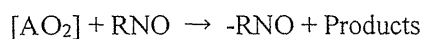
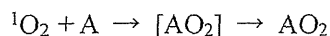


nitroblue tetrazolium (NBT), oxybenzone (OX), *p*-nitrosodimethylaniline (RNO) および propylene glycol は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した. Fenofibric acid は AK Scientific Inc. (Union City, CA, USA) より購入した. Acetonitrile (ACN) は Honeywell Japan (東京, 日本) より購入した. 10% fetal bovine serum (FBS), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), earle's balanced salt solution (EBSS), neutral red (NR), quinine HCl (QN) および sulisobenzone (SB) は Sigma-Aldrich Japan (東京, 日本) より購入した. その他の試薬類は全て市販品を用いた. Quartz reaction container は オザワ科学 (愛知, 日本) により作製された.

B-2) ROS アッセイ

擬似太陽光の照射には Xe arc lamp を備えた Atlas Suntest CPS+ (Atlas Material Technologies LCC, Chicago, IL, USA) を用いた. Atlas Suntest CPS+ では短波長の UV をカットし実際の太陽光を模するためのフィルターを用いて CIE85/1989 daylight simulation requirement に良好に対応した擬似太陽光を照射している. 照射は 28°C, 250 W/cm², で 1 h 行った. 被検物質は DMSO に溶解し (10 mM), stock solution として用いた. Singlet oxygen は imidazole を singlet oxygen の acceptor に用いて, *p*-nitrosodimethylaniline 水溶液の 440 nm における吸光値をモニタリングすることで測定した. 測定原理を以下に示した.



A: ¹O₂ acceptor, imidazole

RNO: nitroso compounds

Superoxide anion は NBT の還元によって生成する nitroblue diformazan の 560 nm における吸光値をモニタリングすることで測定した. 測定原理を以下に示した.



B-3) 動物実験

Sprague-Dawley 系統の雄性ラット (10–12 週齢, 体重約 309–440 g) は日本 SLC (静岡, 日本) より購入した. 実験までの間, ラットは動物飼育施設において自由に摂餌, 飲水が可能な環境で管理された気温 (24±1°C) および湿度 (55±5%) 管理の下, 飼育した. 薬物動態学的特性評価および *in vivo* 光毒性試験に用いるラットは, 試験開始 18 h 前に pentobarbital (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下, 腹部を剃毛した. 全ての動物実験は静岡県立大学内の動物委員会の承認を得て実施した. 6 種の BZPs を 1 mg/mL となるよう propylene glycol に溶解した混合溶液を調製した. この混合溶液 100 μL をパッチテスト用絆創膏 (リバテープ製薬, 熊本, 日本) を用い, あらかじめ腹部を剃毛したラット皮膚に貼付した. BZPs の経皮投与後 2, 4, 6, 8, 12 および 24 h において, pentobarbital (50 mg/kg, *i.p.*) 麻酔下, 大動脈からの脱血, 60 mL の氷冷生理食塩水による還流後, 投与部位で (皮膚) を採取し, 採取した皮膚表面の投与液は精製水を用いてよくふき取った. また, 皮膚は角質層, 表皮および真皮を採取し, 皮下組織は取り除いた. 採取した皮膚サンプルは重量を測定し, 皮膚中濃度測定までの間, 冷凍保存した (-80°C). 皮膚サンプルは, ハサミによるミンスした後 ACN (4 mL) 中で Physcotron (Microtech, 千葉, 日本) を用いてホモジナイズした. ホモジ

ナイズしたサンプルは振盪および超音波処理 (各 10 min) 後、遠心分離 (1,300×g, 10 min) し、上清をガラスチューブに採取した。この抽出操作を 2 回行い、得られた上清を 40°C で窒素乾固した。残渣を internal standard である fenofibric acid (500 ng/mL) を含む 50% ACN で溶解し、ultra-performance liquid chromatography equipped with electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS) 分析にて定量した。UPLC/ESI-MS システムは binary solvent manager, column compartment および Micromass SQ detector connected with Waters Masslynx v 4.1. を含む Waters Acquity UPLC™ system (Waters, Milford, MA, USA) から構成されており、カラムには Waters Acquity UPLC™ BEH C18 (particle size: 1.7 μm, column size: φ2.1 × 50 mm; Waters) を用いた。カラム温度は 40°C に保った。スタンダードおよびサンプルは 0.1% formic acid 含有 Milli-Q 水 (A) と ACN (B) から成るグラジエント移動相によって分離し、各化合物の保持時間は 0.57 min (SB); 1.14 min (KT); 1.96 min (BZ); 2.54 min (OX); 2.54 min (DO); 3.18 min (MX); および 2.00 min (fenofibric acid) であった。グラジエントコンディションは、0–1.0 min, 50% B; 1.0–3.0 min, 50–75% B (linear gradient curve); 3–4 min, 75–95% B; 4–5.5 min, 95% B; および 5.5–6.0 min, 50% B とし、流速は 0.25 mL/min とした。MS による検出においては化合物の [M+H]⁺ 特異的 *m/z* (183.2, BZ; 255.2, KT; 229.2, OX; 307.1, SB; 245.2, DO; 243.3, MX; および 319.2, fenofibric acid)

ならびに [M-H]⁻ 特異的 *m/z* (307.1, SB) を用いた。

B-4) 3T3 NRU PT

マウス由来不死化線維芽細胞である Balb/c 3T3 cells (CloneA-31) を DMEM に 10% FBS を添加した培地を用いて継代し、20 継代未満のものを試験に用いた。培養は 37°C, 5% CO₂ に保った CO₂ incubator を用い、2-3 日おきに継代した。試験は OECD Test Guideline 432 に準じて行った。2 枚の 96 well マイクロプレートに 2.0×10⁴ cells/well となるよう細胞を播種し、CO₂ インキュベーターにて 24 h 培養した。培養液をデカントにより除去し、EBSS を用いて希釈、調整した被検物質を 100 μL 添加後、CO₂ インキュベーター内で 1 h 曝露させた。曝露後、metal halide lamp および UVB を減弱させるための H1 フィルターを搭載した SOL 500 Sun Simulator (Dr Hönle, Munich, Germany) にて UVA 照射量が 5 J/cm² となるよう照射した。非照射群はアルミホイルで遮光し、静置した。照射後、試験液を除去し、EBSS で洗浄した後、培養液を添加して 24 h 培養した。培養液を除去し、NR 液 (50 μg/mL in DMEM) を添加後 3 h 静置し、NR 液を除去、洗浄 (PBS, 150 μL) した。NR 抽出液 (Acetic acid: EtOH: water=1: 50: 49) を添加し、10 分後に攪拌したのち 540 nm における吸光度を Benchmark Plus microplate spectrophotometer (BioRad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。UV 照射群および非照射群における concentration-response curve に基づいて mean photo effect (MEC) values を算出し、光毒性判定に用いた。

B-5) ラット in vivo 光毒性試験

皮膚へ塗布する被検物質は 100 mg/mL となるよう DMSO に溶解した。あらかじめ腹部を剃毛したラットに pentobarbital にて麻酔し (50 mg/kg, i.p.), 1.5 cm×1.5 cm サイズ中を切り取ったビニルテープを貼り付け, そこへ被検物質の DMSO 溶液 100 μ L を塗布した。塗付後 4 h において薬液を除去し, 水で湿らせたコットンで洗浄した。ラットは black light (FL15BL-B, National, 東京, 日本) を用いて UVA 照射量が 30 J/cm² となるまで照射した。照射強度は UV-Meter (Dr. Hönle AG, UV-Technology, Munich, Germany) を用いた。UV 非照射部位はアルミホイルで遮光した。照射終了後 24 h において色差計 (NF333, 日本電色工業, 東京, 日本) を用いて皮膚表面の色調を計測した。色差計は皮膚表面 3 次元色反射率を $L^*a^*b^*$ system (CIE 推奨) により記録する。輝度 (L^*) は黒 ($L^*=0$) から白 ($L^*=100$) までの間で明るさを表し, 色相 (a^*) は赤 ($a^*=100$) および緑 ($a^*=-100$) 間のバランスを表し, 彩度 (b^*) は黄色 ($b^*=100$) および青 ($b^*=-100$) 間のバランスを表す。UV 照射前後の皮膚表面の色差 (ΔE) を以下のように算出し, 光毒性の指標とした。

$$\Delta E = \sqrt{\{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}}$$

C. 研究結果

C-1) 光化学的特性評価

化合物が太陽光に含まれる UV もしくは VIS ($\lambda=290-700$ nm) の一部を吸収し, 励起状態になることは各種光毒性の引き金となる。そこでモデル化合物である BZPs に対して UV/VIS 吸収測定を実施

した (Fig. 2A)。全ての BZPs は UVA/B 領域において高い光吸収を示したが, 可視光領域の光吸収は観察されなかった。また, ICH S10 では, 「290 から 700 nm の波長において MEC が 1,000 を上回らない化合物については, 直接的な光毒性反応を引き起こすほどの光反応性がないと考えられる」と明記されている。この波長領域における BZPs の MEC の最大値は 2,317 (BZ), 10,833 (DO), 4,350 (KT), 2,850 (MX), 6,817 (OX) および 11,700 (SB) $M^{-1} \cdot cm^{-1}$

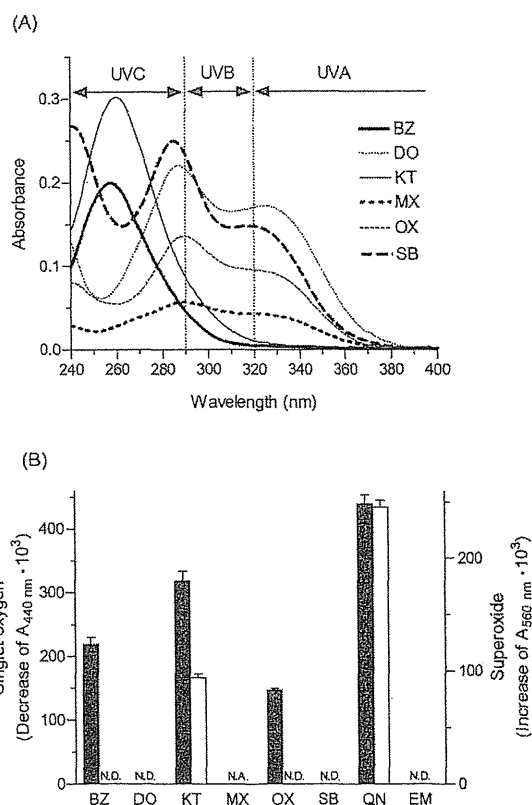


Fig. 2 *In vitro* photochemical properties of BZPs. (A) UV absorption spectra of BZPs (20 μ M) in 20 mM NaPB (pH 7.4). (B) Generation of singlet oxygen (filled bars) and superoxide (open bars) from BZPs (200 μ M) exposed to simulated sunlight (ca. 2.0 mW/cm^2). QN and EM as positive and negative controls, respectively. Data represent mean \pm SD for three experiments. N.A., not applicable; and N.D., not detected.

であった。すなわち 6 種の BZPs はそのすべてが高い光励起性を有しており、光化学的反応を引き起こす可能性がある。

また、光照射時における化合物からの ROS 産生は光毒性の指標として有用である。この性質を評価すべく、ROS assay を実施した (Fig. 2B)。陽性対照である QN は擬似太陽光照射時に $^1\text{O}_2$ および O_2^- を産生し、陰性対照である EM では両者の産生を認めなかった。以前の研究から ROS assay には明確な criteria [$^1\text{O}_2$ ($\Delta A_{440 \text{ nm}} \times 10^3$): >25 ; and O_2^- ($\Delta A_{560 \text{ nm}} \times 10^3$): >20] が定められており、この値を下回る化合物に関しては光毒性の懸念が非常に低いと判断できる。6 種の BZPs の内、BZ, KT および OX は露光時に非常に強い ROS 産生を認め、その光反応性は高いと判断した。MX に関しては ROS assay における被験物質濃度 (200 μM) では反応液中において析出が生じたため、希釈した状態 (100 μM) で同様の試験を実施した結果、ROS 産生を認めた [$^1\text{O}_2$ ($\Delta A_{440 \text{ nm}} \times 10^3$): 67; および O_2^- ($\Delta A_{560 \text{ nm}} \times 10^3$): Not detected]。すなわち、BZ, KT, MX および OX は高い光反応性を有しており、DO および SB は光反応性が低いと判断した。

C-2) 薬物動態学的評価

経皮投与された化合物は皮膚へ直接曝露されるため、化合物の皮膚透過性や皮膚滞留性の高さが光毒性のリスクファクターとなる。そこで、経皮投与された BZPs の皮膚透過性や滞留性を評価すべく、BZPs 経皮投与後における皮内動態を評価した (Fig. 3)。本検討では、PK study におけるスループット改善および動物資源削減を実現すべく、経皮的 cassette-dosing PK study を実

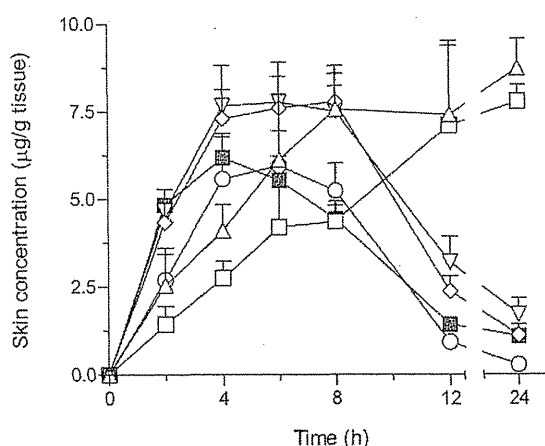


Fig. 3 Skin concentration-time profiles after dermal co-administration of BZPs (0.1 mg/rat each). ■, BZ; ○, DO; △, KT; ◇, MX; ▽, OX; and □, SB. Data represent mean±SE for five rats.

施した。得られたデータをもとに皮膚における薬物動態学的パラメーターを算出することで皮膚滞留性を評価した (Table 1)。BZ は経皮共投与後 4 h において最高皮膚中濃度 (C_{max} : 6.1 $\mu\text{g/g tissue}$) に到達し、その後は速やかに消失した。DO, MX および OX は経皮共投与後、約 4 h で C_{max} に到達したが、投与後 8 h まで皮膚中に高濃度で滞留し、その後消失した。本知見から、この 3 化合物は経皮投与後 4–8 h において最も光毒性のリスクが高いと見積もることができる。一方で、KT および SB は経皮共投与後 24 h で C_{max} を迎え、消失相は本実験条件内では観察されなかった。特に KT の皮膚中濃度は投与後 8–24 h において C_{max} (8.7 $\mu\text{g/g tissue}$) とほぼ同程度の値を維持し、その $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ および MRT の値はそれぞれ、160.0 $\text{h} \cdot \mu\text{g/g tissue}$ および $>14.2 \text{ h}$ と、他の BZPs と比較して非常に高値であり、KT の皮膚滞留性は非常に高いと判断できた。また、SB は皮膚中濃度の立ち上がりが緩やかであったが、MRT が高値

Table 1 PK parameters of BZPs in the rat skin after dermal co-administration

	BZ	DO	KT	OX	MX	SB
T_{\max} (h)	4	6	24	6	8	24
C_{\max} ($\mu\text{g/g}$ tissue)	6.1 ± 0.6	6.0 ± 1.0	8.7 ± 0.9	7.8 ± 1.2	7.8 ± 0.5	8.7 ± 0.9
$AUC_{0-24\text{ h}}$ ($\text{h} \cdot \mu\text{g/g}$ tissue)	64.5 ± 2.8	53.4 ± 3.1	160.0 ± 7.3	98.6 ± 5.1	87.6 ± 4.0	160.0 ± 7.3
MRT (h)	8.4 ± 0.3	7.2 ± 0.3	>14.2	9.3 ± 0.2	8.4 ± 0.2	>14.9

C_{\max} , $AUC_{0-24\text{ h}}$, and MRT: Each value represents mean \pm SE for five rats.

(>14.9 h) であり、高い皮膚滞留性を示した。

C-3) 光毒性試験

BZPs の *in vitro* 光毒性を評価するため、3T3 NRU PT を実施した。3T3 NRU PT では被験物質を濃度依存的に Balb/c 3T3 細胞に曝露後、UVA 照射/非照射時におけるそれぞれの細胞生存曲線から IC_{50} 値を計算し、それらの比である PIF 値によって *in vitro* 光毒性を評価する。PIF の値に関して、OEDG TG 432 では i) phototoxicity: $PIF \geq 5$, ii) probable phototoxicity: $2 \leq PIF < 5$ および iii) non-phototoxicity: $PIF < 2$ としている。BZPs の UVA 照射時/非照射時における細胞生存曲線によると、BZ および KT については UVA 照射によって細胞生存曲線が低濃度側へシフトし (Fig. 4A), DO, OX および SB の生存曲線は UVA 照射による変化をほとんど認めなかった (Fig. 4B)。BZ および KT の PIF 値はそれぞれ 49.5 および 68.9 と算出され、この値は光毒性の基準値を大きく超えており、すなわち BZ および KT は非常に強い *in vitro* 光毒性を示した。DO, OX および SB の PIF 値は約 1.0 であり、これら 3 化合物は *in vitro* 光毒性を示さなかった。また、MX についてはその溶解度の低さから、調製した濃度において析出が生じ、3T3

NRU PT では評価不能であった。

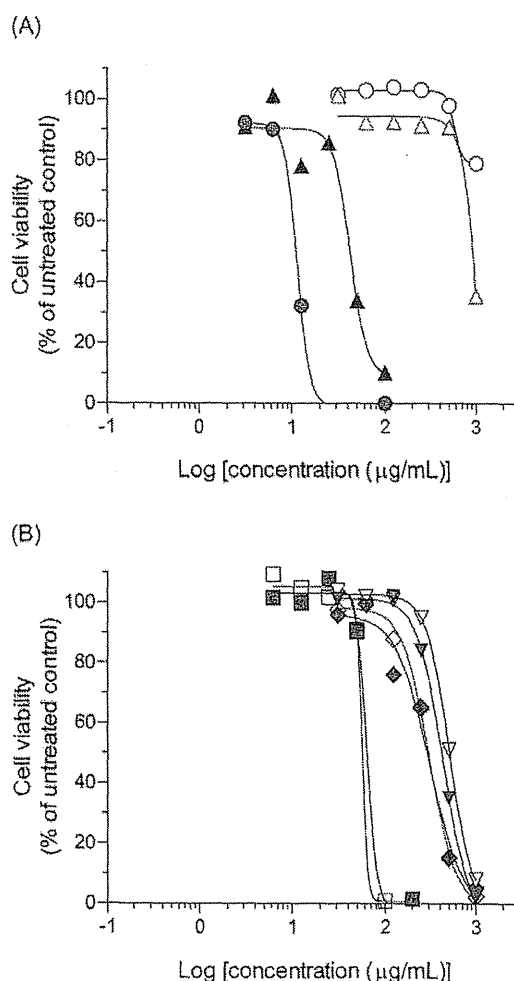


Fig. 4 Photodynamic cytotoxicity of BZ and KT (A), DO, OX and SB (B) in 3T3 NRU PT. \circ , BZ without UVA; \bullet , BZ with UVA; Δ , KT without UVA; \blacktriangle , KT with UVA; \square , DO without UVA; \blacksquare , DO with UVA; \diamond , OX without UVA; \blacklozenge , OX with UVA; ∇ , SB without UVA; and \blacktriangledown , SB with UVA. Each value represents the mean of duplicate measurements.

BZPs の *in vivo* 光毒性を評価すべく、BZPs に対してラットを用いた *in vivo* 光毒性試験を実施した。本試験では各化合物をラットに経皮投与 (10 mg/site) 後、UVA を照射し、UVA 照射前後における皮膚表面の色調変化を *in vivo* 光毒性の指標とした (Fig. 5)。陽性対照である QN の UVA 照射後における ΔE 値は UVA 非照射群と比較して有意に増大し ($P < 0.05$)、陰性対照である EM については UVA 照射群/非照射群の間において ΔE 値に有意な差はなかった。すなわち、本試験では UVA 照射群/非照射群における ΔE 値の差に基づき、化合物の *in vivo* 光毒性評価が可能であると考える。UVA 照射後における BZ および KT の ΔE 値は UVA 非照射群と比較して有意に増大し ($P < 0.05$)、特に BZ の ΔE 値には UVA 照射群/非照射群の間に大きな差があった。MX の ΔE 値は UVA 照射群/非照射群の間に有意な差はなかったが、その値には増加傾向があった ($P = 0.0607$)。つまり、BZ および KT はラットに対して非常に強い *in vivo* 光毒性を惹起し、MX では中程度の *in vivo* 光毒性を観察した。一方で、DO、OX および SB については EM と同様、UVA 照射群/非照射群における ΔE 値の間に差がなく、ラットにおいて *in vivo* 光毒性を示さなかった。

D. 考察

本研究ではモデル化合物である 6 種の BZPs の *in vivo* 光毒性リスクを予測すべく、光化学・光生物学的試験および経皮的 cassette-dosing PK study を実施した。まず、光化学的特性について、全 6 種の BZPs は UV 領域において非常に高い光吸収特性を有しており、その MEC 値は

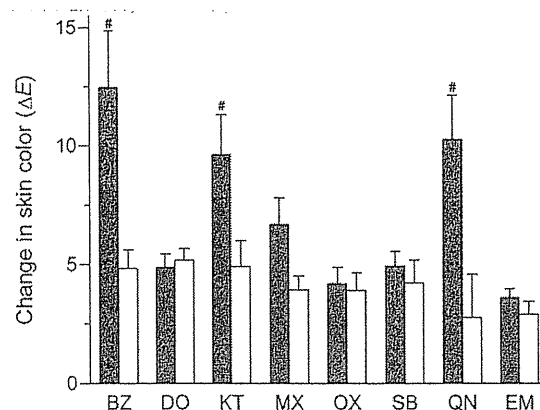


Fig. 5 Colorimetric evaluation of skin inflammation induced by irradiated BZPs. Differences in skin color (ΔE) between before and after irradiation were estimated on the basis of L^* , a^* , and b^* values. QN and EM as positive and negative controls, respectively. Filled bars, UVA-irradiated group; open bars, non-irradiated group. Data represent mean \pm SE of four to five rats. #, $P < 0.05$, significantly different from corresponding non-irradiated groups.

ICH S10 で定められる基準値 (Non-phototoxicity: MEC < 1000) を大きく超えていた。一方で、ROS assay では BZ, KT, MX および OX のみが擬似太陽光照射時に ROS を産生し、DO および SB は ROS 産生を認めなかった。すなわち、BZ, KT, MX および OX は高い光反応性を有しており、光毒性を誘発する可能性があると考えられる。一方で、DO および SB は ROS assay の結果から光毒性を発現するほどの光反応性がないと判断できた。6 種の BZPs の光反応性を比較すると、以下のような順となった。

光反応性：

$$KT > BZ > OX > MX \gg SB \approx DO$$

また、光生物学的試験である *in vitro* 3T3 NRU PT では BZ および KT において UVA 照射によって細胞毒性は増強し、すなわちこの 2 化合物は *in vitro* 光毒性

を示した。MX についてはその水溶性の低さから試験条件下で析出を認め、3T3 NRU PT によって *in vitro* 光毒性評価ができなかったが、他の 5 種の BZPs の *in vitro* 光毒性は以下のような順であった。

in vitro 光毒性：

KT > BZ > OX ≒ SB ≒ DO

経皮的 cassette-dosing PK study では、経皮投与された KT および SB は他の BZPs と比較して高濃度かつ長期間、皮膚中で滞留する事を確認し、これら 2 化合物の皮膚曝露リスクは高いと考える。薬物動態学的パラメーターである C_{max} および MRT を指標として皮膚滞留性を評価すると以下のような順となった。

皮膚滞留性：

KT > SB > OX > MX > BZ > DO

ICH S10 では光毒性化合物の特徴について、化合物が i) 太陽光 ($\lambda=290-700$ nm)

を吸収すること、ii) ROS を含む反応性の高い分子種を生成すること、iii) 露光部位である皮膚や眼に分布しやすいことを挙げている。したがってこの 3 点を評価し、これらのデータを統合的に解析することによる効果的な光毒性リスク予測が可能であると考えられる。そこで、光化学・光生物学的試験および経皮的 cassette-dosing PK study から得られたデータを用いて decision matrix を作成し、BZPs の光毒性リスクを予測した (Table 2)。一般的に、decision matrix は多数の実験から得られたデータを系統的に分析し、判断するために用いられる模式的なデータ表である。ICH S10 にも記載されているように、高い光反応性を有し、露光部位である皮膚や眼への曝露リスクが高い化合物は、光反応性が低く、曝露リスクが低いものと比較して光毒性を引き起こしやすい。つまり、matrix decision

Table 2 Decision matrix for phototoxic risk prediction

Compound	BZ	DO	KT	MX	OX	SB
UV/VIS spectral analysis						
Maximal MEC ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	2,317	10,833	4,350	2,850	6,817	11,700
ROS assay (200 μM)						
$^1\text{O}_2$ ($\Delta A_{440 \text{ nm}} \cdot 10^3$) ^{a)}	219	N.D.	318	69 ^{d)}	147	N.D.
O_2^- ($\Delta A_{560 \text{ nm}} \cdot 10^3$) ^{b)}	N.D.	N.D.	94	N.D. ^{c)}	N.D.	N.D.
3T3 NRU-PT						
PIF	49.5	1.1	68.9	N.A.	1.1	1.0
Pharmacokinetic study						
C_{max} ($\mu\text{g/g tissue}$)	6.1	6.0	8.7	7.8	7.8	7.8
MRT (h)	8.4	7.2	>14.2	8.4	9.3	>14.9

Black cells represent high levels of each crucial factor: MEC values over $1,000 M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ in the UV/VIS spectral analysis; ROS data over criteria in the ROS assay ($^1\text{O}_2$ [$\Delta A_{440 \text{ nm}} \cdot 10^3$]: 25; and O_2^- [$\Delta A_{560 \text{ nm}} \cdot 10^3$]: 20); and relatively higher values of PK parameter in the PK analysis. N.D., not detected; and N.A., not applicable. a) Decrease in $A_{440 \text{ nm}} \times 10^3$. b) Increase in $A_{560 \text{ nm}} \times 10^3$. c) ROS data from irradiated MX (100 μM).

による BZPs の光毒性リスク判定においては、光化学・光生物学的試験および PK study の両データにおいて高レベルと判断された化合物は、その光毒性リスクが高いことを表し、どちらか一方、あるいは両方のレベルが低い化合物はその光毒性リスクは中程度または低いと予測できる。しかしながら、化合物の光反応性が低ければ、たとえそれが露光部位に長時間、多量に曝露されたとしても光毒性を起こす可能性は非常に低くなるため、光反応性が低い化合物は光毒性リスクも低いと判定する。Decision matrix を用いた光毒性リスク予測において、光化学・光生物学的特性については MEC 値、ROS データおよび PIF 値を用い、皮膚蓄積性の指標として C_{max} および MRT を採用した。Decision matrix から、KT は光反応性、*in vitro* 光毒性および皮膚蓄積性の全てで高い光毒性リスクを示し、KT の光毒性リスクは非常に高いことが予測できた。加えて、KT の MRT は他の BZPs と比較して非常に長く、KT は経皮投与後、皮膚中で長時間滞留するために、その光毒性リスクは長時間にわたると考える。BZ については高い光反応性および *in vitro* 光毒性を認めたが、皮膚への蓄積性は比較的低かった。MX および OX は ROS assay において高い光反応性を認め、皮膚蓄積性は中程度であった。OX は *in vitro* 光毒性を示さず、MX の *in vitro* 光毒性は評価不能であったが、この 2 化合物の光反応性は高いことから中程度の光毒性リスクがあると予測した。SB は高い皮膚蓄積性を有していたが、光反応性が非常に低く、*in vitro* 光毒性も観察されなかったため、光毒性リスクは低いと判断した。

DO は光反応性、*in vitro* 光毒性および皮膚蓄積性のすべてにおいて他の化合物と比較して低レベルであったことから、その光毒性リスクは最も低いと予測した。予測した BZPs の光毒性リスクは以下の順であった。

光毒性リスク予測：

KT ≫ BZ > MX > OX ≫ SB ≐ DO

続いて、被験物質である 6 種の BZPs の *in vivo* 光毒性を明らかにするため、ラット光毒性試験を実施した。その結果、UVA 照射によって、BZ, KT および MX はラットに対して光毒性反応を惹起し、他の 3 化合物は *in vivo* 光毒性を認めなかった。実際に観察した *in vivo* 光毒性反応は以下のような順であった。

In vivo 光毒性：

BZ > KT ≫ MX ≫ SB ≐ OX ≐ DO

本評価系の予測精度を検証すべく、本評価系で予測した 6 種の BZPs における光毒性リスクとラットにおいて実際に観測された *in vivo* 光毒性を比較した。

光毒性リスク予測：

KT ≫ BZ > MX > OX ≫ SB ≐ DO

In vivo 光毒性：

BZ > KT ≫ MX ≫ SB ≐ OX ≐ DO

Matrix decision により得られた光毒性リスク予測とラット光毒性試験で観察した *in vivo* 光毒性の順序は良好に対応し、すなわち本評価系が高い予測性を有することを示唆した。しかしながら、OX については光毒性リスク予測と観察された *in vivo* 光毒性の間に乖離があった。今回実施した *in vivo* 光毒性試験では OX の光毒性反応は観察されなかったが、OX は光アレルギー化合物であるという臨床的報告がされてい

る。光アレルギーは光によって励起された化合物が生体内タンパク質などへの付加を介し、抗原性を獲得することで誘発される免疫反応である。光アレルギーの発現には生体における複雑な免疫反応が関与していることから、光アレルギー性化合物は評価が難しく、各種光毒性試験において偽陰性となる場合もあるという報告もされている。今回実施した 3T3 NRU PT およびラット *in vivo* 光毒性試験も例外ではなく、OX の光アレルギーを正確に評価できなかった可能性がある。一方で、ROS assay は各種光毒性反応の発現機序上流部に共通して存在する化合物の光化学的反応 (ROS 産生) を光毒性の指標とするため、理論的には光アレルギーを含む各種光毒性リスクを包括的に予測することができる。そのため、本評価系では化合物の光反応性評価 (ROS assay) を実施することで、OX の光毒性 (光アレルギー) リスクを示唆するデータが得られたと考える。また、3T3 NRU PT は難水溶性化合物の評価が難しいことが課題として挙げられており、MX はその水溶性低さから評価不能であった。3T3 NRU PT では OX および MX の光毒性リスクを適切に評価できなかった一方で、ROS assay では、BZ, KT, OX および MX の光毒性リスクを正確に予測することができ、光反応性のデータは光毒性リスクを予測する上で非常に重要な指標であり、ROS assay を光安全性評価系に取り入れることで包括的な光毒性リスク予測が可能であると考える。

E. 結論

今回の検討では、化合物の光化学・光生

物学的特性評価並びに経皮的 cassette-dosing PK studyの結果を統合的に解析することにより、BZPs の *in vivo* 光毒性リスクを効果的に予測することができた。また、化合物の光反応性を評価することで、光アレルギーを含む各種光毒性リスクを包括的に予測できる事を示唆した。さらに、本評価系では薬物動態学的評価 (皮膚蓄積性評価) に cassette-dosing 法を用いているため、PK study におけるスループットが大幅に向上するだけでなく、使用実験動物数およびコストの大幅な削減が可能である。近年では規制当局から基礎研究や製品開発研究において、3Rs (refinement, reduction, replacement) への貢献を求め動きが強まっており、cassette-dosing 法は, reduction の面からこの要求に応えることが可能であろう。以上より、本評価系は実験動物福祉の向上に貢献しつつ、高い信頼性およびスループットを有する経皮適用化合物の光毒性リスク評価系としての発展が期待できる。実用に向けては、本評価系に対する他の化合物を用いたバリデーション研究が必要であると考えますが、本評価系は創薬を含む製品開発段階における光安全性評価への貢献が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, Satomi Onoue [Development of fluorometric reactive oxygen species assay for photosafety evaluation] *Toxicology in Vitro*,

- 34: 113–9 (2016)
- 2) Satomi Onoue, Hiroto Ohtake, Gen Suzuki, Yoshiki Seto, Hayato Nishida, Morihiko Hirota, Takao Ashikaga, Hirokazu Kouzuki [Comparative study on prediction performance of photosafety testing tools on photoallergens] *Toxicology in Vitro*, **33**: 147–52 (2016)
 - 3) Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Sharon Shui Yee Leung, Hak-Kim Chan, Satomi Onoue [Development of an Improved Inhalable Powder Formulation of Pirfenidone by Spray-Drying: In Vitro Characterization and Pharmacokinetic Profiling] *Pharmaceutical Research*, **in press** (2016) [doi:10.1007/s11095-016-1887-3]
 - 4) Atsushi Uchida, Satomi Onoue, Hiroto Ohtake, Yoshiki Seto, Tsuyoshi Teramatsu, Tomoko Terajima, Toshio Oguchi [Photochemical mechanism of riboflavin-induced degradation of famotidine and a suggested pharmaceutical strategy for improving photostability] *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **in press** (2015) [DOI: 10.1002/jps.24689]
 - 5) Masashi Kato, Gen Suzuki, Hiroto Ohtake, Yoshiki Seto, Satomi Onoue [New photosafety assessment strategy based on the photochemical and pharmacokinetic properties of both parent chemicals and metabolites] *Drug Metabolism and Disposition*, **43(11)**: 1815–22 (2015)
 - 6) Hayato Nishida, Morihiro Hirota, Yoshiki Seto, Gen Suzuki, Masashi Kato, Masato Kitagaki, Mariko Sugiyama, Hirokazu Kouzuki, Satomi Onoue [Non-animal photosafety screening for complex cosmetic ingredients with photochemical and photobiochemical assessment tools] *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **72 (3)**: 578-85 (2015)
 - 7) Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, Masashi Kato, Satomi Onoue [Phototoxic risk assessments on benzophenone derivatives: photobiochemical assessments and dermal cassette-dosing pharmacokinetic study] *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **354(2)**: 195-202 (2015)
 - 8) 尾上 誠良, 世戸 孝樹“紫外線吸収剤の光毒性リスク評価法”(前田 憲寿 監修, シーエムシー出版)「光老化科学の最前線」212–9 (2015)
2. 学会発表
- 1) Yoshiki Seto, Hiroto Ohtake, Masashi Kato, Satomi Onoue: Photosafety Screening on Benzophenones Using Photochemical and Dermal Cassette-dosing Pharmacokinetic Data. 54th Annual Meeting and ToxExpo, San Diego, California, March 22–26, 2015
 - 2) 大竹啓斗、鈴木友季子、加藤尚視、世戸孝樹、尾上誠良：薬物動態並びに物性情報からの光毒性リスク評価：経皮適用化合物の高効率的な光安全性評価を目指して。日本薬学会 第 135 年会 (神戸)、要旨集 vol.4 p.90、2015 年 3 月 26-28 日
 - 3) 青木麻子、鈴木源、加藤尚視、世戸孝樹、尾上誠良：Pirfenidone 粉末吸入製剤の動態ならびに安全性評価。日本薬学会 第 135 年会 (神戸)、要旨集 vol.4 p.91、

2015年3月26-28日

- 4) 世戸孝樹、加藤尚視、尾上誠良：難溶性化合物の光安全性評価を可能とする改良型 ROS assay の開発. 日本薬学会 第135 年会（神戸）、DVD 要旨集、2015 年 3 月 26-28 日
- 5) 大竹啓斗、鈴木源、西田勇人、廣田衛彦、上月祐一、世戸孝樹、尾上誠良：化合物の物性情報に基づく包括的光毒性リスク予測. 日本薬剤学会第 30 年会（長崎）、要旨集 p.208、2015 年 5 月 21-23 日
- 6) 大竹啓斗、鈴木友季子、加藤尚視、世戸孝樹、尾上誠良：ROS assay 並びに皮内動態解析による経皮適用化合物の高効率的 *in vivo* 光毒性リスク評価法の開発第 42 回 日本毒性学会学術年会（金沢）、要旨集 vol.4 p.218、2015 年 6 月 29 日-7 月 1 日
- 7) 西田勇人、廣田衛彦、世戸孝樹、鈴木源、加藤尚視、足利太可雄、上月裕一、尾上誠良：化粧品素材の光安全性保証における ROS assay の適用拡大. 第 42 回 日本毒性学会学術年会（金沢）、要旨集 vol.4 p.218、2015 年 6 月 29 日-7 月 1 日
- 8) 世戸孝樹、大竹啓斗、鈴木友季子、加藤尚視、尾上誠良：光反応性および皮膚内動態に基づく経皮適用剤の戦略的光安全性評価. 第 1 回 日本医薬品安全性学会学術大会（福山）、要旨集 p.94、2015 年 7 月 4-5 日
- 9) 世戸孝樹、尾上誠良：粉末吸入製剤技術による pirfenidone の副作用リスク低減. 第 18 回 間質性肺炎細胞分子病態研究会（東京）、要旨集 p.12、2015

年 8 月 22 日

- 10) Yoshiki Seto, Masashi Kato, Gen Suzuki, Hiroto Ohtake, Satomi Onoue: Identification of the phototoxic metabolite of fenofibrate based on photobiochemical and pharmacokinetic data. EUROTOX 2015, 51st Congress of the European Societies of Toxicology, Porto, Portugal, September 13-16, 2015
- 11) Hiroto Ohtake, Yukiko Suzuki, Masashi Kato, Yoshiki Seto, Satomi Onoue: Photosafety testing of dermally-applied chemicals based on photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2015, Bangkok, Thailand, November 25-27, 2015
- 12) 世戸孝樹、越智幹記、大石亜美、尾上誠良：DNA-intercalating dyes を用いた新規 *in vitro* 光遺伝毒性リスク評価ツールの開発. 日本動物実験代替法学会 第 28 回大会（横浜）、要旨集 p.94、2015 年 12 月 10-12 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
AOP および ITAT に立脚した国際的な安全性評価手法の確立
平成 27 年度分担研究報告書

哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験の評価に関する研究
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

研究要旨

発がん過程の一部である遺伝毒性を検出するための試験のうち、TG490 に記載された「チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験」を評価するための準備を行った。遺伝子突然変異試験である Ames 試験とトランスジェニックげっ歯類遺伝子突然変異試験の陽性・陰性判定が異なる発がん物質を精査した。その中で、マウスリンフォーマ試験のデータの有無を調べた。

A. 研究目的

遺伝毒性は、発がん過程の一部である。遺伝毒性を検出するための試験には *in vitro* では細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）と、哺乳類培養細胞を用いるマウスリンフォーマ試験（MLA）、染色体異常試験、小核試験、コメット試験がある。*in vivo* ではマウス個体を用いる染色体異常試験、小核試験、コメット試験のほかに、トランスジェニックげっ歯類を用いる遺伝子突然変異試験がある。この研究課題では、OECD のテストガイドライン（TG490）が採択されたばかりの、「チミジンキナーゼ遺伝子を用いた哺乳類細胞の *in vitro* 遺伝子突然変異試験」について実際にガイドラインに沿って試験を実施し、TG490 の運用について検討することを目的とする。具体的には、①マウスリンフォーマ試験（MLA）とチミジンキナーゼ（TK）遺伝子座を用いたヒトリンパ芽球株化細胞試験（TK6 試験）による同一化合物に対する遺伝子突然変異誘発性の評価、および②TK6 試験と他の遺伝子突然変異試験の発がん性のスクリーニング試験としての位置づけを検討する。

B. 研究方法

1) 発がん物質についての遺伝子突然変異試験の

判定の精査

厚生労働科学研究費補助金 H24-食品一般-011 平成 26 年度増村健一分担報告書 Appendix 1 (p. 53-64) に記載されている、発がん物質のトランスジェニックげっ歯類遺伝子突然変異試験（TgR 試験）データベースから、Ames 試験陽性で、TgR 試験陰性の物質を検索し、表 1 に必要データをまとめた。さらに、同データベースから、Ames 試験陰性で、TgR 試験陽性の物質を検索し、表 2 に必要データをまとめた。

次に、表 1、表 2 に記載した物質について、MLA の試験結果を追加で調査し、それぞれ得られた情報を表に追記した（表 1 および 2 の赤字）。

2) MLA 試験データの文献調査

Mitchell らが 1976-1993 の文献を調査し、602 の化合物について MLA データを精査し、試験条件の妥当性、試験判定、発がん試験の有無等を一覧表にしている（Mutation Research, 394, 177-303, 1997）。この論文の Table 2 から、適切な発がん試験が実施されている化合物を抜粋し、化合物名、CAS 番号、発がん試験の判定、および MLA の判定を表 3 にまとめた。

次に、上記論文以降に発表された MLA の試験データを検索し、11 報からデータを抜粋した後、条

件別に判定をまとめた (表 4)。

表 3 と表 4 を照合し、表 4 にデータがあった物質については、表 3 の右端のカラムに追記した。

(倫理面への配慮)

本年度は評価の準備のため、試験結果の精査および文献調査をしたので該当しない。

C. 研究結果

1) 発がん物質についての遺伝子突然変異試験の判定の精査

Ames 試験陽性で、TgR 試験陰性の物質の数は 13 (表 1)、Ames 試験陰性で、TgR 試験陽性の物質の数は 15 であった (表 2)。追加調査の結果、sodium nitrite について、陽性の報告があった。kojic acid、metronidazole、cyproterone acetate については、HPRT 遺伝子を用いた突然変異試験で陰性の報告があった。

2) MLA 試験データの文献調査

Mitchell らが 1976-1993 の文献を調査し、602 化合物のデータを精査している。

その中で、発がん試験が適切に実施されている 243 物質のデータを抜粋した (表 3)。

そのうち、MLA のデータがあるものは 209 物質だった。発がん試験の結果の内訳は、陽性が 151、陰性が 45、その他 (equivocal もしくは結論できない) が 13 だった。

発がん試験の結果が陽性の物質 (151) のうち MLA が陽性のものは 114 (75%)、陰性は 0、残りの 37 物質の判定は equivocal もしくは結論できないとされていた。明らかに発がん性があるとされる物質は 100 で、MLA が陽性のものは (79/100) 79%だった。

同じく 209 物質で、発がん試験の結果が陰性の物質は 45、うち MLA が陽性のものは 7 (15%)、陰性は 9 (20%)、残りの 29 物質の判定は equivocal もしくは結論できないとされていた。明らかに発がん性がないとされる物質は 36 で、MLA が陰性の

ものは (7/36) 19%だった。

1999 年以降の文献から CAS 番号を持つ物質の MLA データが 63 得られた (表 4)。その中で表 3 に追記したのは以下の 15 物質である。下線を引いたものは、表 3 でデータがなかったもの 1 物質、equivocal だったもの 1 物質、結論できないとされていたもの 4 物質の合計 6 物質で、これらに陽性もしくは陰性の明確なデータを追加することができた (表 3)。

- ◆ 陽性 (±S9 条件下)
cadmium chloride、cadmium sulfate、methotrexate、mitomycin C
- ◆ 陽性 (+S9 条件下)
4-aminobiphenyl、benzene、benzo[a]pyrene
- ◆ 陽性 (-S9 条件下)
pentachloroethane、caffeine
- ◆ 陽性 (24 時間処理)
phenacetin、isophorone
- ◆ 陰性
1,1,2,2-tetrachloroethane、urethane、zearalenone
- ◆ Equivocal
bromodichloromethane

追加により、MLA のデータがあるものは 210 物質になった。発がん試験の結果の内訳は、陽性が 152、陰性が 45、その他 (equivocal もしくは結論できない) が 13 となった。

発がん試験の結果が陽性の物質 (152) の内訳も MLA 陽性が 116 (76%)、陰性が 3 (2%)、equivocal もしくは結論できないが 33 物質になった。明らかに発がん性があるとされる物質は 100 で、MLA が陽性のものは (81/100) 81%だった。

同じく 210 物質で、発がん試験の結果が陰性の物質は 45、うち MLA が陽性のものは 8 (18%)、陰性は 9 (20%)、equivocal もしくは結論できないとされるものが 28 物質になった。明らかに発がん性がないとされる物質は 36 で、MLA が陰性のもの

は (7/36) 19%だった。

D. 考察

1) 発がん物質についての遺伝子突然変異試験の判定の精査

表1、表2に追記されたデータは、TK遺伝子を用いたMLAではないが、細胞を用いた遺伝子突然変異試験のデータであるので、validationの際には、少なくとも用量設定等で参考になると思われる。

表2における Comfrey は植物であること、Amosite asbestos、Crocidolite asbestos は溶解性に問題があることから、細胞を用いる試験系には不適切な被験物質と考え、共同研究の対象にはしないことにした。

2) MLA 試験データの文献調査

発がん試験とMLA試験の相関を見ると、発がん性があるとされる物質でMLAが陽性になったのは76%で、明らかに発がん性があるとされる物質をMLAが陽性に判定されるものは81%と割合が増加した。一方、発がん性がないとされる物質でMLAが陰性になったのは20%、偽陽性も同程度(18%)だった。発がん性がある物質を陰性と判定すること(偽陰性)は2%だった。これらの数字から、MLAは発がん性があるとされる物質について陽性になる傾向が強く、偽陰性の割合が低いことから、発がん性のスクリーニングに適していると考えられた。

E. 結論

Ames 試験とトランスジェニックげっ歯類遺伝子突然変異試験の陽性・陰性判定が異なる発がん

物質を25物質を共同研究の候補とした。MLAは発がん性のスクリーニングに適していると考えられ、ヒトの細胞を使用するTK6試験も同等の役割を果たせるものと推察した。

F. 健康危惧情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

なし。

2) 雑誌

Matsuda T, Matsuda S, Yamada M, Mutation assay using single-molecule real-time (SMRT™) sequencing technology, Genes & Environ. 37:15 (2015)

2. 学会発表

Yamada M, Takamune M, Matsuda T, Application of a next generation sequencer to a novel mutation test, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (2015.6, Jeju, Korea).

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

表 1 Ames 試験が陽性で TgR 試験が陰性の化合物

	化合物名	発がん標的臓器	TgR 試験を実施した臓器	MLA 判定	<i>in vivo</i> MN 判定
1	Hydrazine sulphate [10034-93-2]	liver, lung	bone marrow, liver*, lung*	+	/
2	Phenobarbital [50-06-6]	liver	liver*	+	—
3	3-Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX) [77439-76-0]	liver, lung	liver*, lung*	+	+
4	Methyl bromide [74-83-9]	stomach	glandular stomach*, liver	+	/
5	3-Amino-1-methyl-5Hpyrido(4,3-b)indole (Trp-P-2) [62450-07-1]	small intestine	caecum, colon, small intestine*	/	/
6	Sodium nitrite [7632-00-0]	liver	liver*, stomach	+	/
7	Malachite green [569-64-2]	liver	liver*	/	—
8	1,2:3,4-Diepoxybutane [1464-53-5]	nasal mucosa, lung, skin, Harderian gland	bone marrow, ovarian granulosa	+	/
9	1,2-Dichloroethane [107-06-2]	stomach, subcutaneous tissue, vascular system, mammary gland, lung, uterus	liver, testes	/	/
10	Acrylonitrile [107-13-1]	ear/Zymbal's gland, nervous system, oral cavity, small intestine, mammary gland, nasal cavity	bone marrow, brain, lung, splenic lymphocytes, testicular germ cells	+	—
11	Genistein [446-72-0]	uterus	heart, mammary gland	+	/
12	Kojic acid [501-30-4]	thyroid	liver	—#	/
13	Metronidazole [443-48-1]	pituitary gland, testes, liver, lung, mammary gland, haematopoietic system	stomach	—#	—

*、発がん標的臓器; #, HPRT locus を用いたアッセイ; 赤字, 文献調査の結果追記した判定

表 2 Ames 試験が陰性で TgR 試験が陽性の化合物

	化合物名	発がん標的臓器	TgR 試験を実施した臓器 [#]	MLA 判定	<i>in vivo</i> MN 判定
1	[4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid [50892-23-4] (AKA Wyeth 14,643)	liver	<u>liver</u> *	/	/
2	Benzene[71-43-2]	lung, haematopoietic (bone marrow, lymphocytes and T-cells) tissues	<u>bone marrow</u> *, <u>lung</u> *, <u>spleen</u> , <u>liver</u>	+	+
3	Oxazepam [604-75-1]	liver	<u>liver</u> *	-	/
4	Procarbazine HCl (Natulan) [366-70-1]	lung, haematopoietic (bone marrow, lymphocytes and T-cells) tissues	<u>bone marrow</u> *, <u>kidney</u> , <u>lung</u> *, <u>spleen</u> , <u>testes</u> , brain, liver	+	+
5	Uracil [66-22-8]	bladder	<u>bladder</u> *	/	/
6	Comfrey [72698-57-8]	liver	<u>liver</u> *	/	/
7	Cyproterone acetate [427-51-0]	liver	<u>liver</u> *	- [#]	+
8	Dicyclanil [112636-83-6]	liver	<u>liver</u> *	/	-
9	Tamoxifen [10540-29-1]	liver	<u>liver</u> *	/	/
10	Amosite asbestos [12172-73-5]	lung	<u>lung</u> *	/	/
11	Crocidolite asbestos [12001-28-4]	lung	<u>lung</u> *, <u>omentum</u>	/	/
12	Ferric nitritotriacetate [16448-54-7]	kidney	<u>kidney</u> *	+	/
13	Hexachlorobutadiene [87-68-3]	kidney	<u>kidney</u> *, bone marrow, liver	/	/
14	Acrylamide [79-06-1]	nervous system, peritoneal cavity, thyroid, clitoral gland, mammary gland, oral cavity	<u>bone marrow</u> , liver, testicular germ cell	+	+
15	CC-1065 [69866-21-3]	lung	<u>liver</u>	/	+

下線, TgR 試験で陽性になった臓器; *, 発がん標的臓器; #, HPRT locus を用いたアッセイ; 赤字, 文献調査の結果追記した判定

表3 Mitchellらの論分[#]に記載の発がん試験結果とMLA判定一覧

	化合物名	CAS番号	MLA判定 ¹⁾	MLA判定追加情報 ²⁾	発がん試験結果 ¹⁾
1	1,1-dimethylhydrazine	57-14-7	+		++
2	1,2-dibromo-3-chloropropane	96-12-8	++		++
3	1,3-dichloropropene	542-75-6	++		++
4	1,4-dichlorobenzene	106-46-7	I		++
5	1,4-dioxane	123-91-1	I		++
6	17-beta-estradiol	50-28-2	I		++
7	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	1746-01-6			++
8	2,4,6-trichlorophenol	88-06-2	+		++
9	2,4-diaminoanisole sulfate	39156-41-7	++		++
10	2,4-diaminotoluene	95-80-7	++		++
11	2,4-toluene diisocyanate	584-84-9	I		++
12	2-acetylaminofluorene	53-96-3	++		++
13	2-aminoanthracene	613-13-8	++		++
14	2-aminoanthraquinone	117-79-3	++		++
15	2-naphthylamine	91-59-8	++		++
16	3,3'-dimethylbenzidine	119-93-7	+		++
17	3-amino-1,2,4-triazole	61-82-5	I		++
18	3-chloro-2-methylpropene	563-47-3	++		++
19	3-methylcholanthrene	56-49-5	++		++
20	4,4'-methylenebis(2-chloroaniline)	101-14-4	++		++
21	4,4'-methylenebis(N,N-dimethylaniline)	101-61-1	++		++

22	4,4'-methylenedianiline 2HCl	13552-44-8	+		++
23	4,4'-oxydianiline	101-80-4	++		++
24	4-aminobiphenyl	92-67-1	++	+ (+S9)	++
25	4-hydroxyaminoquinoline- <i>N</i> -oxide	4637-56-3	++		++
26	4-nitroquinoline- <i>N</i> -oxide	56-57-5	++		++
27	7,12-dimethylbenz[<i>a</i>]anthracene	57-97-6	++		++
28	acrylonitrile	107-13-1	++		++
29	AF-2	3688-53-7	++		++
30	aldicarb	116-06-3	+		++
31	benz[<i>a</i>]anthracene	56-55-3	++		++
32	benzene	71-43-2	+	+ (+S9)	++
33	benzidine	92-87-5	++		++
34	benzidine 2HCl	531-85-1	++		++
35	benzo[<i>a</i>]pyrene	50-32-8	++	+ (+S9)	++
36	β -propiolactone	57-57-8	++		++
37	bis(dimethylamino)benzophenone	90-94-8	++		++
38	bromodichloromethane	75-27-4	+	E (-S9)	++
39	C.I. acid red 26	3761-53-3	I		++
40	C.I. basic red 9	569-61-9	++		++
41	Trypan blue	72-57-1	I		++
42	C.I. direct blue 6	2602-46-2	I		++
43	C.I. disperse orange 2	82-28-0	++		++
44	C.I. disperse yellow 3	2832-40-8	+		++
45	C.I. solvent yellow 3	97-56-3	+		++

46	cadmium chloride	10108-64-2	I	+ (\pm S9)	++
47	cadmium sulfate	10124-36-4	+	+ (\pm S9)	++
48	calcium chromate	13765-49-0	++		++
49	carbon tetrachloride	56-23-5	I		++
50	chlorendic acid	115-28-6	+		++
51	chlorinated paraffines: C12 60% chlorine	108171-26-2	+		++
52	chloroform	67-66-3	+		++
53	cinnamyl anthranilate	87-29-6	++		++
54	cyclophosphamide	50-18-0	++		++
55	di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7			++
56	dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	53-70-3	++		++
57	dichloromethane	75-09-2	+		++
58	dichlorvos	62-73-7	++		++
59	diethylstilbestrol	56-53-1	+		++
60	diglycidyl resorcinol ether	101-90-6	++		++
61	dimethylcaramyl chloride	79-44-7	++		++
62	dimethylvinyl chloride	513-37-1	++		++
63	DL-ethionine	67-21-0	I		++
64	epichlorohydrin	106-89-8	++		++
65	ethyl acrylate	140-88-5	++		++
66	ethyl methanesuofonate	62-50-0	++		++
67	ethylene dibromide	106-93-4	++		++
68	formaldehyde	50-00-0	++		++
69	glycialdehyde	765-34-4	++		++

70	HC blue 1	2784-94-3	I		++
71	hexamethylenetetramine	100-97-0	+		++
72	hydrazine sulfate	10034-93-2	+		++
73	lead(II) acetate	301-04-2			++
74	methyl iodide	74-88-4	I		++
75	methyl methanesulfonate	66-27-3	++		++
76	methylazoxymethanol acetate	592-62-1	++		++
77	mitomycin C	50-07-7	++	+ (\pm S9)	++
78	<i>N,N</i> -ethylenethiourea	96-45-7			++
79	nitrilotriacetic acid, trisodium salt	5064-31-3	I		++
80	nitrofurantoin	67-20-9	++		++
81	nitrofurazone	59-87-0	+		++
82	nitrogen mustard	51-75-2	++		++
83	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	70-25-7	++		++
84	<i>N</i> -nitrosodiethylamine	55-18-5	++		++
85	<i>N</i> -nitrosomorpholine	59-89-2	++		++
86	<i>N</i> -nitrosopiperidine	100-75-4	++		++
87	<i>N</i> -nitrosopyrrolidine	930-55-2	++		++
88	<i>o</i> -toluidine	95-53-4	I		++
89	<i>p</i> -chloroaniline HCl	20265-96-7	+		++
90	phenacetin	62-44-2		+ (24)	++
91	phenazopyridine HCl	136-40-3	+		++
92	phenesterin	3546-10-9			++
93	<i>p</i> -nitrosodiphenylamine	156-10-5	++		++