

ているか、誘発するとみなされる化学物質は単一のカテゴリー（カテゴリー1）に統合した。したがって、カテゴリー1の物質とするには、

ヒトまたは哺乳類の生殖細胞の突然変異について陽性の証拠（優性致死試験など）が必要とされる。

カテゴリー2では、哺乳類の *in vivo* 体細胞変異原性試験または体細胞遺伝毒性試験で得られた陽性の証拠、また一部の例では *in vitro* 試験の裏付けを示す試験法から陽性の結果が必要とされる。換言すると、カテゴリー2は変異原性および遺伝毒性データの組み合わせに基づき、体細胞から生殖細胞まで、および哺乳類からヒトまで外挿する。

本研究では、既存の GHS 分類を補完するため、追加カテゴリーであるカテゴリー3を仮定した。こうした仮定は、GHS 分類を正式に拡大するためではなく、遺伝毒性対変異原性の評価試験間の識別に寄与することを目的としたものである。よって、*in vivo* 体細胞変異原性試験陽性データが得られ、*in vitro* 変異原性試験の裏付けがある化学物質は、カテゴリー2の変異原であると判断する。既に *in vitro* 変異原性陽性データによる裏付けがある場合、*in vivo* 変異原性陽性データではなく *in vivo* 遺伝毒性陽性データ（例えば、コメットアッセイまたは UDS）が用いられる状況を明らかにするには、新たに設けたカテゴリー3が提唱される。

生殖細胞の情報の必要性を明らかにするため、IATA の範囲を拡大し優性致死試験を特徴付ける要素を得た。その IATA のワークフローについて図 5 に概要を示す。

優性致死試験陽性の化学物質はカテゴリー1の変異原に分類され、生殖細胞の突然変異を裏付ける追加的な変異原性陽性データは必要とされない。これは、GHS 分類によれば、生殖細胞の変異原性が最終的（apical）エンドポイントとみなされることによる。生殖細胞を用いる試験がさまざまな国の規制に果たす役割は、なお協議中である。US EPA、米国食品医薬品局（US FDA）、カナダ、英国、EU、日本では、生殖細胞を用いる試験を段階 2 および段階 3 に配置している。しかし、インド、オーストラリアにあるのは段階 1 の試験のみであり、生殖細胞を用いる試験は含まれていない。US FDA、US EPA、欧州食品安全機関（EFSA）によれば、体細胞を用いる試験が陽性である化学物質の場合、通常は生殖細胞に到達することが想定されるため、生殖細胞変異原であると考えられる（EFSA、2011 年）。体細胞を用いる試験が陰性である化学物質の場合、生殖細胞でも陰性が想定されると考えられる。したがって、生殖細胞の遺伝毒性／変異原性について日常的に試験を行う必要はないと結論付けられる。日本の国立医薬品食品衛生研究所（NIHS）では、体細胞の強力な変異原でがん原性がない矛盾する状況の解決の際、生殖細胞を用いる試験は有用であると判断している。この場合、変異原性の作用から遺伝性疾患が最終的に生じると考えられるか否か評価するため、生殖細胞による試験を実施すべきであることが推奨される。

In vitro 変異原性陽性かつ *in vivo* 変異原性陽性であるデータの化学物質は、カテゴリー2の変異原に分類される。すなわち、**図 5** の *in vitro* Ames 試験および肝臓を用

いる *in vivo* TRM 試験で陽性が認められる化学物質は、カテゴリー2 の変異原であるとみなされる。

この例でカテゴリー2 の変異原を定義する基準となるのは、試験の能力が同一である試験の組み合わせ（すなわち DNA 損傷）である。ただし、*in vitro* および *in vivo* 変異原性試験にはさまざまな組み合わせがあり、化学物質をカテゴリー2 の変異原に分類するには、その組み合わせに依拠することも考えられる。同一の能力の試験に基づきカテゴリー2 の変異原に分類される例には、*in vitro* Ames 試験と骨髄を用いる *in vivo* TRM 試験、*ivt* CA と肝臓を用いる *in vivo* CA、*ivt* CA と *in vivo* MNT の組み合わせが挙げられる。カテゴリー2 の変異原に分類される例は、*in vitro* Ames 試験と肝臓を用いる *in vivo* CA、*in vitro* Ames 試験と *in vivo* MNT、*ivt* CA と *in vivo* TRM、*ivt* CA と骨髄を用いる *in vivo* TRM 試験の組み合わせなど、異なる能力の試験に基づく場合もある。

実際に、ECHA の ITS は、異なる能力の試験の組み合わせに依拠している（ECHA、2013 年）。例えば、変異原性が、*in vitro* Ames 試験および／または *ivt* CA および *in vivo* MNT の組み合わせに基づいて割り当てられる場合がある。この例では、*in vitro* Ames 試験と *in vivo* MNT の組み合わせが、カテゴリー2 の変異原の分類には望ましいと考えられる。対照的に、医薬品の不純物を評価する NIHS のワークフローでは、同一の能力を持つ試験の組み合わせ、すなわち *in vitro* Ames 試験と肝臓を用いる *in vivo* TRM 試験の組み合わせが必要とされる。類似の能力か異なる能力かいずれの試

験の組み合わせによる分類に基づいても、利点と欠点の双方が認められる。同一の能力を持つ試験の組み合わせに基づいて変異原性を分類すると、変異原性の経路全体からみた予測の確実性が高まる利点があり、他方、異なる能力の試験では広範な領域の検討を可能にする利点がある。

カテゴリー3 は、同一の能力または異なる能力を持つ *in vitro* および *in vivo* 試験の組み合わせにより定義できる。例えば、*in vitro* Ames 試験と *in vivo* コメットアッセイ（または UDS）を組み合わせた結果から、DNA に基づく遺伝毒性の結果を明らかにすることにより、カテゴリー3 の変異原であることを定義できる。一方、*ivt* CA と *in vivo* コメットアッセイ（または UDS）を組み合わせた結果から、DNA およびタンパク質に基づく変異原性の結果を明らかにすることにより、カテゴリー3 の変異原であることを定義できる。

3.3. げっ歯類のがん原性予測に関する変異原性カテゴリーの性能

一連の試験のデータを用いたげっ歯類のがん原性陽性の予測について、試験の能力の類似か相違のいずれかに基づく試験の組み合わせを検討する前に、まず個別の *in vitro* および *in vivo* 試験の性能を検討した。表 1 に、げっ歯類のがん原性予測に関する個別の試験の性能を示す。

変異原性試験の多く（例えば、Ames 試験、コメットアッセイ、MNT、げっ歯類優性致死（RDL）試験）がげっ歯類のがん原性に高感度を示し、特異度に関し中位を上回る性能が認められたのは、*in vitro* Ames 試験および *ivt* CA 試験のみであった。最終的に本研究結果は、がん原性の予測に関す

る偽陽性の割合の高さを代償に、高感度を得ていることを示す。

偽陽性の割合が高い結果であることは、欧州代替法評価センター (ECVAM) が開催したワークショップ期間中に取り上げられ議論された (EFSA、2011年参照)。ヒトには無関係とみなされる陽性の結果を得る可能性としての機序、およびそのことを裏付ける証拠について、より優れたガイダンスを要することが確認された。

今回の研究では、がん原性陽性の予測について、3つの変異原性カテゴリーの性能を検討した。がん原性陽性の予測を定義すると、2つの変異原性試験を用いて、変異原をがん原性と関連するカテゴリーに分類する際、いずれも陽性の結果が認められることをいう。がん原性陽性の予測の正しさは、あるカテゴリーを定義付ける場合、両試験の最終的な変異原性の結果が陽性であり、その結果が陽性の発がん物質に該当するかにより認められると考えられる。

そこで、最初に我々は、げっ歯類のがん原性と変異原性のカテゴリー間の関係を検討し、試験の能力の特徴が同一である場合について明らかにした。そのため、カテゴリー3の変異原の定義に用いるワークフローは、*in vitro* Ames試験および*in vivo* コメットアッセイが陽性のデータを組み合わせ、次にこのデータをげっ歯類のがん原性と関連付けることにより得た。その解析結果を表2に示す。

15種類の化学物質が、定義済みのカテゴリー3の変異原とがん原性に重複することが認められた。明らかに、カテゴリー3の変異原とげっ歯類の発がん物質との関係は、感度に関しきわめて優れた性能を示した。

15種類の化学物質のうち、2種類のみがカテゴリー3陽性かつがん原性の観察結果によれば陰性であることが認められた。こうしたわずかな逸脱は、変異原性を定義するカテゴリー3の領域に限界がある（すなわち、遺伝毒性を示したコメットアッセイ陽性のデータが、最終的にすべて突然変異をもたらすとは限らない）ことを考慮すると、予測され得ることである。重複する化学物質の数は限られているが、本研究の最終結果をみると、がん原性の予測に関する偽陽性の割合は低い（13%）。

次の解析では、*in vitro* Ames試験および*in vivo* TRGにより定義されるカテゴリー2の変異原性と、げっ歯類のがん原性との関係について検討した。少数の化学物質（11種類）がカテゴリー2の変異原とがん原性に重複することが認められた。この場合も、ほぼすべてのカテゴリー2の変異原が陽性の発がん物質であると認められ、そのため感度に関しては91%の性能を示し、発がん物質予測に関する偽陽性は9%にすぎなかった。

同様の研究により、このカテゴリー化のワークフローに沿って、DNAおよび/またはタンパク質の損傷を明らかにする試験を基準とし、定義された変異原性のカテゴリーとの関連性について検討した。がん原性陽性の予測では、まず*ivt* CA試験と*in vivo* CA試験（またはMNT）の組み合わせに基づいた。この場合、陽性データで同一の能力を持つ試験の組み合わせを基準にすると、これを満たすカテゴリー2の変異原に属する化学物質は、すべて陽性の発がん物質であることが認められた。

In vitro CA および *in vivo* MNT 陽性デ

ータに基づくカテゴリー2の変異原とがん原性との関係も、きわめて高感度（92%）を示した。*In vitro* CAと*in vivo* MNT陽性データに基づく、39種類の化学物質のうち、3種類（8%）のみが変異原性かつがん原性試験陰性であることが認められた。偽陽性の発がん物質の割合が低いことから、肝臓から離れた骨髄に到達する反応性の化学物質は、がん誘発の可能性が高いことを示す。

カテゴリー1は、*in vivo* 優性致死試験（DLT）陽性データに基づき定義される。

表2のとおり、カテゴリー1の変異原とがん原性との関係は、重複する45種類の化学物質に基づいている。興味深いことに、カテゴリー1に属する45種類の化学物質のうち37種類（82%）は、単一の*in vivo* DLT陽性データに基づく、陽性の発がん物質であることも認められる。45種類の化学物質のうち、8種類（18%）のみが変異原であるようにみられ、かつ遺伝性疾患を引き起こす可能性があると考えられるにも関わらず、がん原性に該当しない。偽陽性の予測が低い数値に留まることから、肝臓で解毒されず性腺で持続的な変異原性を十分に生じる化学物質の多くは、遺伝毒性とみなせることが示された。

さらに同様の解析を、能力が異なる試験の組み合わせに基づくカテゴリーを定義することにより実施し、カテゴリー2および3の変異原とげっ歯類のがん原性との関係を検討した。例えば、カテゴリー2の定義には*in vitro* Ames試験および*in vivo* MNT、カテゴリー3の定義には*ivt* CAおよび*in vivo* コメットアッセイを用いる。

本研究では、試験の能力の特徴が同一で

ある場合を明らかにした際とほぼ同じ結果が認められ、がん原性の予測に関する偽陽性を比較的低い数値（10～12%）に抑え、85～90%の感度を得ている。変異原性とはがん原性との関連付けに用いられた限られたデータベースに基づく、同一の能力または異なる能力を持つ試験を用いる利点について、最終的な結論は下せないと考えられる。

要約すると、類似の能力を持つ*in vitro* および*in vivo* 試験の結果を組み合わせると、主に偽陽性の減少により予測能が向上する。化学物質について、提唱される試験の組み合わせの立証に要する試験をすべて検討し、検討した物質数は限られている（すなわち、計214種類のみ）が、個別の試験に比べ偽陽性の劇的な減少が顕著に認められる。

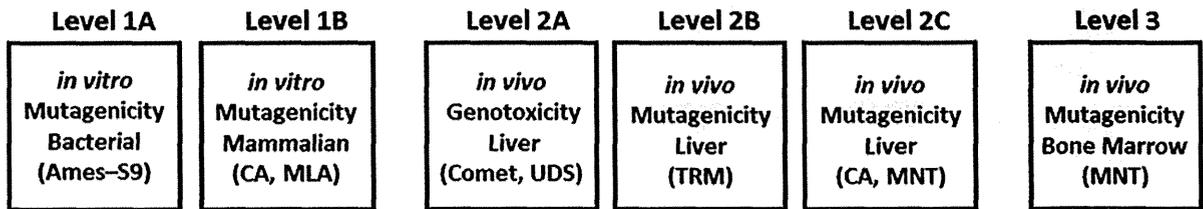
III-4. 結論

これまで作成された遺伝毒性に関する*in vitro*、*in vivo*における外挿のワークフローを、試験の能力に基づいて精緻化した。今回、改訂ワークフローを通じ化学物質162種類のデータセットを再評価し、データの結果を解釈する際の欠点に対処した。これにより、最初のTIMESモデルを開発し、その見識を改善に用いた手法からさまざまな示唆が得られる。今回の改訂ワークフローでは、GHSの変異原性カテゴリーから陽性の遺伝毒性を予測する際、その実用性検討の取り組みまで範囲を広げた。試験の能力の類似性または相違性を明らかにした各種組み合わせの試験系について、その性能を評価してもほとんど差異が認められなかった。ただし、研究に利用可能な一連の試

験が限られていたため、今回の結果には偏りが含まれていたことが考えられる。

今後の作業では、このワークフローを拡大し入手可能な TIMES モデルの結果を取

り込み、体系的な利用に向け、このワークフローを実践的な IATA に取り入れていくことになる。



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

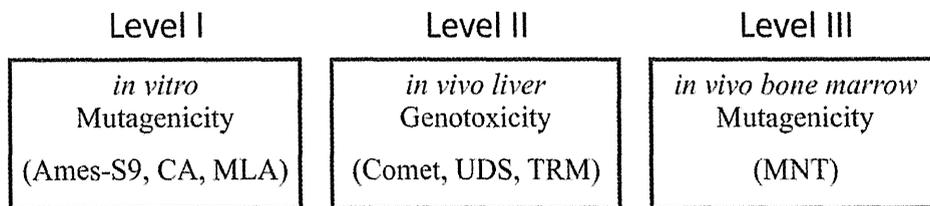


図 2. Mekenyan らによるワークフロー (2012)

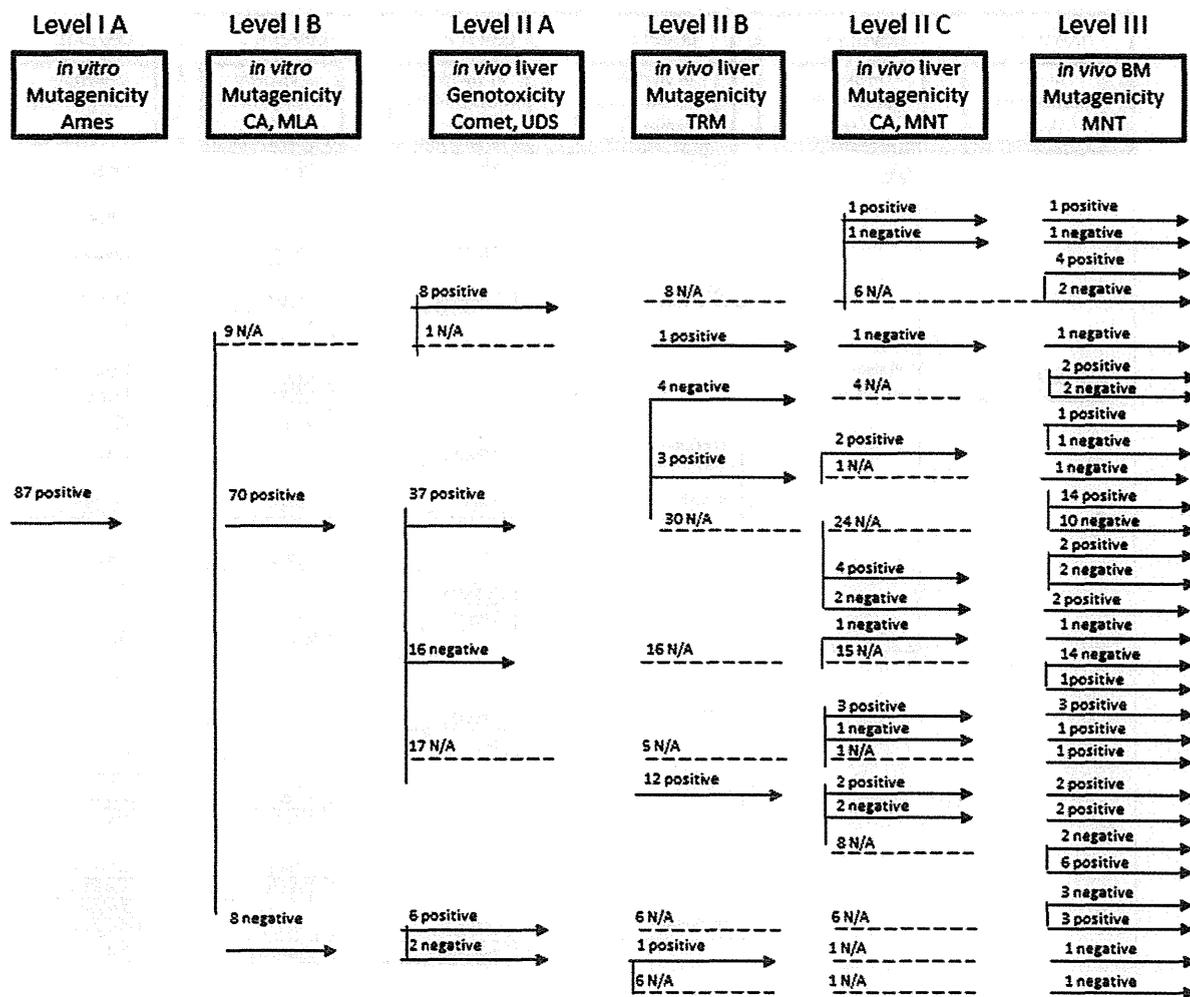


図 3. Ames 試験陽性化学物質のワークフロー全体における結果の内訳

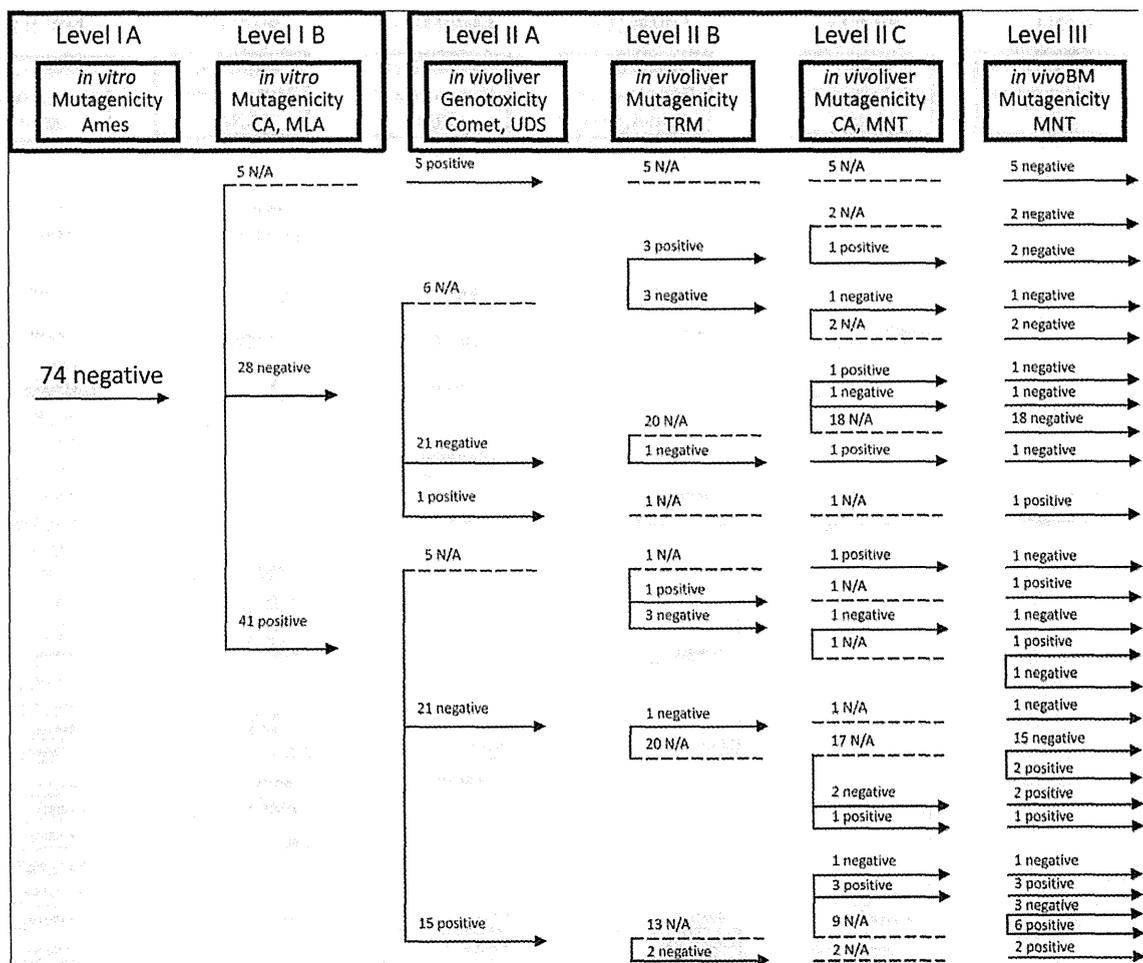


図 4. Ames 試験陰性化学物質のワークフロー全体における結果の内訳

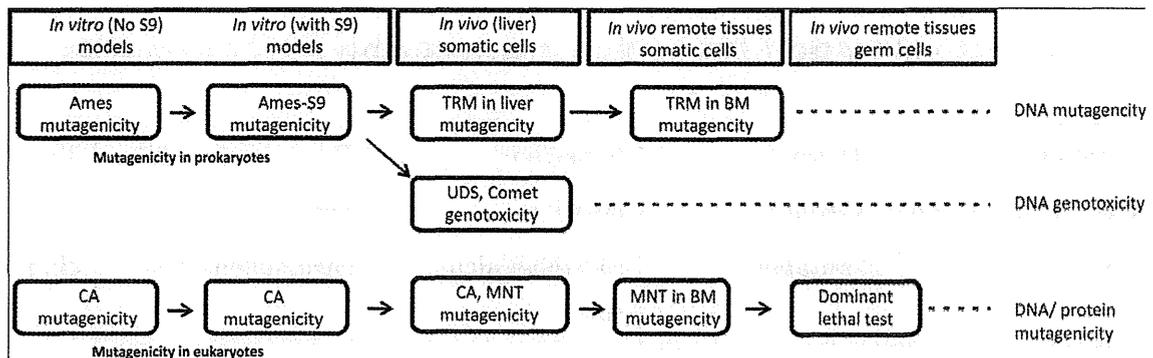


図 5. 遺伝毒性をカテゴリー化して予測するための IATAA ワークフロー

表 1 げっ歯類発がん性を予測するための各遺伝毒性試験の能力

Mutagenicity # Chem	<i>In vitro</i>					<i>In vivo liver</i>			<i>In vivo</i> BM	<i>In vivo</i> Germ cells
	Ames -S9	Ames +S9	CA -S9	CA +S9	MLA	UDS, Comet	TRM	MNT, CA	MNT	RDL
Carcinogenicity	478	344	217	63	89	126	54	65	290	111
Sensitivity, %	81	75	68	59	77	90	94	90	75	82
False Positives, %	55	49	46	59	78	67	74	70	71	74

表 2 発がん性の陽性予測能力が同じと仮定した場合の変異原性カテゴリー化の有効性

Combination of <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> tests	Defined Category mutagens	Sensitivity to positive carcinogenicity, (%)	Rate of false positive carcinogens, (%)	Total # chemicals
Ames and Comet	Category 3	87 (13/15)	13 (2/15)	15
Ames and TRM	Category 2	91 (10/11)	9 (1/11)	11
ivt CA and CA	Category 2	100 (13/13)	-	13
ivt CA and MNT	Category 2	92 (36/39)	8 (3/39)	39
DLT	Category 1	82 (37/45)	18 (8/45)	45

IV. 既存遺伝毒性試験データを用いた *in vivo* 遺伝毒性の知識ベース SAR モデルの改良に関する研究

・Derek Nexus を用いて *in vivo* 変異原性のエンドポイントを予測するためのトランスジェニックげっ歯類データの利用 (研究分担：本間正充)

研究協力者	S. Canipa	ラーサ研究所
研究協力者	A. Cayley	ラーサ研究所
研究協力者	L. Fisk	ラーサ研究所

IV-1. 研究目的

化学物質の危険有害性およびヒトへのリスクの評価の一環として、*in vivo* での突然変異誘発性の評価は重要。これは、突然変異とがんとの因果関係のみではなく、その他の非がん性疾患を誘発する突然変異の可能性についても同様である。化学物質の変異原性の評価は通常、*in vitro* および *in vivo* の一連の試験を用いて行われる。現在利用可能であり、幅広く用いられている *in vivo* 遺伝毒性試験 (*in vivo* における染色体異常試験および小核試験など) の一つの欠点は、これらの試験法では変異原性を直接測定するのではなく、染色体損傷を検出することによって遺伝毒性を評価しているという点である。一方、トランスジェニックげっ歯類を用いる試験法 (TGR アッセイ) では、有害な影響として化学物質の変異原性 (化学物質により誘発される突然変異) を検出する。多くの場合関心の対象となるのは化学物質が突然変異を誘発する可能性であることから、TGR を用いる試験は他の多くの遺伝毒性試験に比べて非常に有用性が高い。

in vivo での化学物質の変異原性を評価することの重要性を考慮すると、このエンドポイントに対する構造アラートが有用であるのは明白である。TGR アッセイは、このようなアラートの構築に用いることができる信頼性の高いデータを提供する。現在公開されている Derek の知識ベースに収録された *in vivo* 変異原性に関するアラートは TGR アッセイのデータから導き出された 1 種 (キノロンの活性をカバー) のみである (アラート 016)。この点を踏まえると、TGR データのデータセットに対する Derek の感度は低いことが予測される。このことは、OECD が発表したレビュー (Lambert et al) に提示されたデータを用いて NIHS がまとめた TGR アッセイデータのデータセットに対する Derek の性能を測定した際に確認されている。表 1 に示したとおり、このデータセットに対する感度はわずか 10% であった。

In vivo において化学物質に誘発される突然変異を評価することの重要性、およびこのエンドポイントのモデル化に用いる TGR データの利用可能性を考慮し、Derek

の *in vivo* 変異原性カバレッジを拡大すべきであると考えている。これを、今年度のNIHSプロジェクトの目的の一つとした。

この目的を達成するため、Derek の知識ベースにおける *in vitro* 変異原性に関する既存のアラートを拡大適用して *in vivo* の活性をカバーできるか否かを検討した。以下の第 1.2 項に示したこの方法は、過去のNIHSプロジェクト(第4年次~第7年次)でも *in vivo* 染色体損傷のカバレッジを拡張するために採用され、良好な成果が得られている。染色体損傷の評価項目に関しては、この方法により比較的短期間のうちに同様のデータセットに対する感度を大幅に向上させることができた(作業開始前は5%、昨年度のプロジェクト完了後には32%)。

表 1. NIHS の TGR データに対する Derek KB2014 の予測率

	Pred +ve	Pred -ve
Exp +ve	11	102
Exp -ve	0	75

Sensitivity = 11/113 = 10%; Specificity = 75/75 = 100%; Accuracy = (11+75)/188 = 46%

IV-2. 研究方法

NIHS より、188 種の異なる化合物に関する TGR アッセイデータのデータセットが提供された。このデータセットは、OECD が発表したレビュー (Lambert et al) に提示された TGR アッセイデータを用いて NIHS がまとめたものである。Lhasa 社では、このデータセットにおける TGR での判定結果に基づき、以下のルールに従ってこ

れらの化合物を陽性 (113 化合物) または陰性 (75 化合物) の結果に振り分けた。

- ・ + = 標的組織で陽性 (発がん性データが利用できる場合)。総合判定は陽性とする
- ・ - = 標的組織で陰性 (発がん性データが利用できる場合) かつ試験対象とされたことがある他のいかなる組織でも陰性 (コメント欄に記述)。総合判定は陰性とする。
- ・ na(+) = 標的組織で陰性 (発がん性データが利用できる場合) であるが、コメント欄に記載されている他の組織で陽性。総合判定は陽性とする。
- ・ na(-) = 標的組織で陰性 (発がん性データが利用できる場合) かつコメント欄に記載されている試験対象とされた他の組織で陰性。総合判定は陰性とする。

2014 年に公開された Derek の知識ベース (KB) を用い (Derek Nexus 4.0)、*in vitro* 変異原性に関するアラートに対してこのデータセットを検討した。この KB には *in vitro* 変異原性に関するアラートが 118 種収録されており、これらのアラートのうち 39 種が TGR アッセイデータに関連するものであった。

1 種のみ活性化合物に対するアラートからは意味のある結果を導き出すために十分なデータが得られないことが予測されたため、3 種以上の活性化合物を対象とした *in vitro* アラートを優先し、このようなアラートについてさらに検討を行った。優先したアラートを表 2 に示す。

表 2 に示したアラートを陽性適中率に従って分類し、さらに優先順位を付した。陽性適中率の高い (したがって、*in vivo* のデ

ータと強く相関する) *in vitro* アラートほど、*in vivo*での活性の予測に拡大適用できる可能性が高いと考えられた。このような観点から、陽性適中率が70%を超えるアラートを優先し、これらのアラートについてさらに検討を行った(表2、Entry 2~8)。なお、キノリン(Entry 1)に対するアラート016については、既に*in vivo*変異原性を予測するアラートであるため今回の優先順位付けから除外されていることに留意されたい。

上記の優先アラートのそれぞれについて、ChemIDPlus、Vitic Nexusのデータベース¹、およびeChemPortal²を通じたECHA毒性データへのアクセスにより、追加できる公開データを検索した。

各活性化化合物における総合的な結果を導き出すため、Lhasa社の専門家が利用可能なTGRアッセイデータを厳格に評価した。続いて、TGRアッセイデータに対する*in vitro*アラートの性能を評価し、*in vitro*アラートが*in vivo*データに対して十分な予測性能を有し(TGRアッセイの結果を用いて評価)、なおかつ双方のエンドポイントには同一のメカニズムが関与していると考えられた場合、当該アラートを*in vivo*での活性の予測に拡大適用した。このようにして拡大適用されたアラートは、*in vitro*および*in vivo*での双方の変異原性を予測するものであった。予測性能が不十分である場合、または*in vivo*での毒性に関与するメカニズムが異なっていると考えられた場合には、

当該の*in vitro*アラートを拡大適用しないこととし、観察された結果を追記するためにアラートの記述を更新した。

¹ Vitic Nexus Database バージョン 2.5.0

²

http://www.echemportal.org/echemportal/index?pageID=0&request_locale=en

表 2. NIHS の TGR データを検索した結果、2 つ以上の *in vitro* 変異原性のアラートを
持つ化合物

Entry	Alert no	Alert name	Active	Inactive	Pos Pred (%)	No of compounds
1 ^a	016	Quinoline	11	0	100	11
2 ^b	330	Aromatic azo compound	3	0	100	3
3 ^b	351	Aromatic amine or amide	3	0	100	3
4 ^b	007	N-Nitro or N-nitroso compound	13	1	92.86	14
5 ^b	339	Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	8	1	88.89	9
6 ^b	352	Aromatic amine or amide	7	1	87.5	8
7 ^b	354	Aromatic amine or amide	5	1	83.33	6
8 ^b	019	Epoxide	4	1	80	5
9	329	Aromatic nitro compound	10	5	66.67	15
10	027	Alkylating agent	9	6	60	15
11	023	vic-Dihalide	2	2	50	4
12	331	Halogenated alkene	2	2	50	4
14	328	Halogenated methane	0	3	0	3

IV-3. 研究結果

表 3 に示すとおり、検討対象とした 7 種のアラートのうち 6 種は *in vivo* での活性と関連性があると判断され、*in vivo* に拡大適用した。これらのアラートはいずれも *in vivo* データに対する十分な予測性能を有しており、活性のメカニズムは *in vitro* およ

び *in vivo* のエンドポイントにおいて同一のものであると考えられた。また、哺乳類における推論レベルは、拡大適用としたアラートの大半 (6 種中 5 種) で「妥当」であるとみなした。これは、これらのアラートは陽性適中率が比較的高いこと、および観察された活性は特定の toxicophore に起

因するものであると予想されたことに基づいた判定である。

一方、芳香族アミンおよびアミドに対するアラート 352 については推論レベルを下げて「不確か」とし、このアラートの予測性能が信頼性に劣ることを示している。アラート 352 において推論レベルを「不確か」とした理由は、(i)このクラスには複数の不活性化化合物が含まれているために当該アラ

ートの陽性適中率が低くなること、および(ii)このクラスに属する複数の化合物が他の toxicophore (芳香族アゾ基) を構造中に有していることである。このような理由により、これらの化合物に関しては、観察された活性が特定の toxicophore (芳香族アミンまたはアミド) によるものであるという信頼性に欠けると判断した。

表 3 アラート調査の結果

Entry	Alert number	Alert name	Outcome	Reasoning rule	Likelihood
1	330	Aromatic azo compound	Comments updated	N/A	N/A
2	351	Aromatic amine or amide	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible
3	007	N-Nitro or N-nitroso compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible
4	339	Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible
5	352	Aromatic amine or amide	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Equivocal
6	354	Aromatic amine or amide	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible
7	019	Epoxide	Alert extended to <i>in vivo</i>	New reasoning rule added	Plausible

芳香族アゾ化合物に対するアラート 330 は、拡大適用としなかった(表 3、Entry 1)。

TGR アッセイにおいていくつかの芳香族アゾ化合物が変異原性を示すことが報告されているが (Lambert et al)、これらの化合物はその活性に関与する可能性のある他の構造的特徴 (すなわち、芳香族アミン基) も有していた。結果として、このアラートに対するコメントを更新したが、新たなルールは追加しなかった。

改良したアラートを含む新しい知識ベース (Derek KB 2014+第8年次 NIHS) の予測性能は、NIHS の TGR データセットを用いて評価した (表 4)。比較のために、2014年に公開された標準的な Derek KB 2014 のこのデータセットに対する性能を表 1 に示している。

上記の結果、感度 (10%から 41%に上昇) および正確度 (46%から 62%に上昇) に大幅な向上が認められ、これに伴う特異度の低下 (100%から 93%) はごくわずかであった。

表 1. NIHS の TGR データに対する Derek KB2014 に NIHS Yr8 Knowledgebase を加えたの予測率

	Pred +ve	Pred -ve
Exp +ve	46	67
Exp -ve	5	70

Sensitivity = 46/113 = 41%; Specificity = 70/75 = 93%; Accuracy = (46+70)/188 = 62%

IV-4. 考 察

化学物質の危険有害性およびリスクの評価の一環として、ヒトにおける突然変異誘発性の評価が重要となることが多い。これは、突然変異とがんとの因果関係のみではなく、その他の非がん性疾患を誘発する突

然変異の可能性についても同様である。化学物質の変異原性の評価は通常、*in vitro* および *in vivo* の一連の試験を用いて行われる。現在利用可能であり幅広く用いられている *in vivo* 遺伝毒性試験 (*in vivo* における染色体異常試験および小核試験など) の一つの欠点は、これらの試験法では変異原性を直接測定するのではなく、染色体損傷を検出することによって遺伝毒性を評価しているという点である。一方、トランスジェニックげっ歯類を用いる試験法 (TGR アッセイ) では、有害な影響として化学物質の変異原性 (化学物質により誘発される突然変異) を検出する。多くの場合関心の対象となるのは化学物質が突然変異を誘発する可能性であることから、TGR を用いる試験は他の多くの遺伝毒性試験に比べて非常に有用性が高い。

この点を考慮し、このようなアッセイに対する DX の予測性能を改善するために、公開されている TGR データをまとめて NIHS が作成したデータセットが Lhasa 社に提供された。NIHS より提供された TGR データは、DX における *in vivo* 変異原性のエンドポイントに関連するものであった。このエンドポイントは、DX において未だ十分に開発されていないものである。現在のところ、このエンドポイントに関するアラートは 1 種のみであり、このデータが知識ベースに使用されている (アラート 016)。実際に、このエンドポイントに対して上記のデータセットを処理した結果、感度はわずか 10%、balanced accuracy は 55%であった。この分析結果より、このエンドポイントに対する予測性能を改善する必要があるのは明白であった。これを行うための一

つの方法として、*in vivo*のエンドポイントに関するアラートの開発を迅速化するため、過去のプロジェクトで *in vivo* 染色体損傷のエンドポイントの開発に用いたものと同様の方法を採用し、アラート、構造活性相関およびこのエンドポイントにおいて同定されているメカニズムを用いて同一のエンドポイントに関して十分に開発されている *in vitro* での予測システムを利用することが考えられた。DX の知識ベースにおける *in vitro* 変異原性エンドポイントは既に十分に開発されていることから、この方法は妥当であると判断された。よって、最初に、上記のデータセットを DX の *in vitro* 変異原性エンドポイントに対して処理した。予測されたとおり、このエンドポイントにおける感度は良好 (73%) であったが、特異度が比較的低い値 (57%) を示した。このため、必要に応じて *in vivo* の結果とアラートとの関連性について各 *in vitro* アラートを個別に評価することによって、この高い感度を維持したまま *in vivo* のエンドポイントにおける特異度を改善する必要があると考えられた。このような観点から、トランスジェニックげっ歯類を用いた試験における *in vitro* 変異原性アラートの関連性について検討するため、特定の基準 (陽性適中率 50%以上、かつ当該アラートをアクティブ化する化合物が 3 種以上) に合致する *in vitro* 変異原性アラートのショートリストを作成した。このリストのアラートを分析することにより、最も短時間でこのエンドポイントにおける感度を改善することができると考えた。11 種のアラートが上記の基準に合致し、以下に示す 7 種を今年度のプロジェクトの一環として検討した。

検討対象とした各アラートに関する文献データをさらに検討した結果、7 種の *in vitro* 変異原性アラートのうち 6 種に、関連する推論ルールを追加して *in vivo* 変異原性の予測に拡大適用することとした (以下の 1~6)。また、すべてのアラート (以下の 1~7) のコメントを更新し、当該の化学クラスに属する化合物の *in vivo* での活性と *in vitro* での活性との関連性を記述するために *in vivo* データを追記した。また、アラートに関連参考文献のリンクを示し、必要に応じて例証化合物を追加した。

1. アラート 007-N-ニトロまたは N-ニトロソ化合物
2. アラート 019-エポキシド
3. アラート 339-多環芳香族炭化水素またはそのヘテロ類似体
4. アラート 351-芳香族アミンまたはアミド
5. アラート 352-芳香族アミンまたはアミド
6. アラート 354-芳香族アミンまたはアミド
7. アラート 330-芳香族アゾ化合物

上記の方法により DX の知識ベースを更新した結果、このエンドポイントにおける上記データセットに対する感度が 41%まで上昇し、特異度は良好に維持された (93%)。

トランスジェニックげっ歯類データセット中の 3 種以上の化合物によってアクティブ化され、なおかつ陽性適中率が 50%超である検討すべき優れた *in vitro* アラートが 4 種残されている。また、陽性適中率は低い 3 種以上の化合物によってアクティブ

化されるアラートが1種、*in vivo* 変異原性を予測できるが更新の必要があるアラートが1種（アラート016）存在する。したがって、この作業を完了させて共同論文を発表するために、今後のプロジェクトにおいてもこの方法を継続することが妥当であると考えられる。

この作業の継続にあたっては、この方法には、カバーすることができる化合物数という点で限界があることに留意する必要がある。しかし、さらに重要なことは、*in vitro* での活性と *in vivo* での活性との関係は、必ずしも当該化学物質が属する化学クラスまたは遺伝毒性誘発メカニズムによって決定される（これによりアラートがアクティブ化）わけではなく、このかわりに化合物の物理化学的性質に関する記述子および ADME 特性が関連している可能性があるという事実に基づいた、より本質的な限界があることである。このため、メカニズムに基づいた構造アラートでは、*in vivo* において陽性であるか陰性であるかを的確に区別できないことがある。この点を考慮し、*in vitro* で陽性の結果が得られた化合物の *in vivo* での活性を、構造クラスのみに基づくのではなく物理化学的性質に基づいて予測する予備的な検討も行った。このアプローチには、*in vitro* での結果と *in vivo* での活性との関連性に関するより一般的なルールを明らかにすることができる利点があると考えられる。このような関連性を発見することができれば、既に十分に開発されている *in vitro* での予測を出発点として用い、より速いペースで *in vivo* エンドポイントのカバレッジを拡張することができるであろう。しかし、最初に、*in vitro* で陽性と予

測されている化合物を *in vivo* で陽性である化合物と陰性である化合物とに区別することができる記述子の同定を目的として行った調査では、十分な成果が得られなかった。この分析では、正しい記述子またはその組み合わせは発見することができなかつたと考えられる。

In vitro および *in vivo* の遺伝毒性の結果／予測とがん原性との関連性に関するより一般的な分析では、*in vitro* 変異原性に関するアラートをアクティブ化する構造がげっ歯類に対する発がん性物質であるか否かの判定に、*in vivo* における遺伝毒性のエンドポイントが有用である可能性が強く示された。*in vitro* 変異原性アラートをアクティブ化する化合物のうち、*in vivo* 遺伝毒性のエンドポイントのアラートも一つ以上アクティブ化する化合物の75%がげっ歯類に対する発がん性物質であったのに対し、*in vivo* エンドポイントのいかなるアラートもアクティブ化しない化合物ではわずか35%であった。

IV-5. 結論

In vivo 変異原性の評価は、化学物質の安全性評価における重要な要素の一つである。このため、このエンドポイントに対する構造アラートが有用であるのは明白である。本研究では、NIHS より提供を受けた TGR アッセイデータを用い、いくつかの *in vitro* 変異原性アラートを *in vivo* での活性を予測するために拡大適用した。この結果、NIHS の TGR データセットを用いて評価したときの感度および正確度が大幅に向上した。

本プロジェクトでは、陽性適中率が最も

高い（70%超）*in vitro* アラートを優先して詳細な検討を行ったが、表 2 に示すとおり、陽性適中率が比較的高い（50%以上）アラートが 4 種残されている。これらのアラートを検討することによって *in vivo* 変異原性の予測への拡大適用が可能となり、さらにこの結果として NIHS の TGR データセットに対する感度がより上昇する可能性がある。残されたこれら 4 種のアラートを拡大適用した場合、感度の向上は最大で 60% に達すると考えられる。

この方法を用いてさらに感度を高めるためには、NIHS の TGR データセットに含まれる関連データを用いて、表 2 には示されていないその他の *in vitro* 変異原性アラートを拡大適用する必要がある。しかし、これらのアラートの対象とされている活性化化合物は 3 種未満であり、多くのアラート（32 種中 16 種）が 1 種だけの活性化化合物を対象とするものである。したがって、NIHS の TGR データセット以外に根拠となるデータが得られない限り、これらのアラートの多くは拡大適用に該当する可能性が低いと考えられる。

研究発表

誌上発表

1. Petkov, PI, Patlewicz, G, Schultz, TW, Honma, M, Todorov, T, Kotov, Dimitrov, SD, Donner, M, Mekenyan, OG, A feasibility study: Can information collected to classify for mutagenicity be informative in predicting carcinogenicity? Regul. Tox. Pharm., 72, 17-25 (2015)
2. Morita, T., Miyajima, A., Hatano, A., Honma, M.: 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, 34-49 (2014)
3. Kirkland, D, Zeiger, E, Madia, F, Gooderham, N, Kasper, P, Lynch, A, Morita, T, Ouedraogo, G, Morte, JM, Pfuhler, S, Rogiers, V, Schulz, M, Thybaud, V, Benthem, J, Vanparys, P, Worth, A, Corvi, R., Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop, Mutation Research 755, 55-68, (2014)
4. M. Honma: Use of QSAR Tools for Hazard Identification of Genotoxic Impurities in Pharmaceuticals, 9th World Congress on Alternative and Animal Use Sciences (WC9), 2014年8月 プラハ・チェコ
5. 本間正充: インシリコによる医薬品中不純物の安全性評価と、その向上に向けた国際共同研究, CBI学会 2014年大会プレミーティングセッション 2014年10月 東京
6. Honma, M.: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014年11月 上海・中国
7. 本間正充: 遺伝毒性インテリジェントテストシステム, 日本環境変異原学会第43回大会 2014年11月 東京
8. 本間正充: QSAR を利用した医薬品中の遺伝毒性不純物の評価と管理, 日本動物実験代替法学会第27回大会 2014年12月 横浜
9. M. Honma et al., : Tracing the fates of site-specifically introduced DNA adducts in the human genome, 4th Asian Conference on Environmental Mutagens 2014年12月 コルカタ・インド
10. Takeshi Morita and Shuichi Hamada: The Rat Liver Micronucleus Test: Summary of the 2013 IWGT Working Group on the Liver Micronucleus Test, 2014 GTA (Genetic Toxicology Association), Newark, US, 7 May 2014.

学会発表

1. 本間正充: 医薬品中に存在する遺伝毒性不純物の評価と管理, 第350回 CBI学会研究講演会 2014年5月 東京
2. 本間正充: 日本環境変異原学会レギュラトリーサイエンス WG 活動, 日本環境変異原学会公開シンポジウム 2014年5月 東京
3. Honma, M et al.,: Demonstration of non-threshold of 8-oxoG inducing genotoxicity by targeted mutagenesis, 43rd EEMS Annual Meeting 2014年7月 ランカスター・英国
11. 森田 健: Ames 陽性知見は、発がん性や遺伝毒性リスクを全て同じレベルで示唆するか? JEMS・BMS研究会 第51回定例会 (2014年6月6日、大橋会館、東京)
12. 森田 健、古田光子、春日文子: 有害性物質の毒物劇物への該当性評価、第36回日本中