

表1 注記

- 1) 各出典のデータソース。
- 2) データ入手時のAmes試験判定結果を示す。陽性、陰性、疑陽性、その他、合計の別で示した。
- 3) 重複、除外データを除いたAmes試験判定結果を示す。陽性、陰性、疑陽性、その他、合計の別で示した。
- 4) Ames試験において陽性と判定された物質。laborのみA判定とB判定に分かれる。
A判定: Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg以上で、強い陽性と判定される物質。
B判定: Ames試験における比活性値が1,000 rev/mg未満の陽性判定物質。
- 5) Ames試験において復帰変異株数が陰性対照の2倍に達しないものの、用量依存性があると確認された物質。
- 6) Ames試験において陰性と判定された物質。
- 7) Ames試験データが無い物質。除外扱い。
- 8) 各DBのデータ合計数。

表2 共同研究 Phase I 試験化学物質

(1) 4,018 Chemicals

Class	Mutagenicity	No. of chemicals
A	Strongly Positive (>1,000 rev/mg)	186
B	Positive (< 1,000 rev/mg)	389
C	Negative	3,442
total		4,018

(2) 3,950 Chemicals

Class	Mutagenicity	No. of chemicals
A	Strongly Positive (>1,000 rev/mg)	183
B	Positive (< 1,000 rev/mg)	387
C	Negative	3380
total		3,950

表 3 共同研究参加機関

Builders	QSAR models
1. Lhasa Limited (UK)	DEREK Nexus ver. 4.0.5, SARAH ver. 1.1.2
2. MultiCASE Inc (USA)	CASE Ultra ver.1.5.2.0 rule-based, statistical-based
3. Leadscope Inc (USA)	Leadscope rule-based, statistical-based
4. Prous Institute (Spain)	Symmetry ver.19
5. Bourgas University (Bulgaria)	OASIS TIMES
6. Istituto Superiore di Sanita (Italy)	Toxtree 2.6.6
7. Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (Italy)	SARpy, VEGA, CAESER
8. Swedish Toxicology Science Research Center (Sweden)	SwetoxAZAMES
9. FUJITSU KYUSHU SYSTEMS (Japan)	ADMEWORKS
10. IdeaConsult Ltd. (Bulgaria)	AMBIT
11. Molecular Networks GmbH and Altamira LLC (USA)	ChemTunes Studio

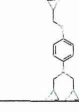

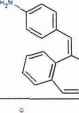
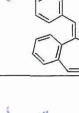
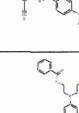
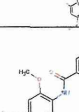
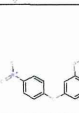
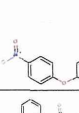
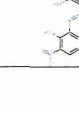

表 4 Phase I 評価結果

Builders	Contact Person	QSAR Models	Sensitivity [A] (%)	Sensitivity [A+B] (%)	Specificity (%)	Concordance (%)	Applicability (%)
Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri (Italy)	Emilio Benfenati	VEGA; Consensus (CASAR, Toxtree, SARpy)	78.0	66.0	70.3	69.7	99.6
		VEGA +MN in ToxRead	81.3	67.3	64.6	65.0	99.6
		CRS4 in ToxRead	68.5	57.1	77.8	74.8	96.8
Swedish Toxicology Science Research Center (Sweden)	Ulf Norinder	Swetox AZAMES	56.2	38.7	91.6	84.1	97.1
Lhasa Limited (UK)	Alex Cayley	Derek_NX ver.4.0.5	72.1	58.6	86.3	82.3	100.0
		Sarah ver.1.1.2	64.7	51.3	82.1	77.7	80.0
Istituto Superiore di Sanita (Italy)	Bossa Cecilia	ToxTree 2.6.6	74.9	65.2	68.2	67.8	99.9
Prous Institute (Spain)	Christine DeMeo	Symmetry S. typhimurium (Ames)-gene mutation in vitro microbial	51.4	43.9	80.4	75.1	99.9
Bourgas University (Bulgaria)	Ovanes Mekenyan	OASIS TIMES (In domain)	79.4	49.5	88.5	82.0	99.9 (domain applicability: 14.5)
		OASIS TIMES (All)	59.3	50.4	77.1	73.3	
Leadscope Inc. (USA)	Glenn Myatt	Rule-based (Alerts)	74.1	60.1	79.1	76.4	94.3
		Statistical-based (QSAR)	76.2	58.6	83.3	79.9	86.0
MultiCASE Inc. (USA)	Roustem Saikhov	BM_PHARMA v1.5.2.0 (Statistical approach; SALM/ECOLI consensus)	65.5	53.0	84.7	80.1	90.3
		GT_EXPERT v1.5.2.0 (Rule based)	81.3	69.8	75.0	74.2	90.7
IdeaConsult Ltd. (Bulgaria)	Nina Jeliazkova	Ambit consensus model	59.1	43.5	86.3	80.2	93.6
FUJITSU KYUSHU SYSTEMS (Japan)	Hitomi Koga	ADMEWORKS/Predictor Ames-V71	58.5	46.5	80.1	76.0	57.1
Molecular Networks GmbH and Altamira LLC	Chitae Yang	ChemTunes v1.0AMES2015-02	77.7	65.7	76.1	74.6	90.3

図1 全ての QSAR ツールで陰性と判定されたエームス強陽性化合物（偽陰性）

Serial_id	result	Structure	ANEI_No.	CAS#	Chemical_Name	overlap	Ames	Comment	構造式に変更があった物質	CAS#ANEI_No.Serial_idに基要があった物質
777	A		2-(10)-175	95465-58-0	N-Ethylideneethylenediamine					
1213	A		7-(4)-724	25187-08-0	2,2',4,4'-Tetrachlorobenzophenone					
2082	A		1-(3)-288	7783-54-2	nitrogen trifluoride					
2159	A		4-(4)-988	87269-99-6	N-(2-Benzoyl-1-ethoxycarbonyl)ethylamine					CAS#が検索出来ない
4670	A		8-(4)-1120	3947-65-7	Neamine					
5152	A		2-(4)-919	132929-84-1	Peroxycarbonic acid OO-(1,1-dimethylbutyl)O-isopropylester					CAS#が検索出来ない
10373	A		2-(1)-31	917-92-0	3,3-Dimethyl-1-Butyne					
10612	A		2-(2)-223	16490-49-6	Chlorotris(dimethylamino)phosphonium chloride					

図2 全てのQSARツールで陽性と判定されたエームス陰性化合物（偽陽性）

Serial_Id	result	Structure	ANEI_No.	CAS#	Chemical_Name	overlap	Ames	Comment	構造式に変更があった物質	CAS#ANEI_No. Serial_Idに変更があった物質
420	C		8-(4)-931	5026-74-4	p-(2,3-Epoxypropyl)-N,N-bis(2,3-epoxypropyl)amine					
2643	C		8-(5)-195	7470-44-2	Saffrole epoxide	Hansen	1			CAS#変更
2914	C		7-(1)-539	119344-09-1	5-(4-Aminobenzylidene)-5H-dibenzo[a,d]cycloheptene					CAS#が検索出来ない
3003	C		7-(1)-544	27980-45-6	5-(4-Nitrobenzylidene)-5H-dibenzo[a,d]cycloheptene					
3202	C		4-(7)-1513	96293-52-6	2-[2-Methyl-4-[N-methyl-N-(3-phenylpropyl)amino]phenylazo]-5-nitrosophthalonitrile					
3466	C		4-(7)-1532	37672-70-1	2-[N-(2-Cyanoethyl)-4-(2,6-dichloro-4-nitrophenylazo)amino]ethylbenzoate					
3946	C		4-(7)-1572	5428-51-3	N-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-4-nitrobenzamide					
4381	C		4-(14)-191	13118-94-0	1,3-bis(4-nitrophenoxy)benzene					
5012	C		4-(14)-209	20638-32-8	4,4'-(1,4-Phenylenedioxy)bis(1-nitrobenzene)					CAS#が検索出来ない
5275	C		5-1162	84285-00-7	3-Hydroxy-4-(2-hydroxy-3,5-dinitrophenylazo)-N-phenyl-2-naphthylacetamide					CAS#が検索出来ない

平成 27 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

研究課題名：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

分担研究課題名：In vivo 遺伝毒性試験 QSAR の開発

In vivo 遺伝毒性試験のデータベース構築と発がん性感受性の検証

研究分担者 森田 健 国立医薬品食品衛生研究所安全性予測評価部 第三室室長
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

要旨

大規模な in vivo 遺伝毒性試験（赤血球小核試験(in vivo MN)およびトランスジェニック齧歯類遺伝子突然変異試験(in vivo TGR)) データベースを構築し、各試験単独ならびに他の試験と組合せた場合の発がん物質検出性、および遺伝毒性指標を同じくする in vitro 試験と in vivo 試験間の一致性を評価した。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 では 379 物質（293 の発がん物質、86 の非発がん物質）、in vivo TGR では 80 物質（76 の発がん物質、4 の非発がん物質）の知見が得られ、感受性および特異性は、in vivo MN で 41.0%および 60.5%、in vivo TGR で 72.4%および “計算せず (nc、あまりにも少ない非発がん物質データのため)” であった。また、各種の遺伝毒性試験との組合せにおける感受性/特異性は、Ames + in vivo MN で 68.7%/45.3%、Ames + in vivo TGR で 83.8%/nc、Ames + in vitro 染色体異常試験(CA)+ in vivo MN で 80.8%/21.3%、Ames + in vitro CA + in vivo TGR で 89.1%/nc、Ames + in vivo MN + in vivo TGR で 87.5%/nc、Ames + in vitro CA + in vivo MN + in vivo TGR で 89.3%/nc であった。Ames + in vitro CA に比べ、Ames + in vivo MN は、比較的バランスのとれた感受性/特異性 (74.3%/37.5%) を示した。また、in vivo MN と in vitro CA の一致性は 50.3%、in vivo TGR と Ames の一致性は 79.5% であった。これらの in vivo 知見あるいは in vitro/in vivo 試験間の相違に関する知見を（定量的）構造活性相関（QSAR）に組込むことが精度向上に必要と考えられた。

A. 研究目的

遺伝毒性の 1 つの指標である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 試験では陰性となるケースが多く知られている。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 試験の発がん物質感受性を評価し、in vitro と in vivo 試験間のギャップの要因を検証することが必要と考えられる。そのため、756 の齧歯類発がん物質および 183 の非発がん物質（計 939 物質）を網羅したカークランドの CGX デー

データベースに、2種の *in vivo* 遺伝毒性試験、すなわち MN と TGR のデータを加え、拡張 CGX データベースを構築し、それら *in vivo* 遺伝毒性試験の単独あるいは他の試験との組合せによる発がん物質検出の感受性・特異性を評価する。付随的に、Ames 試験および *in vitro* 染色体異常試験 (CA) のデータも収集し、これまでに構築した CGX データベースの更新を図る。さらに、遺伝毒性指標を同じくする *in vitro/in vivo* 試験間のデータ比較から、より信頼性の高い *in vitro* および *in vivo* 遺伝毒性試験 QSAR の開発を目指す。

B. 研究方法

B.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、<https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/databases/genotoxicity-carcinogenicity-db>) 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、CAS 番号、構造式、化学物質クラス、DEREK アラートおよび 4 種の *in vitro* 遺伝毒性試験結果 (Ames, MLA, *in vitro* MN, *in vitro* CA) が収載されている。

B.2. *In vivo* 遺伝毒性試験データの検索

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* TGR 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)、ならびに PubMed 文献サーチを用いた。なお、*in vivo* 遺伝毒性試験に関するデータ収集の過程で、新たに Ames および *in vitro* CA のデータが認められた場合には、CGX DB に追加、更新して反映させた。

B.3. データの評価

試験結果は CGX DB (2005 年版) における記載に基づき以下の 4 つに分類した。すなわち、+ : 陽性、- : 陰性、E (equivocal、不明確) : 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、および TC (technically compromised、技術的に問題あり) : 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。なお、*in vivo* 試験において TC に該当する要因の 1 つに、標的臓器の曝露が挙げられるが、今回利用した情報源のすべてが標的臓器曝露に関する知見を収載しているものではないため、*in vivo* 試験に対しては、TC は適用しなかった。また、*in vivo* TGR における陽性 (+) の意味は、少なくとも 1 つの発がん標的部位で陽性、陰性 (-) の意味は、TGR で評価したすべての発がん標的部位で陰性、である。なお、陽性および陰性は、その内容によって細分化した。すなわち、+^ : TGR で陽性だが発がん標的部位ではない、-^ : TGR 陰性だが発がん標的部位ではない。なお、*in vitro* CA において、10 mM 超および 2 mg/mL 超の濃度での陽性の知見は、現行のガイドライン規定を超える過剰な高用量における陽性知見のため、陰性と判断した。すなわち、CGX DB (2005 年版) で *in vitro* CA 陽性と評価さ

れた 12 物質 (7 つの発がん物質および 5 つの非発がん物質) は、本解析では陰性と評価した。

C. 研究結果

C.1. 収集された in vivo 遺伝毒性試験データ

CGX データセット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 24 物質、陰性が 162 および 52 物質、不明確が 11 および 10 物質であった (表 2)。また、in vivo TGR においては 80 物質 (発がん物質 76、非発がん物質 4) が認められたが、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。76 の発がん物質については、陽性が 55 物質、陰性が 21 物質であった (表 2)。なお、収集・整備したデータを CGX DB の発がん物質については Appendix 1 に、非発がん物質については Appendix 2 にまとめた。

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

- ID C17, Acrylonitrile (陰性)
ラット静脈内 (iv) 投与による陽性知見が認められたが、マウス iv 投与を始め他の試験で陰性であったことから、陰性と評価した。
- ID C179, Chlorpromazine hydrochloride (陽性)
低体温による陽性知見とされており、閾値のある二次的な遺伝毒性作用様式 (MOA) と考えられるが、ハザードとしては陽性と評価した。
- ID C197, C.I. Sovent yellow 3 (o-aminoazotoluene) (陽性)
種差が認められ、マウスで陽性、ラッ

トで陰性であった。マウスの陽性知見をハザードとして重視した。

- ID C246, 1,2-dibromoethane (不明確、E)
投与経路差が認められ、経口投与および腹腔内 (ip) 投与では陰性であったが、吸入投与では陽性であった。標的臓器曝露や代謝などの妥当性評価が困難であることから不明確とした。
- ID C285, 3,3'-dimethoxybenzidine 2HCl (陰性)
本物質のデータは認められなかったが、遊離塩基 (119-90-4) の陰性知見に基づいた。
- ID C378, Haloperidol (陽性)
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。ハザードとして陽性と評価した。
- ID C439, Mercuric chloride (陽性)
種差が認められ、マウスで陽性、ラットで陰性であった。マウスの陽性知見をハザードとして重視した。
- ID C466, 4,4'-methylenedianiline 2HCl (陽性)
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。
- ID C478, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyrridyl)-1-(butanone) (NNK) (不明確)
陰性と陽性の知見がそれぞれ 1 つずつある。陽性知見は、マウスにおける 52 週間の皮下投与によるものであり、妥当性評価が困難であることから不明確とした。
- ID C509, Sodium nitrite (不明確)
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不明確とした。なお、OECD の SIDS では陽性と評価している。

- ID C631, Phenylhydrazine HCl (陽性)
本物質のデータは認められなかったが、遊離塩基 (100-63-0) の陽性知見に基づいた。
- ID C657, Pyrimethamine (陽性)
種差が認められ、マウスで陰性、ラットで陽性であった。ラットの陽性知見をハザードとして重視した。
- ID C660, Reserpine (陽性)
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。ハザードとして陽性と評価した。
- ID C672, Sodium dichromate (陽性)
投与経路差が認められ、ip 投与では陽性であったが、経口投与では陰性であった。標的臓器曝露や代謝などの妥当性評価は困難であるものの、ハザードとして陽性と評価した。
- ID C676, Styrene (陽性)
種差が認められ、マウスで陽性、ラットで陰性であった。マウスの陽性知見をハザードとして重視した。
- ID C711, o-Toluidine (陽性)
種差が認められ、マウスで陰性、ラットで陽性であった。ラットの陽性知見をハザードとして重視した。

非発がん物質

- ID NC8, dl-Amphetamine sulfate (陽性)
本物質のデータは認められなかったが、遊離塩基 (300-62-9) の陽性知見に基づいた。
- ID NC73, EDTA, trisodium salt trihydrate (陰性)
本物質のデータは認められなかったが、disodium salt (6381-92-6) の陰性知見に基づいた。なお、disodium salt において陽性知見も認められたが、EURAR では信頼性の低い知見とし、

陰性と結論付けている。

- ID NC91, Sodium fluoride (不明確)
カークランドらの総説³⁾での評価は単一の陽性知見に基づき陽性と評価しているが、他に3つの陰性知見が認められたため、不明確とした。
- ID NC138, Phenol (陽性)
低体温による陽性知見とされている。ハザードとして陽性と評価した。

また、in vivo TGR において+^ (TGR 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-^ (TGR 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：

+^ (TGR で陽性だが発がん標的部位ではない)

- ID C244, 1,2-dibromo-3-chloropropane
TGR は、精巣で陽性だが、肝臓で陰性。発がん標的臓器は、ラットでは鼻腔、口腔、胃、副腎および乳腺、マウスでは肺、鼻腔および胃。
- ID C246, 1,2-Dibromoethane
TGR は、鼻粘膜および精巣で陽性だが、肺および肝臓で陰性。発がん標的臓器は、鼻腔、腹腔、下垂体、胃、肝、肺および乳腺。
- ID C340, Ethyl methanesulphonate
TGR は、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。発がん標的臓器は、腎、肺および胸腺。
- ID C457, 3-methylcholanthrene
TGR は、肝臓で陽性。発がん標的臓器は、肺、および胸腺。
- ID C492, Mitomycin C
TGR は、骨髄および肝臓で陽性だが、小腸および精巣で陰性。発がん標的臓器は、小腸、乳腺および腹腔。

- ID C702, Thio-tepa
TGR は、脾臓リンパ細胞で陽性。発がん標的臓器は、耳/ジンバル腺、造血系、皮膚、乳腺および包皮腺。

-^(TGR陰性だが発がん標的部位ではない)

- ID C17, Acrylonitrile
TGR は、骨髄、脳、肺および脾臓リンパ細胞および精巣生殖細胞で陰性。発がん標的臓器は、耳/ジンバル腺、神経系、口腔、小腸、乳腺および鼻腔。
- ID C257, 1,2-Dichloroethane
TGR は、肝臓および精巣で陰性。発がん標的臓器は、胃、皮下組織、血管系、乳腺、肺および子宮。
- ID C489, Metronidazole
TGR は、胃で陰性。発がん標的臓器は、下垂体、精巣、肝、乳腺、肺および造血系。
- ID C683, SX Purple
TGR は、肝臓および胃で陰性。Carcinogenic Potency Database では、明確な発がん標的臓器は示されていない。

C.2. 感受性・特異性解析

Ames および *in vitro* CA の感受性、特異性および一致性を表 3 に示す。E (不明確) を陽性にも陰性にも計数しなかった場合、Ames の感受性は 59.0% (321/544)、特異性は 73.9% (130/176)、一致性は 62.6% (451/720) であった。In *vitro* CA では、それぞれ 62.8% (225/658)、48.5% (66/136) および 58.9% (291/494) であった。で良好といえるものではなかった。これらの値はカークランドらによる最初の CGX DB に基づく報告と同様であった (Ames ではそれぞれ 58.8%、73.9% および 62.5%、*in vitro* CA ではそれぞれ 65.6%、44.9% および 59.8%)。In *vivo* MN および *in vivo* TGR

の感受性、特異性および一致性を表 2 に示す。E (不明確) を陽性にも陰性にも計数しなかった場合、*in vivo* MN の感受性は 41.0% (120/293)、特異性は 60.5% (52/86)、一致性は 45.4% (172/379) であった。一方、*in vivo* TGR の感受性は、72.4% (55/76) と比較的高いものであった。なお、*in vivo* TGR 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 vitro* CA を組合せた場合の感受性および特異性をそれぞれ表 4 および表 5 に示した。発がん物質について Ames と *in vitro* CA 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 74.3% であった。一方、非発がん物質について Ames と *in vitro* CA の両試験を実施して、両方の試験で陰性となる特異性は 37.5% であった。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 6 および表 7 に示した。発がん物質について Ames と *in vivo* MN の両試験を実施した場合の感受性 (少なくとも 1 つ試験で陽性) は 68.7% で、カークランドらが 2005 年に報告した Ames と他の *in vitro* 試験 (MLA, *in vitro* MN, *in vitro* 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 の両試験を実施した場合の特異性 (両方の試験で陰性) は 45.3% で、Ames と他の *in vitro* 試験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。Ames と *in vivo* TGR を組合せた場合の感受性を表 8 に示した。Ames + *in vivo* TGR の感受性は高く、83.8% であった。特異性は、非発がん物質のデータが極めて少ないため、算出しなかった。これらをもとに、Ames、*in vitro* CA、*in vivo* MN あるいは *in vivo* TGR のうち、Ames を含む 3

あるいは4試験の組合せによる感受性を算出した(表9)。3試験の組合せによる感受性は、Ames + in vitro CA + in vivo MNで80.8%、Ames + in vitro CA + in vivo TGRで89.1%、Ames + in vivo MN + in vivo TGRで87.5%であった。また4試験すべての組合せ(Ames + in vitro CA + in vivo MN + in vivo TGR)では89.3%であった。3あるいは4試験の組合せによる特異性は、Ames + in vitro CA + in vivo MNでのみ算出されたが、21.3%と低いものであった(表10)。

C.3. In vitro – in vivo 試験間の比較

CGX DBではin vitro MNのデータが記載されているが、発がん物質に対する試験データ数は89件であり、in vitro CAの352件に比べ圧倒的に少ない。そこで、in vivo MNに対する染色体異常を指標とするin vitro試験との比較においてはin vitro CAを選択した。In vivo MNとin vitro CAの一致性を表11に示した。両試験の一致性は50.3%(151/300)であった。多くの物質(70の発がん物質と21の非発がん物質)がin vitro CAで陽性、in vivo MNで陰性を示す一方、27物質(17の発がん物質および10の非発がん物質、表12)がin vitro CAで陰性、in vivo MNで陽性を示した。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Ames試験とMLAのデータが記載されている。MLAは遺伝子突然変異に加え染色体異常誘発性をも検出可能な試験系とされていることから、Ames試験をin vivo TGRの対照in vitro試験として選択した。In vivo TGRとAmesの一致性を表13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(79.5%、62/78)を示した。Amesにおける不明確(E)の1物質を除く15物質が不一致となり、そのうち、5つの発がん物質

がAmesで陰性だがTGRで陽性、8つの発がん物質がAmesで陽性だがTGRで陰性、2つの非発がん物質がAmesで陽性だがTGRで陰性を示した(表14)。

D. 考察

CGX DBの化学物質セットについて、in vivo MNとin vivo TGRのデータを収集・解析した結果を表15および図1に要約した。In vivo MNの感受性は41.0%、特異性は60.5%、in vivo TGRの感受性は72.9%であった(特異性は、非発がん物質に対するTGRのデータが極めて少なかったため、評価しなかった)。In vivo MNの感受性は、カーランドらによるin vitro試験の報告(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%)。また、Amesとin vivo MNを組合せた場合の感受性は68.7%、特異性は45.3%を示し、一般的なin vitro試験の組合せであるAmes + in vitro CAの感受性74.3%、特異性37.5%と同程度であった。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試験および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 + in vivo MN + in vivo TGRは高い感受性(87.5%)を示し、ICHのオプション1であるAmes + in vitro CA + in vivo MNの感受性(80.8%)よりも若干高かった。オプション1でin vitro陽性の場合に想定される4試験の組合せであるAmes + in vitro CA + in vivo MN + in vivo TGRの感受性も同様に高かった(89.3%)。これらの知見は、2つめのin vivo試験を適切に選択すれば、オプション2は、オプション1と同様、発がん物質の検出に有効に働くことを示唆している。In vivo TGR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。TGR をより適切に利用するためには、発がん性との比較において、発がん標的臓器と遺伝子突然変異標的臓器の相違の要因、例えば、動物種、系統、投与期間、投与経路、ならびにそれらに関連する化学物質の吸収や代謝について検討することが必要と考えられる。

In vivo - *in vitro* 試験間の比較では、Ames と *in vivo* TGR の一致性は 79.5%、*in vitro* CA と *in vivo* MN の一致性は 50.3% であった。*In vivo* MN は、ジアルキルニトロソ化合物、金属化合物、芳香族アミン類、ハロゲン化合物に対する感受性が低いことが示されているが、*in vitro* 陰性だが *in vivo* 陽性となる物質 (体温変化などの遺伝毒性メカニズムによらない *in vivo* 陽性を除く) の特徴やそのメカニズムの検証が必要である。*In vivo* - *in vitro* 試験間のそれぞれの比較において、不一致を示した化学物質の特性等の解明が、より精度の高い QSAR の開発につながるものと考えられる。

E. 結論

CGX DB を利用し、これまでにない大規模な *in vivo* 遺伝毒性試験 (*in vivo* MN および *in vivo* TGR) のデータベース (拡張 CGX DB) を構築した。構築したデータベースをもとに感受性および特異性を評価した結果、*in vivo* MN の感受性は 41.0%、特異性は 60.5%、*in vivo* TGR の感受性は 72.4% であった。試験を組合せた場合の感受性/特異性は、Ames + *in vivo* MN で 68.7%/45.3% で、Ames + *in vitro* CA の 74.3%/37.5% と同程度であり、また、Ames + *in vivo* TGR では 83.8%/nc と、高い感受性を示した。また、*in vivo* MN と *in vitro*

CA の一致性は 50.3%、*in vivo* TGR と Ames の一致性は 79.5% であった。これらの *in vivo* 知見あるいは *in vitro*/*in vivo* 試験間の相違に関する知見を (定量的) 構造活性相関 (QSAR) に組込むことが精度向上に必要と考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

T. Morita, Y. Uno, M. Honma, H. Kojima, M. Hayashi, R.R. Tice, R. Corvi, L. Schechtman, The JaCVAM International Validation Study on the *in vivo* Comet Assay: Selection of Test Chemicals, *Mutation Research* 786-788 (2015) 14-44.

Y. Uno, H. Kojima, T. Omori, R. Corvi, M. Honma, L.M. Schechtman, R.R. Tice, B. Burlinson, P. Escobar, A.R. Kraynak, Y. Nakagawa, M. Nakajim, K. Pant, N. Asano, D. Lovell, T. Morita, Y. Ohno, M. Hayashi, JaCVAM-organized international validation study of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: I. Summary of pre-validation study results, *Mutation Research* 786-788 (2015) 3-13.

Y. Uno, H. Kojima, T. Omori, R. Corvi, M. Honma, L.M. Schechtman, R.R. Tice, C. Beevers, M. De Boeck, B. Burlinson, C.A. Hobbs, S. Kitamoto, A.R. Kraynak, J. McNamee, Y. Nakagawa, K. Pant, U. Plappert-Helbig, C. Priestley, H. Takasawa, K. Wada, U. Wirtzner, N. Asano, P. Escobar, D. Lovell, T. Morita, M.

Nakajim, Y. Ohno, M. Hayashi, JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay for detection of genotoxic carcinogens: II. Summary of definitive validation study results, Mutation Research 786-788 (2015) 45-76.

S. Hamada, W. Ohyama, R. Takashima, K. Shimada, K. Matsumoto, S. Kawakami, F. Uno, H. Sui, Y. Shimada, T. Imamura, S. Matsumura, H. Sanada, K. Inoue, S. Muto, I. Ogawa, A. Hayashi, T. Takayanagi, Y. Ogiwara, A. Maeda, E. Okada, Y. Terashima, H. Takasawa, K. Narumi, Y. Wako, K. Kawasako, M. Sano, N. O., T. Morita, H. Kojima, M. Honma, M. Hayashi, Evaluation of the repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: Summary of the collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/The Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS) – Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS), Mutation Research 780-781 (2015) 2-17.

森田 健, LD50 値による毒性評価手法の変遷, 中毒研究, 28, 388-391, 2015.

J.T. MacGregor, R. Frötschl, P.A. White, K.S. Crump, D.A. Eastmond, S. Fukushima, M. Guérard, M. Hayashi, L. Soeteman-Hernandez, T. Kasamatsu, D. Levy, T. Morita, L. Müller, R. Schoeny, M.J. Schuler, V. Thybaud, G.E. Johnson, IWGT Report on Quantitative

Approaches to Genotoxicity Risk Assessment I. Methods and metrics for defining exposure-response relationships and points of departure (PoDs), Mutation Research 783 (2015) 55-65.

J.T. MacGregor, R. Frötschl, P.A. White, K.S. Crump, D.A. Eastmond, S. Fukushima, M. Guérard, M. Hayashi, L. Soeteman-Hernandez, G.E. Johnson, T. Kasamatsu, D.D. Levy, T. Morita, L. Müller, R. Schoeny, M.J. Schuler, V. Thybaud, IWGT report on quantitative approaches to genotoxicity risk assessment II. Use of point-of-departure (PoD) metrics in defining acceptable exposure limits and assessing human risk, Mutation Research 783 (2015) 66-78.

Y. Uno, T. Morita, M. Luijten, C. Beevers, S. Hamada, S. Itoh, W. Ohyama, H. Takasawa, Recommended protocols for the liver micronucleus test: report of the IWGT working group, Mutation Research 783 (2015) 13-18.

Y. Uno, T. Morita, M. Luijten, C. Beevers, S. Hamada, S. Itoh, W. Ohyama, H. Takasawa, Micronucleus test in rodent tissues other than liver or erythrocytes: report of the IWGT working group, Mutation Research 783 (2015) 19-22.

○S. Canipa, A. Cayley, W.C. Drewe, R.V. Williams, S. Hamada, A. Hirose, M. Honma, T. Morita, Using in vitro structural alerts for chromosome damage to predict in vivo activity and direct future testing, Mutagenesis, 31, 17-25,

2016.

○T. Morita, S. Hamada, K. Masumura, A. Wakata, J. Maniwa, H. Takasawa, K. Yasunaga, T. Hashizume, M. Honma, Evaluation of the sensitivity and specificity of in vivo erythrocyte micronucleus and transgenic rodent gene mutation tests to detect rodent carcinogens, Mutation Research, 802 (2016) 1-29.

学会発表

T. Morita, GHS classification of CMR substances in EU and Japan, AsiaTox 2015、濟州島、韓国、2015年6月23-26日。

森田 健、CMR物質のGHS分類比較：EUと日本、第42回日本毒性学会、金沢、2015年6月29日-7月1日。

森田 健、LD50値による毒性評価と行政利用、第37回日本中毒学会合同シンポジウム、和歌山、2015年7月17-18日。

○T. Morita, S. Hamada, K. Masumura, M. Honma, Detection of rodent carcinogens and non-carcinogens by in vivo erythrocyte micronucleus and transgenic rodent mutation tests, EEMS 2015, 23-27 August 2015, Prague, Czech Republic.

S. Hamada, T. Morita, K. Narumi, Y. Wako, K. Kawasako, W. Ohyama, M. Honma, M. Hayashi, Detection of hepatocarcinogens by combination of liver micronucleus assay and

histopathological examination in 2-week or 4-week repeated dose studies, 46th Annual EMGS (Environmental Mutagenesis and Genomics Society) meeting, September 26-30, 2015, New Orleans, Louisiana.

Horibata K, Yamada M, Ukai A, Kimoto T, Chikura S, Miura D, Itoh S, Muto S, Uno Y, Sanada H, Takashima R, Shigano M, Takasawa H, Hamada S, Yamamoto M, Hori H, Tsutsumi E, Wada K, Maeda A, Kikuzuki R, Ogiwara Y, Kyoya T, Adachi H, Uematsu Y, Yoshida I, Narumi K, Fujiishi Y, Fukuda T, Suzuki Y, Goto K, Morita T, Honma M, Interlaboratory Trial of the PIGRET Assay As a Short-term Genotoxicity Test: Collaborative Study by Mammalian Mutagenicity Study (MMS) Group of Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS). 46th Annual EMGS (Environmental Mutagenesis and Genomics Society) meeting, September 26-30, 2015, New Orleans, Louisiana.

Hamada S, Morita T, Narumi K, Wako Y, Kawasako K, Ohyama W, Honma M, Hayashi M, Detection of hepatocarcinogens by combination of liver micronucleus assay and histopathological examination in 2-week or 4-week repeated dose studies, 46th Annual EMGS (Environmental Mutagenesis and Genomics Society) meeting, September 26-30, 2015, New Orleans, Louisiana.

濱田修一、森田健、成見香瑞範、涌生ゆみ、川迫一史、大山ワカ子、本間正充、林真、4週間の反復投与毒性試験結果（肝臓小核試験および病理組織学的検査）から肝発がん性を予測する、関西実験動物研究会第128回研究会、平成27年12月4日（金）、京都大学楽友会館。

○増村健一、森田健、本間正充、トランスジェニック動物遺伝子突然変異試験におけるin vivo変異原性と発がん性の相関に関する研究、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日～10日、名古屋国際会議場。

○森田健、濱田修一、増村健一、本間正充、In vivo赤血球小核試験とトランスジェニック齧歯類突然変異試験による齧歯類発がん物質の検出、日本環境変異原学会第44回大会、2015年11月27～28日、九州大学。

森田健、畝山智香子、カラメル色素中の4-メチルイミダゾールのリスク評価、日本環境変異原学会第44回大会、2015年1月27～28日、九州大学。

堀端克良、山田雅巳、鵜飼明子、木本崇文、千蔵さつき、三浦大志郎、伊東悟、武藤重治、宇野芳文、真田尚和、高島理恵、志賀野美幸、高沢博修、濱田修一、山本美佳、堀妃佐子、堤絵梨、和田邦生、前田晃央、菊月隆太、荻原庸介、京谷恭弘、足立秀樹、上松泰明、吉田唯真、成見香瑞範、藤石洋平、福田隆之、鈴木裕太、後藤玄、森田健、本間正充、PIGRETアッセイの短期試験としての有用性：MMS共同研究報告、日本環境変異原学会第44回大会、2015年11月27～28日、九州大学。

本田大士、藤田侑里香、松村奨士、川本泰輔、伊藤勇一、森田健、西山直宏、染

色体異常試験の陽性物質リストから有用な偽陽性原料を救え II、数学的手法を用いた大規模遡及評価、日本環境変異原学会第44回大会、2015年11月27～28日、九州大学。

公刊図書・書籍

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 In vivo 小核試験データの収集に用いた主な資料

<p>レビュー論文</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Mayournin et al (1990) The in vivo 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. ➤ Kirkland et al (2008) Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop. <i>Mutat Res.</i> 653, 99-108. ➤ Kirkland et al (2008) Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing in vivo. <i>Mutat Res.</i> 654, 114-132. ➤ Kirkland et al (2011) 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. <i>Mutat Res.</i> 721, 27-73. <p>大規模試験報告書</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Shelby et al (1993) Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. <i>Environ Mol Mutagen</i>, 21, 160-179. ➤ Morita et al (1997) 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. ➤ Wakata et al (1998) 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. ➤ Witt et al (2000) Micronucleated Erythrocyte Frequency in Peripheral Blood of B6C3F1 Mice from Short-Term, Prechronic, and Chronic Studies of the NTP Carcinogenesis Bioassay Program. <i>Environ. Mol. Mutagen</i>. 36, 163-194. ➤ Hamada et al (2001) 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. <p>国際的化学品評価文書</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ EU RAR: EU RAR Search, http://esis.jrc.ec.europa.eu/index.php?PGM=ora ➤ SIDS: SIDS Search, http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/sidspub.html OR OECD Existing Chemicals Database Search, http://webnet.oecd.org/hpv/UI/Search.aspx ➤ EHC, CICAD, IARC: IPCS INCHEM Search, http://www.inchem.org/ <p>NTP データサーチ</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ NTP Database Search Home Page, http://tools.niehs.nih.gov/ntp_tox/ <p>PubMed 文献サーチ</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ PubMed: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ (検索語: CAS 番号あるいは化学物質名、micronucle*, rodent)

表 2 In vivo MN および in vivo TGR の感受性および特異性

Carcinogenicity	in vivo MN				TGR			
	+	E	-	Total	+	E	-	Total
+	120	11	162	293	55	0	21	76
-	24	10	52	86	0	0	4	4
Total	144	21	214	379	55	0	25	80
Sensitivity ^a	41.0% (120/293)				72.4% (55/76)			
Specificity ^a	60.5% (52/86)				Not calculated due to small numbers of non-carcinogens			
Concordance ^a	45.4% (172/379)				Not calculated			

+ , Positive; - , Negative; E, Equivocal

a: Equivocal (E) results were not counted either as positive or negative, but they were included in the total number.

If E results are considered positive, the performance is as follows:

in vivo MN: sensitivity, 44.7% (131/293); specificity, 60.5% (52/86), concordance, 48.3% (183/379)

If E results are considered negative, the performance is as follows:

in vivo MN: sensitivity, 41.0% (120/293); specificity, 72.1% (62/86), concordance, 48.0% (182/379)

表 3 Ames および in vitro CA の感受性および特異性

Carcinogenicity	Ames				in vitro CA			
	+	E	-	Total	+	E	-	Total
+	321	8	215	544	225	15	118	358
-	40	6	130	176	56	14	66	136
Total	361	14	345	720	281	29	184	494
Sensitivity ^a	59.0% (321/544)				62.8% (225/358)			
Specificity ^a	73.9% (130/176)				48.5% (66/136)			
Concordance ^a	62.6% (451/720)				58.9% (291/494)			

+ , Positive; - , Negative; E, Equivocal

a: Equivocal (E) results were not counted either as positive or negative, but they were included in the total number.

If E results are considered positive, the performance is as follows:

Ames: sensitivity, 60.5% (329/544); specificity, 73.9% (130/176), concordance, 63.8% (459/720)

in vitro CA: sensitivity, 67.0% (240/358); specificity, 48.5% (66/136), concordance, 61.9% (306/494)

If E results are considered negative, the performance is as follows:

Ames: sensitivity, 59.0% (321/544); specificity, 77.3% (136/176), concordance, 63.5% (457/720)

in vitro CA: sensitivity, 62.8% (225/358); specificity, 58.8% (80/136), concordance, 61.7% (305/494)

表 4 Ames と in vitro CA の組合せにおける感受性

Ames	in vitro CA			Total
	+	E	-	
+	149	8	35	192
E	5	0	2	7
-	63	7	81	151
Total	217	15	118	350

No. of carcinogens tested in both tests (A): 350

No. (%) of clear positive results in both tests (B): 149 (42.6%)

No. (%) of clear positive results in only 1 of the two tests (C): 111 (31.7%)

Sensitivity (i.e., clearly positive in at least 1 test when both conducted $([B+C]/A)^a$: 74.3%

+, Positive; -, Negative; E, Equivocal

a: If E results are considered positive, the sensitivity is 76.9% (269/350).

表 5 Ames と in vitro CA の組合せにおける特異性

Ames	in vitro CA			Total
	+	E	-	
+	19	2	15	34
E	3	0	2	5
-	34	12	51	97
Total	56	14	66	136

No. of non-carcinogens tested in both tests (A): 136

No. of clear negative results in both tests (B): 51

Specificity $(B/A)^a$: 37.5%

+, Positive; -, Negative; E, Equivocal

a: If E results are considered negative, the specificity is 47.8% (65/136).

表 6 Ames と in vivo MN の組合せにおける感受性

Ames	in vivo MN			Total
	+	E	-	
+	79	7	73	159
E	2	0	2	4
-	34	4	83	121
Total	115	11	158	284

No. of carcinogens tested in both tests (A): 284

No. (%) of clear positive results in both tests (B): 79 (27.8%)

No. (%) of clear positive results in only 1 of the two tests (C): 116 (40.8%)

Sensitivity (i.e., clearly positive in at least 1 test when both conducted $([B+C]/A)^a$: 68.7%

+, Positive; -, Negative; E, Equivocal

a: If E results are considered positive, the sensitivity is 70.8% (201/284).

表 7 Ames と in vivo MN の組合せにおける特異性

Ames	in vivo MN			Total
	+	E	-	
+	6	2	11	19
E	2	0	2	4
-	16	8	39	63
Total	24	10	52	86

No. of non-carcinogens tested in both tests (A): 86

No. of clear negative results in both tests (B): 39

Specificity $(B/A)^a$: 45.3%

+, Positive; -, Negative; E, Equivocal

a: If E results are considered negative, the specificity is 60.0% (49/86).