

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担報告書

化学物質のヒト健康リスク評価における（定量的）構造活性相関およびカテゴリーアプローチの実用化に関する研究（H24-化学-指定-010）

**- 遺伝毒性の予測に関する研究 -**

研究代表者	本間 正充	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部・部長
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	北澤 愛莉	国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部第一室
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
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
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

**研究要旨**

本研究では、化学物質の遺伝毒性を従来の試験によらず、データベース検索や(Q)SAR の利用により、迅速、且つ正確に予測するシステムの構築と、その実用化を目指す。本研究は最終的に化学物質のヒト健康リスク評価の効率化や動物愛護に貢献する。

エームス試験に関しては、予測精度の向上を目指し、世界最大規模のエームス試験データベースの再構築を行った。今年度は安衛法エームス試験データ約 2 万物質を入手し、データベース化に着手した。2 万物質のうち、12,962 物質が、分子量 500 以下の化学物質データとして入力可能で有り、これまで、約 8 千化合物をデータベース化した。このデータを公開し QSAR ソフト精度向上のための国際共同研究を開始する。

これまで *in vitro* の試験データから QSAR モデルを開発してきたが、*in vitro* でのアラートを *in vivo* へ拡大し、*in vivo* 遺伝毒性予測モデルの構築にも着手した。その前提として、*in vivo* 試験データの精査と、データベースの構築を試みている。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。*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%)。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。

ブルガス大学との共同研究により変異原性カテゴリー予測のためのメカニズムベースのサマリーワークフローを導入した。これまでのワークフローに新たに機械論的な理解により情報化される試験法と評価のための統合アプローチ(IATA)を反映させた。変異原性分類を基準とした入手可能な変異原性データを用いて、精巧なIATAから一連の試験による発がん物質のカテゴリー化を行った。IATAを用いると、遺伝毒性によるがん原性陽性を、高感度(80~85%)で偽陽性の割合を低く抑え(15~20%)予測できることが認められた。

ラーサ社との共同研究により、知識ベースのトランスジェニック突然変異(TG)試験予測モデルの開発を行った。本年度はNIHSからのデータの提供(TGRデータセット)により感度および正確度が大幅に向上した。本研究で陽性適中率が比較的高い(50%以上)アラートが4種確認された。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た。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、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種のみ活性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。従って、さらなる試験データベースの拡張が望まれる。

**キーワード:** エームス試験、染色体異常試験、小核試験、トランスジェニック突然変異(TG)試験、(Q)SAR、アラート、代謝

## 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試験結果は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。

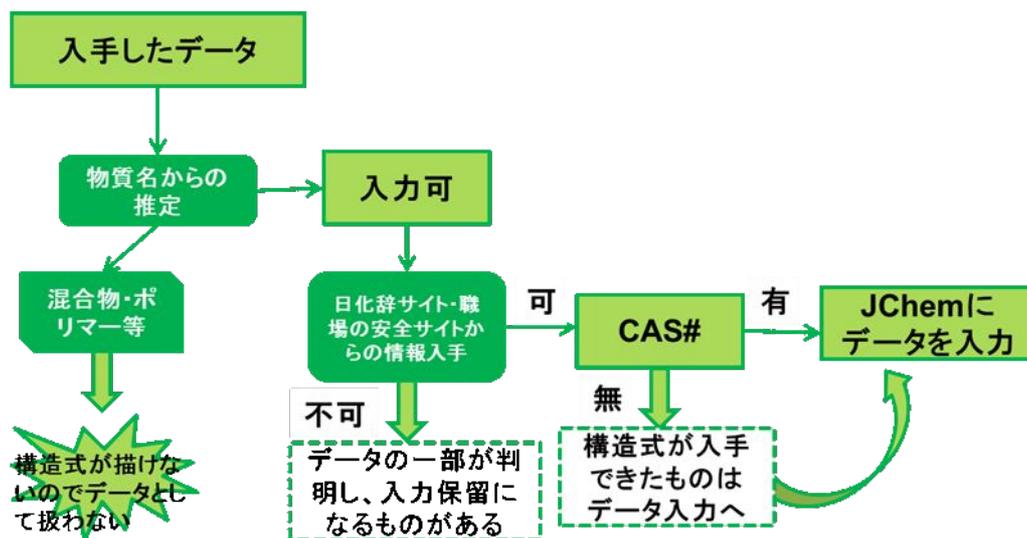


図1 20,761化合物のデータの振り分けフローチャート

### 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	result	ANEI_No	CAS#	SMILES	Structure	Chemical_Name
73		4-(7)-1305	68391-42-4	[O-][N+](=O)c2ccc(/N=N/c1ccc(N(CCC		2-((2-Cyanoethyl)(4-((E)-4-nitrophenyl)diazonyl)phenyl)amino)ethylacetate
75		8-(7)-691	34052-90-9	C1COC(=N1)C2=CC(=CC=C2)C3=NC		1,3-Bis(4,5-dihydro-2-oxazolyl)benzene
76		2-(6)-1075	4220-30-8	N#CCCN(CCC#N)CC(O)CO		(2,3-dihydroxypropyl)bis(2-cyanethyl)amine
77		7-(4)-691	90327-04-1	CC(CC(C1=CC(C)=CC(C)=C1O)C1=C		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)が収載されている。

#### 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収載の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のデータが収載されているが、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のデータが収載されているが、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>➤ <a href="#">Mavourin et al (1990)</a> 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. <i>Mutat Res.</i> 239, 29-80.</li> <li>➤ <a href="#">Kirkland et al (2008)</a> Recommended lists of <i>genotoxic</i> and <i>non-genotoxic</i> chemicals for assessment of the performance of new or improved <i>genotoxicity</i> tests: a follow-up to an ECVAM workshop. <i>Mutat Res.</i> 653, 99-108.</li> <li>➤ <a href="#">Kirkland et al (2008)</a> Evaluation of the ability of a battery of three <i>in vitro</i> <i>genotoxicity</i> tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing <i>in vivo</i>. <i>Mutat Res.</i> 654, 114-132.</li> <li>➤ <a href="#">Kirkland et al (2011)</a> A core <i>in vitro</i> <i>genotoxicity</i> battery comprising the Ames test plus the <i>in vitro</i> micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and <i>in vivo</i> <i>genotoxins</i>. <i>Mutat Res.</i> 721, 27-73.</li> </ul> <p><b>大規模試験報告書</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ <a href="#">Shelby et al (1993)</a> Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. <i>Environ Mol Mutagen</i>, 21, 160-179.</li> <li>➤ <a href="#">Morita et al (1997)</a> 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. <i>Mutat Res.</i> 389, 3-122.</li> <li>➤ <a href="#">Wakata et al (1998)</a> Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. <i>Environ Mol Mutagen.</i> 32, 84-100.</li> <li>➤ <a href="#">Witt et al (2000)</a> <i>Micronucleated Erythrocyte Frequency in Peripheral Blood of B6C3F1 Mice from Short-Term, Prechronic, and Chronic Studies of the NTP Carcinogenesis Bioassay Program.</i> <i>Environ. Mol. Mutagen.</i> 36, 163-194.</li> <li>➤ <a href="#">Hamada et al (2001)</a> 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). <i>Environ Mol Mutagen</i> 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、<i>micronucle*</i>, 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				
	陽性 (+)	陰性 (-)	あいまい (E)	データなし	計
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					
	陽性 (+)	陽性 (na(+))	陰性 (-)	陰性 (na(-))	データなし	計
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	<i>in vivo</i> 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	<i>in vivo</i> 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的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）。変異原性カテゴリー予測のため、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ー化した。カテゴリー化の結果を図 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 のカテゴリーは *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、陽性が陰性かです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

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、 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

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-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-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-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-1 に属す 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-2 を定義することにより実施し、カテゴリ-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-2 の定義には *in vitro* Ames 試験および *in vivo* MNT、カテゴリ-3 の定義には *in vitro* 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。

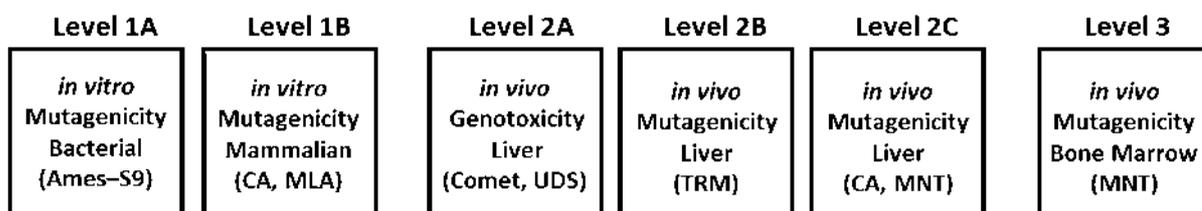
#### III-4. 結論

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-1 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

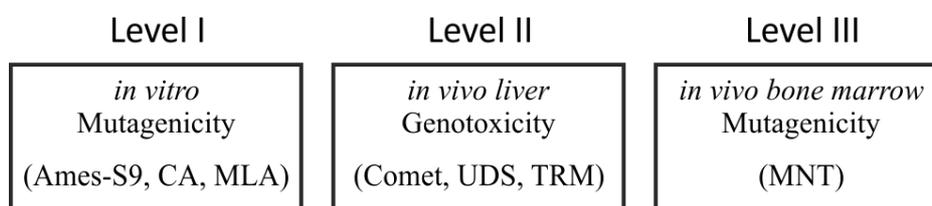


図 2. Mekenyan らによるワークフロー (2012)

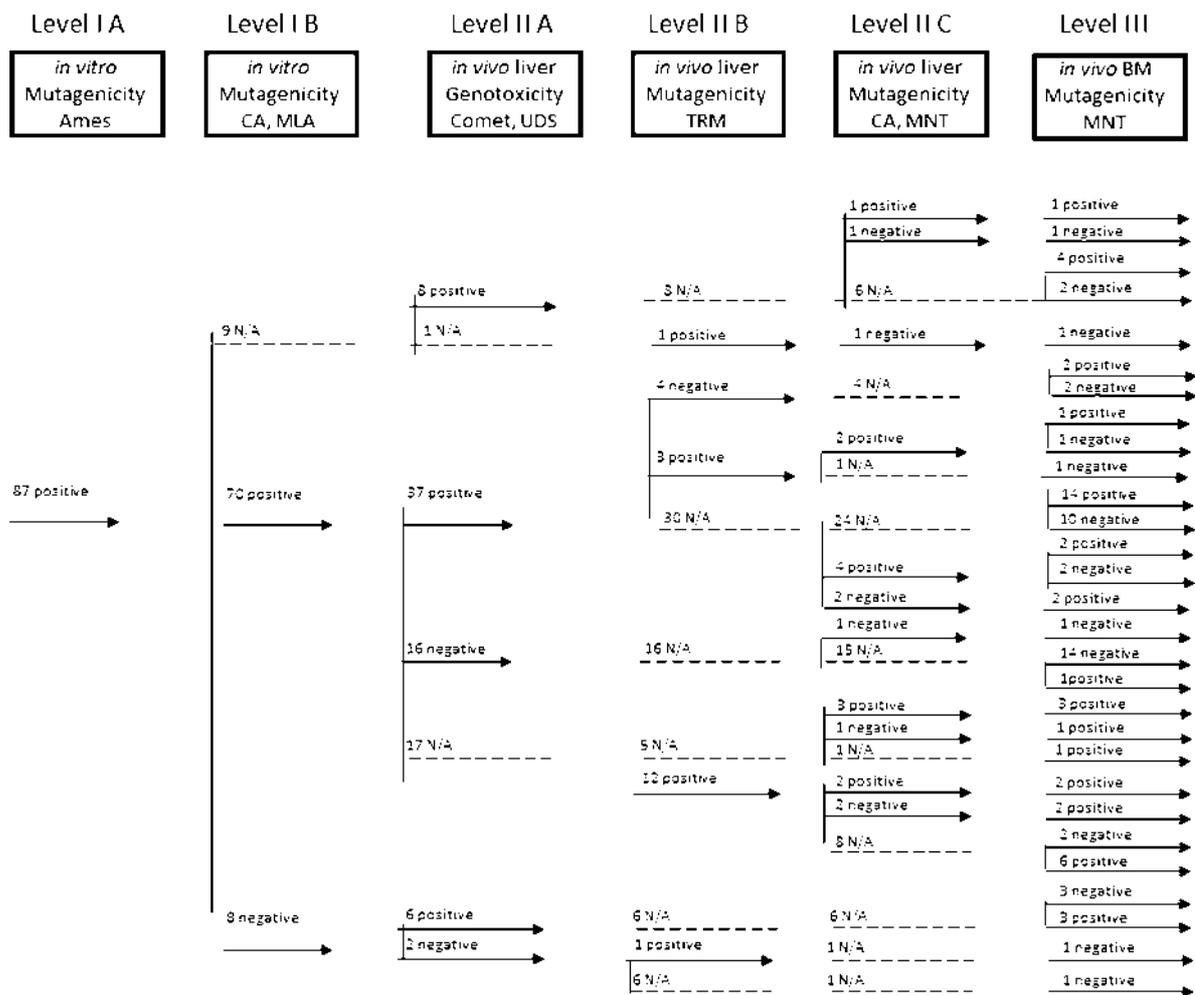


図 3. Ames 試験陽性化学物質のワークフロー全体における結果の内訳

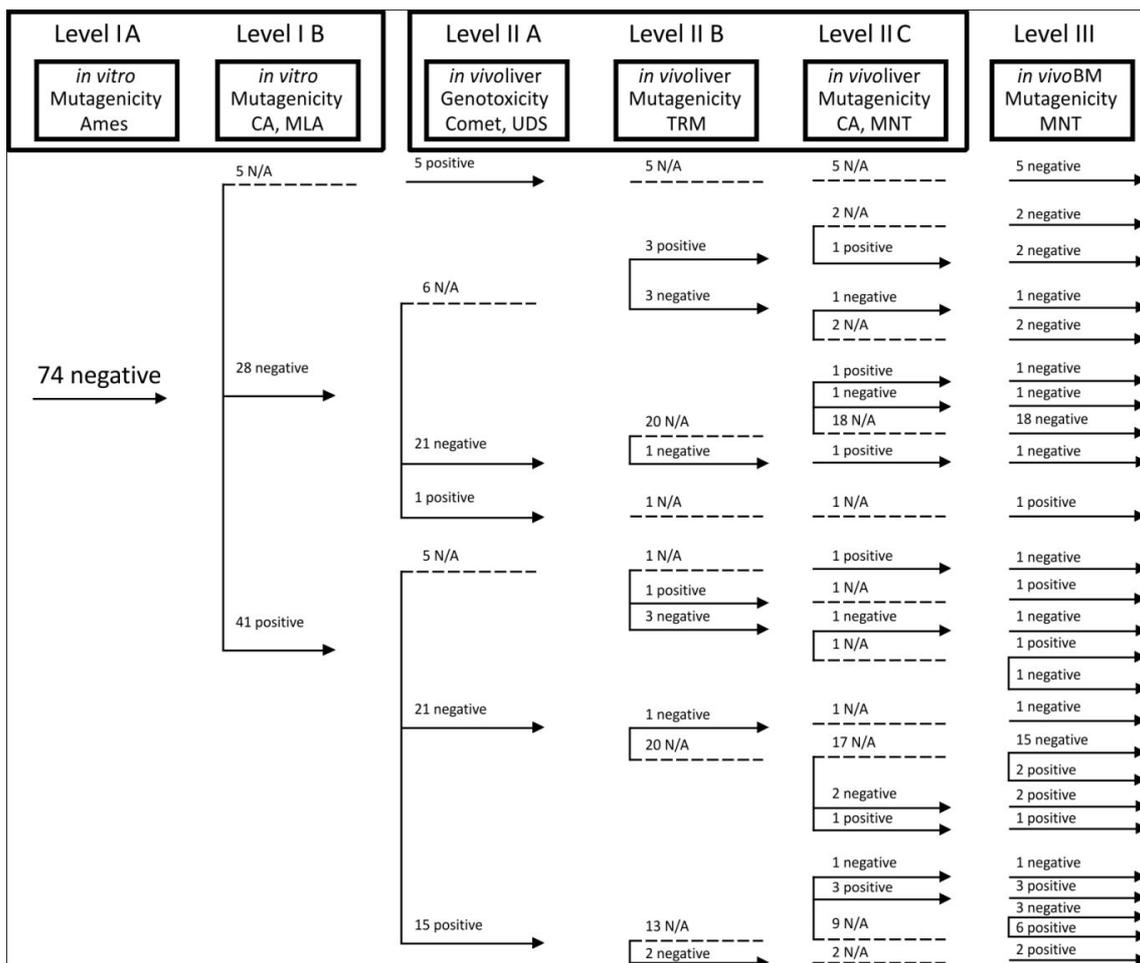


図 4. Ames 試験陰性化学物質のワークフロー全体における結果の内訳

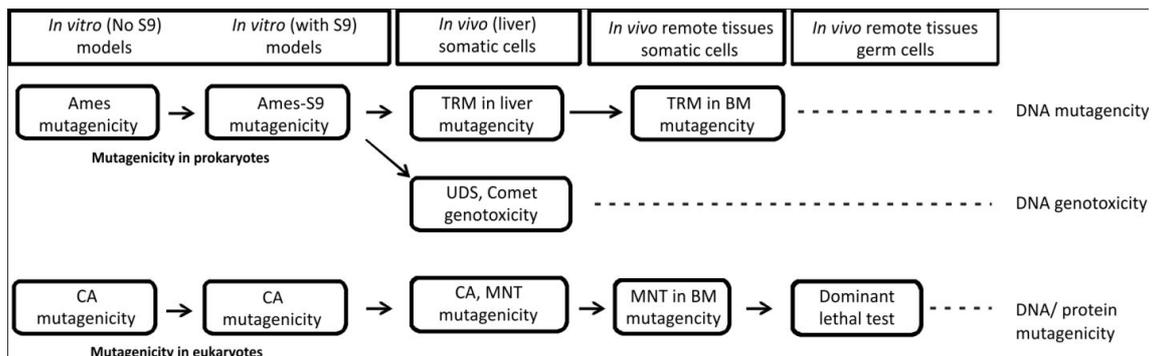


図 5. 遺伝毒性をカテゴリー化して予測するための IATAA ワークフロー

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</i> liver			<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 種だけの活性化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<sup>1</sup>、および eChemPortal<sup>2</sup>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。

---

<sup>1</sup> Vitic Nexus Database バージョン 2.5.0

<sup>2</sup>

[http://www.echemportal.org/echemportal/index?pageID=0&request\\_locale=en](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 <sup>a</sup>	016	Quinoline	11	0	100	11
2 <sup>b</sup>	330	Aromatic azo compound	3	0	100	3
3 <sup>b</sup>	351	Aromatic amine or amide	3	0	100	3
4 <sup>b</sup>	007	N-Nitro or N-nitroso compound	13	1	92.86	14
5 <sup>b</sup>	339	Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	8	1	88.89	9
6 <sup>b</sup>	352	Aromatic amine or amide	7	1	87.5	8
7 <sup>b</sup>	354	Aromatic amine or amide	5	1	83.33	6
8 <sup>b</sup>	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關与する可能性のある他の構造的な特徴 (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關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關するアラートは 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ったと考えられる。

*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, Vanparrys, 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)

### 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
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年大会プレミートングセッション 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.
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

毒学会総会（2014年7月25-26日、板橋、東京）

13. Morita, T, Kasuga, F.: Comparison of GHS classification of CMR substances in EU and Japan, 2014 EuroTox, The 50th Congress of the European Societies of Toxicology (September 7-10, 2014, Edinburgh)
14. Hamada S, Ohyama W, Takashima R, Shimada S, Matsumoto K, Kawakami S, Uno F, Sui H, Shimada Y, Imamura T, Matsumura S, Sanada H, Inoue K, Muto S, Ogawa I, Hayashi A, Takayanagi T, Ogiwara Y, Maeda A, Okada E, Terashima Y, Takasawa H, Narumi K, Wako Y, Kawasaki K, Morita T, Kojima H, Honma M, Hayashi M: Evaluation of Repeated Dose Liver and Gastrointestinal Tract Micronucleus Assay Using Young Adult Rats (IV): Summary of Collaborative Study by CSGMT/JEMS.MMS., Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS), 45th Annual Meeting 2014: Hilton Orlando Lake Buena Vista, Orlando, Florida September 13-17, 2014.
15. 森田健、小宮佐知子：EU、ドイツおよび日本における生殖細胞変異原の分類比較、日本環境変異原学会第43回大会、2014年12月4-5日、東京

#### 知的財産権の出願・登録状況

なし

