質に対する両試験の一致性は53.2%、非発がん物質に対しては37.3%で、発がん物質と非発がん物質を統合すると49.2%であった。また、発がん物質と非発がん物質を統合した場合の*in vivo* TGとAmesの一致性は78.4%で、高かった。今後、*in vivo* MNと*in vitro* CAにおける一致性の低さの

要因(*in vitro* CAにおける反応の代謝活性化系の有無や*in vivo* MNの曝露経路の妥当性などを含む)あるいは化学物質群に対する特性等を解明することにより、より精度の高いQSARの開発につながるものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) D. Kirkland, M. Aardema, L. Henderson, L. Müller, Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutat. Res.* 584 (2005) 1-256.
- 2) T. Morita, A. Miyajima, A. Hatano, M. Honma, Effects of the proposed top concentration limit on an *in vitro* chromosomal aberration test to assay sensitivity or to reduce the number of false positives, *Mutation Research* 769 (2014) 34-49.
- 3) Kirkland D, Reeve L, Gatehouse D, Vanparys P. A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins. *Mutat Res*, 721 (2011), 27-73.

表1 *In vivo*小核試験データの収集に用いた主な資料

<p><b>レビュー論文</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <u>Mavournin et al (1990)</u> The <i>in vivo</i> micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. <u>Mutat Res.</u> 239, 29-80.</li> <li>➤ <u>Kirkland et al (2008)</u> Recommended lists of <u>genotoxic</u> and <u>non-genotoxic</u> chemicals for assessment of the performance of new or improved <u>genotoxicity</u> tests: a follow-up to an ECVAM workshop. <u>Mutat Res.</u> 653, 99-108.</li> <li>➤ <u>Kirkland et al (2008)</u> Evaluation of the ability of a battery of three <i>in vitro</i> <u>genotoxicity</u> tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing <i>in vivo</i>. <u>Mutat Res.</u> 654, 114-132.</li> <li>➤ <u>Kirkland et al (2011)</u> A core <i>in vitro</i> <u>genotoxicity</u> battery comprising the Ames test plus the <i>in vitro</i> micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and <i>in vivo</i> <u>genotoxins</u>. <u>Mutat Res.</u> 721, 27-73.</li> </ul> <p><b>大規模試験報告書</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <u>Shelby et al (1993)</u> Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. <u>Environ Mol Mutagen</u>, 21, 160-179.</li> <li>➤ <u>Morita et al (1997)</u> Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B). The summary report of the sixth collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. <u>Mutat Res.</u> 389, 3-122.</li> <li>➤ <u>Wakata et al (1998)</u> Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. <u>Environ Mol Mutagen</u>. 32, 84-100.</li> <li>➤ <u>Witt et al (2000)</u> <u>Micronucleated</u> Erythrocyte Frequency in Peripheral Blood of B6C3F1 Mice from Short-Term, <u>Prechronic</u>, and Chronic Studies of the NTP Carcinogenesis Bioassay Program. <u>Environ. Mol. Mutagen</u>. 36, 163-194.</li> <li>➤ <u>Hamada et al (2001)</u> Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: Summary of the 13th collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). <u>Environ Mol Mutagen</u> 37, 93-110.</li> </ul> <p><b>国際的化学品評価文書</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ EU RAR: EU RAR Search, <a href="http://esis.jrc.ec.europa.eu/index.php?PGM=ora">http://esis.jrc.ec.europa.eu/index.php?PGM=ora</a></li> <li>➤ SIDS: SIDS Search, <a href="http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/sidspub.html">http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/sidspub.html</a> OR ↓ OECD Existing Chemicals Database Search, <a href="http://webnet.oecd.org/hpv/UI/Search.aspx">http://webnet.oecd.org/hpv/UI/Search.aspx</a></li> <li>➤ EHC, CICAD, IARC: IPCS INCHEM Search, <a href="http://www.inchem.org/">http://www.inchem.org/</a></li> </ul> <p><b>NTP データサーチ</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ NTP Database Search Home Page, <a href="http://tools.niehs.nih.gov/ntp_tox/">http://tools.niehs.nih.gov/ntp_tox/</a></li> </ul> <p><b>PubMed 文献サーチ</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ PubMed: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a> (検索語: CAS 番号あるいは化学物質名、<u>micronucle*</u>, rodent)</li> </ul>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

表 2 CGX DB 収載物質における *in vivo* MN データの要約 (n=379)

化学物質	物質数				計
	陽性 (+)	陰性 (-)	あいまい (E)	データなし	
発がん物質	120	163	10	463	756
非発がん物質	22	52	12	97	183
計	142	215	22	559	939

表 3 CGX DB 収載物質における *in vivo* TG データの要約 (n=78)

化学物質	物質数				データなし	計
	陽性 (+)	陽性 (na(+))	陰性 (-)	陰性 (na(-))		
発がん物質	48	6	16	4	682	756
非発がん物質	0	0	4	0	179	183
計	48	6	20	4	861	939
計	54		24		861	939

表 4 各 *in vivo* 遺伝毒性試験の感受性、特異性の要約 a

発がん性	in vivo MN				in vivo TG		
	+	E	-	計	+ <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	計
+	120	10	163	293	54(6)	20(4)	74
-	22	12	52	86	0	4	4
感受性	41.0% (120/293)				72.9% (54/74)		
特異性	60.5% (52/86)				計算せず		
一致性	45.4% (172/379)				計算せず		

a: E (Equivocal、あいまい) は、総数には含むが、陽性、陰性いずれにも計数していない

b: na(+) を含む (n=6)

c: na(-) を含む (n=4)

表5 Ames と *in vivo* MN の組合せによる齧歯類発がん物質の検出性 (感受性)

Ames	in vivo MN			計
	+	E	-	
+	79	5	74	158
E	2	0	2	4
-	33	4	82	119
計	114	9	158	281

Ames + in vivo MN

両試験で試験した発がん物質数(A): 281

両試験での陽性物質数(B): 79(28.1%)

両試験の1つのみでの陽性物質数(C): 114(40.6%)

感受性(両試験を実施して少なくとも1つの試験で陽性)  $([B+C]/A)$ : 68.7%

表6 Ames と *in vivo* MN の組合せによる非齧歯類発がん物質の検出性 (特異性)

Ames	in vivo MN			計
	+	E	-	
+	6	2	11	19
E	1	1	2	4
-	15	9	39	63
計	22	12	52	86

Ames + in vivo MN

両試験で試験した非発がん物質数(A): 86

両試験での陰性物質数(B): 39

特異性(B/A): 45.3%

両方の試験であいまい(E)、あるいは1つの試験であいまいでかつもう1つの試験で陰性の非発がん物質数(C): 12

Eを陰性とした場合の特異性上限  $([B+C]/A)$ : 59.3%

表 7 発がん物質に対する *in vivo* MN と *in vitro* CA の一致性 <sup>a</sup>

in vitro CA	in vivo MN			計
	+	E	-	
+	70	5	70	145
E	1	0	7	8
-	19	2	48	69
計	90	7	125	222
一致性	53.2% (118/222)			

a: E (Equivocal、あいまい) は、総数には含むが陽性、陰性いずれにも計数していない

表 8 非発がん物質に対する *in vivo* MN と *in vitro* CA の一致性 <sup>a</sup>

in vitro CA	in vivo MN			計
	+	E	-	
+	8	6	20	35
E	2	0	6	8
-	10	3	20	32
計	20	9	46	75
一致性	37.3% (28/75)			

a: E (Equivocal、あいまい) は、総数には含むが陽性、陰性いずれにも計数していない

表 9 発がん物質および非発がん物質に対する *in vivo* MN と *in vitro* CA の一致性 <sup>a</sup>

in vitro CA	in vivo MN			計
	+	E	-	
+	78	12	90	180
E	3	0	13	16
-	29	4	68	101
計	110	16	171	297
一致性	49.2% (146/297)			

a: E (Equivocal、あいまい) は、総数には含むが陽性、陰性いずれにも計数していない

表 10 発がん物質および非発がん物質に対する Ames 試験と *in vivo* TG の一致性 <sup>a</sup>

Ames	in vivo TG		計
	+ <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	
+	46 (5)	10 (3)	56
E	1 (1)	0	1
-	5	12	17
計	52	22	74
一致性	78.4% (58/74)		

a: E (Equivocal、あいまい) は、総数には含むが陽性、陰性いずれにも計数していない

b: na(+)を含む(n=6)

c: na(-)を含む(n=3)

### 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）

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	P. Petkov	ブルガス大学数学化学研究室

#### III-1. 研究目的

がん原性は毒性学的エンドポイントの 1 つであり、特に高い関心が持たれる。その一方、がん原性の評価に用いられるげっ歯類によるバイオアッセイを実施すると、時間、金額、動物数に関する損失が大きい。そのため、がん原性では、遺伝毒性によるがん原性について予測可能な（本質的に *in vitro* と *in vivo* の両者における）短期試験（STT）の開発を目的とする多くの取り組みが行われてきた。利用可能な遺伝毒性試験により、ヒトのがん、または DNA 損傷に基づく遺伝毒性作用を導く物質については、がん原性の評価が容易になる。このような遺伝毒性試験データは、規制および化学物質管理の目的から、物質の危険有害性の特定とリスク判定の双方に用いられる。

遺伝毒性に関する危険有害性の特定は主に *in vitro* 試験に依拠し、既存の文献や SAR/QSAR の事前スクリーニングを最初に検討後、細菌および哺乳類細胞における物質の変異原性を判定する。物質の遺伝毒性の指標は、DNA 損傷、DNA 鎖切断または DNA 付加体の形成などインディケーター試験結果の評価により得られることもあ

る。*In vivo* 試験は遺伝毒性のさらなる評価に用いられ、通常は *in vitro* における観察結果の確認のため実施される。

変異原性の作用機序が複雑であることを考慮すると、化学物質の遺伝毒性判定において頑健性を得るには、多数の各種試験を必要とする。そのため、化学物質の変異原分類、またはがん原性の評価へのさらなる取り組みの両観点から、変異原性の評価に関する戦略を検討する取り組みが多数行われてきた。実際の遺伝毒性試験は、通常 3 段階の試験体系の一部として用いられてきた。すなわち、段階 I の微生物を用いた *in vitro* 試験法に続き、段階 II の体細胞を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験法では、先行する *in vitro* 試験陽性の化学物質を対象に、*in vivo* での生物学的関連性が判定される。段階 III の *in vivo* 試験法は、生殖細胞を用いる試験および *in vivo* 世代間試験からなると考えられる。最もよくみられる遺伝毒性バッテリー試験法には、遺伝子突然変異（すなわち、単一遺伝子または一群の遺伝子に影響を及ぼす点突然変異）、染色体異常誘発性（すなわち、染色体構造異常）、異数性（すなわち、染色体の数的異常）の測定試験が挙げられる。実際に、米国環境保護庁（US

EPA) のバッテリー試験は 3 段階の体系であり、段階 I の遺伝子突然変異に関する細菌復帰突然変異試験(例えば、Ames 試験)、段階 II の哺乳類細胞を用いる *in vitro* 遺伝子突然変異試験(例えば、マウスリンフォーマ試験)が挙げられ、また段階 III は哺乳類の骨髄を用いる *in vivo* 染色体異常試験か、赤血球を用いる *in vivo* 小核試験のいずれかからなる。また、日本の国立医薬品食品衛生研究所 (NIHS) は、同様の試験実施戦略を用いている。*In vitro* 遺伝毒性試験に関する結果が陽性であり、化学物質に対する内因性の遺伝毒性活性が立証されても、この結果は極端な条件下であることが多いため、*in vivo* 遺伝毒性と関連性がない場合がある。

結果として、*in vitro* 試験(特に染色体異常試験)により「不適切な陽性」という結果が高頻度で検出されても、*in vivo* 試験による追跡では確認されないように思われる。予測能向上の取り組みの中で、戦略的な試験法が統合的試験戦略 (integrated test strategy; ITS) の形で確立された。ITS の目的は、すべての科学関連情報の使用を最大化し、可能であれば動物による試験法の使用を回避することであり、REACH 技術ガイダンス (REACH Technical Guidance、欧州化学物質庁 (ECHA)、2013 年) 記載の ITS はその好例である。

さらに最近、分子起始反応 (MIE)、介在する重要事象 (KE)、規制上懸念される有害転帰 (AO) の 3 者間の因果関係に関する情報を提供する有害性転帰経路 (Adverse outcome pathway; AOP) の枠組みが開発され、これは規制に関する意思決定に用いる (ITS を包含する) 試験法と評価のため

の統合アプローチ (integrated approaches to testing and assessment; IATA) 開発促進の生物学的な背景となっている。IATA は、危険有害性の特定、危険有害性の特徴付け、および/または単一化学物質または一群の化学物質の安全性評価のため、各種データの統合および重み付けを行う体系化された手法である。

これまで我々は、各種短期遺伝毒性試験を共に関連付ける手段として *in vitro*、*in vivo* における外挿のワークフローを導入した。本ワークフローは、新たな TIMES モデルの開発促進、および戦略的試験法志向の方法として、生物学的組織に対する試験の順番を基準とする。また、肝臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験、骨髄を用いる *in vivo* 小核試験の 2 つの(Q)SAR モデルが開発された。その実行では、*in vitro* および *in vivo* 試験系間の代謝の差異を明らかにするなど、複数の難問が顕著になった。ワークフローは 3 ステップ構造からなり、ステップ 1 では *in vitro* 変異原性試験の結果に基づき、化学物質を陽性または陰性のカテゴリーに細分した。ステップ 2 では肝臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性試験の結果に基づき同様のカテゴリー化が行われ、ステップ 3 は骨髄を用いる *in vivo* 小核形成結果が基準とされた (Mekenyan ら、2012 年)。最終的な結果は 5 段階レベルの枠組みに分類され、3 ステップの生物学的組織の結果が 3 つ同時に陰性であればレベル 1、結果が 3 つ同時に陽性であればレベル 5 とした。

AOP の開発および AOP の情報に基づく IATA に関する最近の取り組みを踏まえ、本研究では各試験系の機械論的な基準 (試験の能力) を因子にすることにより、*in vitro*、

*in vivo*における外挿のワークフローの精緻化を開始した。その目的は機械論的な情報に基づく IATA の作成とし、IATA の要素は試験の能力に基づいてグループ化された各種 STT とした。次に、IATA の結果を適用し、化学品の分類および表示に関する世界調和システム (GHS) の変異原性カテゴリーに従って、一連の試験による genotoxic carcinogens の分類について予測した。

### III-2. 研究方法および材料

本研究の最初の部分では、これまで発表の一環として収集された 162 種類の化学物質のデータセット (Mekenyan ら、2012 年) に依拠した。これらの物質について入手可能なデータは、それぞれの試験の能力に従ってカテゴリー化した。組織に対する精緻化されたレベル全体の試験結果について、試験の能力を踏まえて再検討した。

データセットの対象とする試験系は、以下の試験タイプ由来とした。

- ・ 復帰突然変異検出のため、アミノ酸要求性の複数の細菌株を用いる細菌復帰突然変異試験 (Ames 試験) (OECD TG 471)
- ・ 染色体の構造異常および数異常を検出する哺乳類の染色体異常試験 (OECD TG 473)
- ・ 遺伝子突然変異および染色体構造異常を検出するマウスリンフォーマ試験 (OECD TG 476)
- ・ 肝細胞を用いる不定期 DNA 合成 (UDS) (OECD TG 486)
- ・ アルカリ単細胞ゲル電気泳動法 (コメットアッセイ) (現時点で OECD TG なし; 国際的な同意が得られたプロトコールが入手可能 (Olive and Banath (2006 年) 参

照))

- ・ トランスジェニックげっ歯類突然変異試験 (OECD TG 488)
- ・ マウス肝細胞を用いる *in vivo* 小核試験 (現時点で OECD TG なし; 国際的な同意が得られたプロトコールが入手可能 (Cllet ら、1989 年参照))
- ・ 骨髄小核試験 (OECD TG 474)

IATA の結果を、世界調和システム (GHS) の変異原性カテゴリー (GHS、2013 年) に従って実際に遺伝毒性化学物質の分類に適用するため、一連の試験による 214 種類の化学物質を OECD QSAR Toolbox v3.2 の ISSCAN v4a データベースから収集した。本データベースは、OECD QSAR Toolbox v3.2 で入手可能なデータベースから重複する遺伝毒性/がん原性データを抽出したことにより補完された。ISSCAN データベースはイタリア高等保健研究所 (Istituto Superiore di Sanita) のウェブサイトからも自由に入手可能である。

ISSCAN データベースには、がん原性に関する情報およびがん原性に関する判定の要約が含まれており、がん原性データベース (Carcinogenic Potency DataBase : <http://potency.berkeley.edu/cpdb.html>) から得られる。がん原性は、ラットおよびマウスを用いて測定される TD50 値に基づいて評価される。TD50 は、投与量がゼロであったら腫瘍を発生しなかったと考えられる供試動物を対象に、その半数に腫瘍を誘導する一生を通じた 1 日あたりの投与量の割合で、mg/kg 体重/日を単位とする。報告される TD50 値は、ラットおよびマウスの各実験結果が陽性の場合から得られた最も強力な TD50 値の調和平均である。本研

究では、化学物質に関するがん原性の結果の要約に不一致という結果（すなわち、陰性と陽性の両結果が混在）があれば、陽性、すなわち最悪のシナリオとした。

GHS では、生殖細胞の変異原性に基づいた化学物質の分類が必要とされる。GHS は 2013 年に最新版に更新され、[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev05/05files\\_e.html](http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html) から入手可能である。GHS の下で生殖細胞の変異原性は、証拠の重み付けに基づき 2 つのカテゴリの 1 つに分類される（GHS、2013 年）。変異原性カテゴリ予測のため、GHS ガイダンスを用いて試験系の組み合わせを導いた。

### III-3. 結果および考察

#### 3.1. 試験の能力に従った *in vitro*、*in vivo* におけるワークフローの精緻化

データセットに反映された各試験について、その予測される試験の能力に従ってサブカテゴリ化した。カテゴリ化の結果を図 1 に示す。

細菌を用いて *in vitro* 変異原性を検討するレベル 1A は、ラット肝 S9 の外因性活性による Ames 試験に代表される。本試験で明らかにされるのは、短鎖長（例えば、2～3 核酸塩基）の DNA 損傷のみである。レベル 1B は、哺乳類を用いる染色体異常で評価される *in vitro* 変異原性 (ivt CA) 試験により特徴付けられ、DNA および／またはタンパク質の損傷を明らかにし、マウスリンフォーマ試験 (MLA) では、染色体の構造異常、異数性、ヘテロ接合性を喪失する組換え現象（例えば、遺伝子変換）が検出される。レベル 1 の試験は、試験の能力が異なるが相補的であることを示す。レベ

ル 2 は A、B、C の 3 つのグループに細分される。グループ A は、コメットアッセイおよび不定期 DNA 合成 (UDS) 試験で評価される、肝臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性について検討する。コメットアッセイでは、長鎖長（例えば、20～30 核酸塩基）の DNA 損傷が明らかにされる。肝臓を用いる不定期 DNA 合成 (UDS) 試験は、DNA 修復機能について評価する。両試験とも Ames 試験と類似しているが、DNA 損傷範囲により一部に不一致が予測される。グループ B は、*in vivo* トランスジェニックげっ歯類突然変異 (TRM) 試験に代表され、本試験では点突然変異を検出する。TRM 試験は Ames 試験と同タイプの範囲の損傷（すなわち短鎖長の DNA 損傷）を明らかにすることから、Ames 試験に匹敵する能力がある。グループ C の哺乳類を用いる染色体異常試験 (CA) で評価される *in vivo* 変異原性では、染色体異常誘発性の事象（例えば、染色体構造異常、異数性）が特定される。哺乳類を用いる *in vivo* 染色体異常 (CA) は、レベル 1B に示す ivt CA 試験の範囲と類似している。レベル 3 のカテゴリは *in vivo* 変異原性の 1 つのみで、試験も骨髓小核試験 (MNT) の 1 つのみである。本試験は、変異原性化学物質に対する主要な代謝活性部位である、肝臓から離れた領域の染色体異常誘発活性を検出する。レベル 2A のコメットアッセイ、レベル 2B の肝臓を用いる *in vivo* TRM 試験、レベル 2C の *in vivo* CA は、*in vivo* MNT を補完する。

これまでのワークフロー (Mekenyan ら、2012 年) では、起源に関係なく *in vitro* 変異原性試験の結果に基づき、陽性か陰性かでまず化学物質を細分した。次の分類は肝

臓を用いる *in vivo* 遺伝毒性作用に基づき、続いて *in vivo* MNT の結果とした。レベル全体の結果に不一致が生じた物質については、例えば *in vivo* のみの作用として、いわゆる基質チャネリングや化学物質の代謝的解毒の発生、骨髄など肝臓から離れた組織への接近の間にタンパク質（または他の生体分子）との相互作用能を獲得など、諸因子を考慮することにより可能な限り正当化された。こうした正当化は事例ごとの基準では可能であったが、レベルとは無関係に、少なくとも 1 つ陽性の変異原性データを不採用にすることが 1 つの欠点であった。これまでの試験系およびサブカテゴリー化の方法について、[図 2](#) に示す。

例えば、レベル 1 の場合、最終的な変異原性が陽性であると、Ames-S9、CA、または MLA 由来データが陽性であることに基づく割り当てであると考えられる。これと同じ方法が、レベル 2 および 3 における *in vivo* 変異原性の割り当てに用いられると考えられる。故に、レベル 1 の最終的な変異原性の判定が、Ames 試験データ陰性かつ CA データ陽性の結果に基づき陽性に割り当てられた場合、この化学物質はレベル 2 でなお陰性になることが考えられる。何故なら、レベル 2 で選択される試験には、CA 試験に匹敵する試験の能力がなかったからである。そのため、この化学物質の場合、*in vitro* 試験では陽性、肝臓を用いる *in vivo* 試験では陰性であると判断され、実際には可能性がきわめて低い肝解毒作用関与の仮説が立てられると考えられる。今回の *in vitro*、*in vivo* における外挿のワークフローは、こうした欠点への対処のため精緻化された。

### 3.2. ワークフロー全体からみた Ames 試験における化学物質の位置付け

実際に改訂ワークフローの有用性を検討するため、162 種類の化学物質のデータセットについて、試験のタイプによる特性別にカテゴリー化した。レベル 1A（すなわち Ames 試験）陽性の化学物質のワークフロー全体について、結果を[図 3](#) に示す。

9 種類の化学物質は比較できなかったが、*in vitro* Ames 試験陽性の化学物質の多くは *in vitro* CA 試験において陽性であることが認められた（70/78）。*in vitro* CA 試験で陰性または評価されなかった化学物質は、肝臓を用いる *in vivo* コメットアッセイおよび/または UDS 試験で多くに陽性が認められた（14/17）。このことから、これらレベル 2A の試験とレベル 1A の Ames 試験との間に一致した試験の能力があるとの予測が裏付けられる。*In vitro* Ames 試験および CA 陽性の化学物質と、*in vivo* コメットアッセイまたは UDS の結果との比較には、2 種類のシナリオが提唱される。レベル 1A およびレベル 1B で陽性の化学物質 37 種類は、レベル 2A の試験でも陽性である。これらの化学物質について、肝臓を用いる反応が陽性であることを確認するデータは、レベル 2B にもレベル 2C にもない。その一方、このうち多くの化学物質が *in vivo* MNT（すなわちレベル 3）では陰性になる。

レベル 2A でデータがない 17 種類の化学物質について、レベル 1 の結果が陽性であることは、レベル 2B の肝臓を用いる *in vivo* TRM 試験により確認される。すなわち、これらの化学物質が示す能力は、Ames 試験と同じである。Ames 試験陽性の 16 種類の化学物質は、レベル 2A では陰性である。

レベル 2A の結果が陰性であることを確認可能なデータはレベル 2B にも 2C にもないが、これらの化学物質は MNT (すなわちレベル 3) 陰性であることから肝解毒作用が示唆される。*In vivo* CA 試験では、*in vitro* CA 陽性の化学物質の最終結果を検討する入手可能なデータが不十分である。

生物学的組織レベル全体からみた、*in vitro* Ames 試験陰性の化学物質の結果も再検討した。そのワークフローを図 4 に示す。

レベル 1A で陰性の化学物質 74 種類のうち、レベル 1B でも陰性なのは 28 種類のみであった。この 28 種類の化合物のうち、レベル 2A では 6 種類が評価されなかったが、22 種類中 21 種類がレベル 2A およびレベル 3 で陰性であった。一方、レベル 1A で陰性の化学物質 74 種類のうち、レベル 1B では 41 種類が陽性である。こうした結果については、CA 試験陽性が DNA かタンパク質いずれかの損傷を示すのに対し、Ames 試験では DNA 損傷のみを評価することから予測可能である。レベル 1A で陰性かつレベル 1B で陽性の化学物質 41 種類の *in vivo* 試験における最終結果を解析すると、可能性として 2 つのシナリオが得られる。レベル 1B で陽性の化学物質のうち 21 種類はレベル 2A で陰性であり、レベル 1A と同じ結果が得られる。試験の能力を因子にする場合、これらの化学物質を、CA 陽性である一方コメットアッセイ陰性のデータにより示されるとおりに肝解毒作用に関与させるべきでないことは明らかである。

興味深いことに、レベル 1A で陰性の化学物質のうち、レベル 1B とレベル 2A のいずれも陽性の物質が 15 種類みられる。コメットアッセイと Ames 試験との間には、試

験の能力に類似性があるにも関わらず、2 つの試験系間の DNA 損傷範囲が異なるのである。これらの化学物質について、レベル 2B で最終結果を解析する入手可能なデータはないが、レベル 3 の陽性データによれば、これらの化学物質は *in vivo* 試験すべてで陽性を維持している。

したがって、変異原性陰性（または解毒作用）を明らかにする場合には、コメットアッセイは Ames 試験と類似の能力を有するが、変異原性陽性を明らかにする場合には、コメットアッセイおよび UDS 試験は CA 試験との類似性がより高くなる。

試験の能力を因子とすることで、各種試験の結果を解釈する機能が強化され、その後の戦略的試験法の志向をより有効なものにできることは明らかである。

化学物質の変異原性カテゴリーへの分類

今回の改訂ワークフローから得られる見識を実際に適用する観点から研究を行い、GHS の下で変異原性の分類および表示のカテゴリーを予測する際のワークフローの有用性について判定した。

GHS の下では、変異原性について 2 種類のカテゴリー（カテゴリー 1A、カテゴリー 1B、カテゴリー 2）が定義されている。ヒト疫学研究に基づき遺伝性の突然変異を誘発することが知られている化学物質は、カテゴリー 1A と定義され、一方、哺乳類の研究に基づき遺伝性の突然変異を誘発するとみなされる化学物質は、カテゴリー 1B と定義される。ヒト集団の突然変異の発生率、またはその頻度上昇の可能性に関する諸研究から信頼性の高い情報を得るのはきわめて困難であることから、今回の研究では、遺伝性の突然変異を誘発することが知られ