

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

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 (H27-化学-指定-005)

分担研究課題名：In vivo 遺伝毒性試験 QSAR の開発；新規 in vitro 染色体損傷アラートの抽出
とその in vivo 染色体損傷アラートへの適用

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

研究要旨

化学物質の遺伝毒性活性は *in vivo* と *in vitro* で必ずしも良好に相関するわけではないが、特定の化学物質クラスでは両者に十分な一致が認められる場合がある。しかし、このような相関性に該当するケースを立証することや、最適な試験デザインを選択して *in vivo* での有害性を明らかにすることは困難である。この点を踏まえ、*in silico* 評価システム Derek Nexus における *in vitro* 染色体損傷の既存の構造アラートに関し、*in vivo* 活性との相関性を評価した。これらの構造アラートの *in vivo* 染色体損傷（小核）データセットに対する予測性を評価し、次にアラートの妥当性を評価した。構築した小核（MN）試験とトランスジェニック動物突然変異（TG）試験の広範なデータベースに基づき、化学物質の生体内活性と試験デザインまたは遺伝毒性メカニズムとの意味がある関連性ととも、アラートを新規に構築あるいは更新した。本手法により *in vitro* アラートを更新した結果、データセットに対する Derek Nexus の *in vivo* 染色体損傷予測性は著しく改善された。アラートに追加された *in vivo* 活性や試験デザインに関する詳細な情報と伴に、得られたメカニズムに関する情報を組み合わせれば、新規 *in vivo* 染色体損傷アラートは極めて有効な情報となることが示された。

A. 研究目的

In vitro 染色体損傷試験で陽性結果が得られた場合、当該化学物質は遺伝毒性を示す可能性がある。しかし、多くの場合、*in vitro* 試験で認められた有害性が *in vivo* 遺伝毒性試験や発がん性試験でも反映されるかどうかの予測は容易ではない。*In vitro* での陽性結果が *in vivo* での活性に結びつ

かない理由は多くある。例えば、化学物質の効率的な解毒や排泄、代謝の代替経路、吸収率の悪さなど、これらはいずれも作用部位における不十分な曝露につながる可能性がある。また *in vitro* 系は高濃度の被験物質に曝露されている可能性があり、その結果 *in vivo* では該当しそうな生理的状況が原因となり、陽性結果を示すこと

がある。さらに複雑なことに、*in vivo* 試験の結果（したがって *in vitro* 結果との関連性）は選択した試験デザインに依存し、場合によっては対象組織や投与経路により異なる結果が得られることがある。そのため、不適切な *in vivo* 試験は不要な動物使用につながり、さらに被験物質の真のリスクを十分に反映しない結果をもたらす可能性があることから、適切な *in vivo* 試験デザインを選択することが重要である。最適な *in vivo* 試験を選択する際の重要な要素として、遺伝毒性発現メカニズムの理解の他、実施する試験に関する知識および被験物質または同様のメカニズムで作用する可能性のある類似物質でみられる試験デザインの特異性などがある。このような情報と当該化学物質の代謝、分布、生物学的利用能などの予想される曝露条件とを組み合わせ、十分な情報を入手した上で、特定の状況で最適な *in vivo* 試験デザインを選択し、決定することができる。以上を考慮し、個々の *in vitro* 染色体損傷アラートと *in vivo* 活性との関連性を評価することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

まず選択した *in vivo* 染色体損傷データのデータセットを整理、統合し、より大きなデータセットを作成した。次にこの大規模データセットを Derek Nexus（バージョン 2.0）において *in vitro* 染色体損傷のエンドポイントに対して処理し、Derek Nexus の各 *in vitro* 染色体損傷アラートの *in vivo* データに対する予測性能を評価した。Derek Nexus において、*in vitro* 染色体損傷のエンドポイントは開発が進んでいるが（アラート数 91 種）、*in vivo* 染色体損傷の

エンドポイントは少ない（アラート数 10 種）。さらに詳細な調査に値すると考えられたアラートを優先づけた後、クラス内の各化合物の活性に関する専門家による分析を含めた入手可能なデータおよび一次文献の詳細な分析を行った。すなわち、*in vitro* アラートが *in vivo* データ（主に *in vivo* での小核試験および染色体異常試験の結果を用いて評価）を十分に予測し、かつ、いずれのエンドポイントにおいても同じメカニズムが関与すると考えられる場合には、当該アラートを拡大し *in vivo* 活性の予測に適用した。拡大適用されたアラートは *in vitro* と *in vivo* の染色体損傷を同様に予測する。予測性能が不良の場合や *in vivo* での毒性には別のメカニズムが関与していると考えられる場合には、*in vitro* アラートの拡大適用は行わなかった。いずれの場合も利用可能な全データを専門家が評価し、結果の要約をアラートの記述に加えた。*In vitro* アラートの試験には、より大きなデータセットを形成するため 3 種類の別個のデータセットを統合したデータを使用した。これらのデータを用いたアラートの検証結果からさらに調査すべきアラートの優先順位を決め、文献検索および一次文献の参照を含む詳細な調査を行った。このデータは、化合物が染色体損傷の原因となるメカニズムに関連する他の補足情報と共に、知識ベースにおける変更を裏付けるために使用した。

B.1. 使用データセット

本研究では以下に概説する *in vivo* 染色体損傷データ [小核 (MN) 試験データおよび染色体異常 (CA) 試験データの両方からなる] の 3 種類のデータセットを用い

た：

MMS データセット：日本の MMS 研究会提供。関連する *in vivo* での MN 試験データを有する計 255 化合物を含む。各化合物の総合判定は専門家による一次データの解釈に基づいて行われ、112 化合物が陽性、129 化合物が陰性、14 化合物が inconclusive (判定不可) と判定した。

FDA データセット：米国 FDA から得た *in vivo* 染色体損傷データ。データセットには関連する *in vivo* での MN 試験や CA 試験データを有する計 939 化合物を含む。各化合物の MN および CA に関する総合判定は FDA に代わって Leadscope Enterprises により行われた。必要に応じて、これらの結果を組み合わせ *in vivo* 染色体損傷に関する総合判定を行った。いずれかの試験で陽性結果が得られた場合には総合判定を陽性とした。陽性結果は示さなかったがいずれかの試験で equivocal (不確かな結果が得られた場合には、equivocal と判定した。それ以外の場合には陰性と判定した。ひとつの試験でのみで検査された化合物については、その試験の結果を総合判定の根拠として用いた。288 化合物が陽性、625 化合物が陰性、13 化合物が equivocal、13 化合物が inconclusive と判定された。

Vitic Nexus データセット：オンラインデータベース Vitic Nexus (version 1.75) より抽出。関連する *in vivo* での MN 試験データを有する計 804 化合物を含む。各化合物の総合判定は個々の研究データに基づいて行われた。いずれの試験でも陽性と判定された化合物は総

合判定を陽性とした。陽性結果は示さなかったがいずれかの研究で「弱陽性」と判定された化合物は弱陽性とした。陽性判定はないがいずれかの研究で equivocal と判定された化合物は equivocal とし、実施したいずれの試験でも陰性結果のみを示した化合物は総合判定を陰性とした。241 化合物が陽性、503 化合物が陰性、3 化合物が弱陽性、25 化合物が equivocal、32 化合物が inconclusive と判定された。

各化合物に関する総合判定を有する上記 3 種類の小規模なデータセットから統合データセットを作成した。化学構造または CAS 番号に基づき、2 つ以上のデータセットに存在する構造を特定した。重複する構造の総合判定は以下に基づき行った。いずれかひとつのデータセットで陽性結果を示した化合物は総合判定を陽性とした。総合判定が陽性とならなかった化合物のうち、いずれかのデータセットで弱陽性とされたものは弱陽性と判定した。いずれのデータセットでも陽性または弱陽性とは判定されなかったが equivocal と判定されていた化合物については、総合判定を equivocal とした。ひとつのデータセットのみで検討された化合物についてはその結果を総合判定として用いたが (例、inconclusive) それ以外の場合には陰性と判定した。データセットの統合後、陽性または陰性と判定された化合物以外はデータセットから除外した。その結果得られた統合データセットは、陽性化合物 484 種、陰性化合物 977 種の計 1461 化合物から構成された。次にこの統合データセットを用いて *in vitro* アラートの解析を進めた。

B.2. 候補アラートの特定

統合データセットを Derek Nexus (version 2.0) に収録されている既存の *in vitro* 染色体損傷アラートに対して処理し、各アラートの陽性適中率 (PP) を算出した。次に PP の一覧に基づいてアラートの優先順位づけを行った。*In vivo* 試験系への適用性の点から検討の余地があると考えられるアラートを選択した。本研究の目的のひとつは Derek Nexus における *in vivo* 染色体損傷のエンドポイントの予測性能を向上させ、同エンドポイントに対するさらに包括的な知識ベースの *in silico* システムを開発することであった。この点を踏まえて、PP が 50% を超え、なおかつ計 3 種類以上の化合物によって評価されるアラート (*in vivo* エンドポイントと *in vitro* エンドポイントとが十分な重複を示す) を優先して詳細な調査を行った。21 種類以上の化合物により評価される (同化合物クラスの *in vivo* 活性を評価するためのデータが大量に存在する) アラートも優先した。以上の基準に合致すると確認されたアラート 24 種全てについて、*in vivo* 染色体損傷のエンドポイントに関する専門家による検討を行った。さらに、上記の基準に合致しなかったが有望と確認されたアラート 8 種についても本研究の一環として詳細な調査を行った。

B.3. *In vivo* 染色体損傷予測の開発

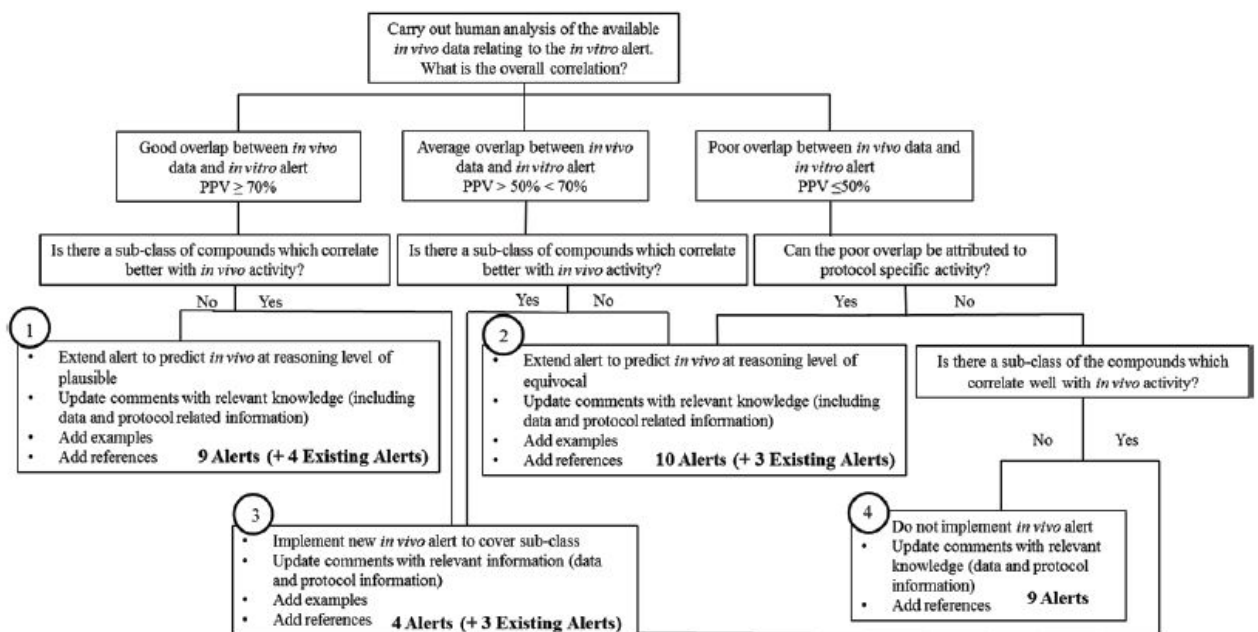
調査を行った 32 種のアラートそれぞれについて、可能な場合には引用文の原文に戻って参照しながらデータセット中の全 *in vivo* データを詳細に検討した。優先づけに用いた統合データセットのデータに加え、公開科学文献の追加データの検索も実施した。最初は ChemIDplus を用いて

PubMed、CCRIS などの毒性学的に関連のある大規模データベースを検索した。その後これらのデータベースから得た知見に基づいて、より広範かつ詳細な検索を行った。*In vivo* での染色体損傷試験データ、および活性の根拠や化合物クラスが活性を生じるメカニズムに関する情報を収集した。当該化合物クラスに関する入手可能な全ての関連情報を収集するとその情報を照合し、専門家が各化合物の活性に関する全体的結論を下した。これらの結論を出す際には、実施された試験の質 (GLP 遵守状況) に加え、化合物の推定される吸収、分布、代謝、排泄 (ADME) 特性および染色体損傷の原因となるメカニズムに基づいて試験デザインの妥当性が考慮された。データは *in vivo* 小核試験および染色体異常試験から得た。コメント試験は化学物質の染色体損傷誘発性よりもむしろ突然変異事象および全般的な DNA 損傷を評価するものであるため、同試験のデータは使用しなかった。同一化合物に関する矛盾した結果については、可能であれば試験デザインの違い (例、用量、サンプリング時間、組織、投与経路など) に基づいて妥当性を確認した。利用可能な全てのデータを使用し、各 *in vitro* アラートの *in vivo* 活性との関連性を判断した。*In vitro* アラートにより *in vivo* 活性が予測できると考えられた場合には、アラートを両エンドポイントの予測に拡大適用した。新たな推論ルールをアラートに追加し、裏付けとなる証拠の強さによって尤度を plausible (妥当) または equivocal (不確か) と設定した。アラートコメントを更新し、必要に応じて裏付けとなる参考文献や例を追加した。*In vitro* 系と *in vivo* 系で認められる活性の間に十分な重複が

ないアラートに関しては、当該化合物クラスが活性を示す特別な条件があるのか、または特有のサブクラスを同定できるのかを確認する評価を行った。これらの条件のいずれかを満たした場合には知識ベースを適宜更新し、活性を示す特別な条件がある場合にはアラートコメントに適切に要件を記述し、サブクラスが同定された場合には当該サブクラスに対する新たなアラートを実行した。*In vivo* での結果が *in vitro* アラートによって十分に予測されず、かつ上述の条件を満たさない場合には、当該アラートの *in vivo* 活性予測への外挿は行わなかった。上記の全ての場合において、判断に用いたキーとなるデータに関する情

報を当該アラートに関連するコメントに記述した。実際に観察された、または専門家による解釈によって毒性の原因となるメカニズムに基づいて予測された全ての試験デザイン特異性についてもコメントに記載した。これらの結論を導くために用いた簡略化した意思決定プロセスの概要（決定樹）を図1に示す。この決定樹を各化合物クラスの遺伝毒性に関する現在の知識（利用可能な場合にはメカニズムの説明に関する情報を含む）に対する専門家の評価と組み合わせて用いることで、各クラスの活性予測に最適な方法についての結論を導いた。

図1 *In vivo* 知見に対応した知識ベースを構築するための判断基準を示す決定樹



C. 研究結果

本研究の前にはDerekにおける *in vivo* 染色体損傷の予測能力は限定的であり、知識

ベース内の同エンドポイントに対するアラートはわずか10種であった。これらのアラートが適用できる化学物質は限られ

ており、表 1 に示す通り、このことは日本の MMS によって提供されたデータセット

に照らして Derek の感度の低さに反映されていた。

表 1 MMS データセットに対する DfW (Ver. 13)の染色体損傷性 (CD) 予測性能

	DfW の <i>in vivo</i> CD 予測：不明確あるいは高	DfW の <i>in vivo</i> CD 予測：報告なし	試験報告数
<i>in vivo</i> CD 陽性	4	108	112
<i>in vivo</i> CD 陰性	0	130	130

感受性：4/112 = 4%、特異性：130/130 = 100%、一致性：134/242 = 55%

本研究では、32 種類の *in vitro* 染色体損傷アラートを調査した。調査を行ったアラートのうち、19 種が *in vivo* 活性への拡大適用の基準を満たした (図 1)。これら 19 種のアラートは *in vivo* データを十分に予測し、*in vitro* エンドポイントと *in vivo* エンドポイントが同じメカニズムを共有すると結論づけられた。これらのアラートに新たな推論ルールを追加し、*in vivo* 活性を裏付ける証拠の重みによって尤度を plausible (アラート 9 種+既存アラート 4 種) または equivocal (アラート 10 種+既存アラート 3 種) と設定した。調査を行った中には、最初 *in vivo* での活性が *in vitro* での結果を反映しないと思われたものもあった。しかし専門家によるデータおよびメカニズムの分析の結果、活性が試験デザインに依存する可能性が示唆され、当該クラスの化合物に関して特定の条件を用いた場合には *in vivo* で陽性結果が得られる可能性が高いことが明らかになった。このような場合でも、アラートの根拠に関する説明や当該化合物が陽性を示す最も感度の高い試験方法の具体的な情報を含めた上で、*in vivo* 染色体損傷を予測することはできる。さらに特定の化学物質について、*in vivo* で活性を

示すと考えられたが他のサブクラスは活性を示さないあるサブクラスもあり、その活性の違いが理論的に説明できた。このようなアラートは 4 種類 (+既存アラート 3 種)あり、*in vitro* アラートのコメントを更新し、*in vivo* で陽性のサブセットをカバーする新たなアラートを実行した。最後に 9 種類のアラートでは *in vitro* 活性と *in vivo* 活性との間に十分な相関関係がなく、かつ試験デザイン特異性が特定されないかメカニズムや ADME に基づき当該化合物クラスで *in vivo* 活性が認められない有力な理由があった。このような場合には *in vivo* 染色体損傷を予測することはできなかったが、利用可能なデータに関する情報や不活性である理由を関連する *in vitro* アラートの情報に含めた。本研究の結果、Derek Nexus の知識ベースにおいて *in vivo* 染色体損傷のエンドポイントに関するアラートが 33 種類 (既存のアラート 10 種と本研究で開発した新規アラート 23 種) 構築された (表 2、表 3)。さらに、*in vitro* 染色体損傷に関するアラート 9 種が更新され、*in vivo* 活性との関連性に関する情報が追加された。

表2 *in vivo* 染色体損傷に関する 33 種のアラート

アラート	結果	評価
N-Nitro or N-nitroso compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Epoxide	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Alkylating agent	Comments updated. New alert implemented	N/A
Mono- or di-alkylhydrazine	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Azirine or aziridine	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Nitrogen or sulphur mustard	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Alkyl carbamate	<i>In vivo</i> alert	
Aryldialkyltriazene	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Aromatic nitro compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Chromium compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue	Comments updated. New alert implemented	N/A
Carbodiimide	<i>In vivo</i> alert	
Vinyl carbamate	<i>In vivo</i> alert	
Acridine or analogue	Comments updated	N/A
Phenol	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Imidazole nucleoside analogue	<i>In vivo</i> alert	
Aminocarbazole analogue	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Xanthine	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Inorganic arsenic compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Di- or tri-phenylethylene	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Thymine or cytosine derivative	Comments updated. New alert implemented	Plausible
Purine base	Comments updated. New alert implemented	Plausible
Vinca alkaloid	Alert extended to <i>in vivo</i>	Plausible
Inorganic cadmium compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Bisdioxopiperazine	<i>In vivo</i> alert	
Inorganic selenium compound	Alert extended to <i>in vivo</i>	Equivocal
Camptothecin or analogue	<i>In vivo</i> alert	
Taxane derivative	<i>In vivo</i> alert	
Colchicinoid	<i>In vivo</i> alert	

Benzimidazole derivative	In vivo alert	
5-Azacytidine or analogue	In vivo alert	
Dimethyl phosphorothiolate ester	Alert extended to in vivo	Equivocal
Alkyl sulphate or sulphonate	Implemented to extend	Plausible

表3 *in vivo* 染色体損傷に関するアラートの構築

新規のアラート 23 種	
<u>in vivo への適用拡大 (19) :</u>	
1) N-Nitro or N-nitroso compound,	2) Epoxide,
3) Mono- or di-alkylhydrazine,	4) Azirine or aziridine,
5) Nitrogen or sulphur mustard,	6) Aryldialkyltriazene,
7) Aromatic nitro compound,	8) Chromium compound,
9) Acridine or analogue,	10) Phenol,
11) Aminocarbazole analogue,	12) Xanthine,
13) Inorganic arsenic compound,	14) Di- or tri-phenylethylene,
15) Vinca alkaloid,	16) Inorganic cadmium compound,
17) Inorganic selenium compound,	18) Dimethyl phosphorothiolate ester,
19) Alkyl sulphate or sulphonate	
<u>in vivo 新規 (4):</u>	
1) Alkylating agent,	2) Polycyclic aromatic hydrocarbon or hetero-analogue,
3) Thymine or cytosine derivative,	4) Purine base
in vivo 既存アラート 10 種	
1) Alkyl carbamate,	2) Carbodiimide,
3) Vinyl carbamate,	4) Imidazole nucleoside analogue,
5) Bisdioxopiperazine,	6) Camptothecin or analogue,
7) Taxane derivative,	8) Colchicinoid,
9) Benzimidazole derivative,	10) 5-Azacytidine or analogue

D. 考察

In vivo での染色体損傷の予測に知識ベースの専門家アプローチを用いることにより、利用可能なデータの評価に専門家による分析を適用し結論を導き出すことができる。化合物の重複があった3種類のデータセットにおいて18~46%の確率で結

果の不一致が認められたという事実から、この分析の意義は明らかである。この結果を専門家が分析することにより、結果の矛盾を十分に解消することができた。さらにその全ての情報を、予測システムを構成する知識ベースに収めることも可能であった。特定の化合物クラスに関して、予測に

利用可能なデータの情報とともに、活性の原因となるメカニズムや観察または予想された試験デザイン特性、または不活性と考えられる場合の理由が収録された。また必要に応じて類似例証化合物の活性も追加された。特に有用であるとわかった情報が収録されたアラートの例を以下に示す。

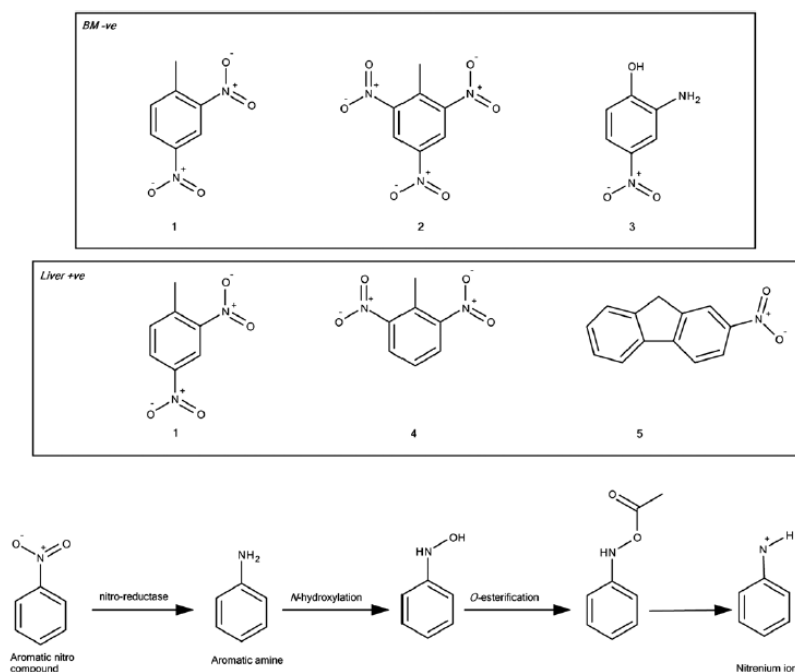
D.1. 構造アラートに付加される情報の例

D.1.1. 芳香族ニトロ化合物は組織特異的に活性を示す可能性がある

芳香族ニトロ化合物に関する *in vitro* アラートの *in vivo* データに対する PP は低かった (23%)。しかし *in vivo* データをより厳密に調査すると、芳香族ニトロ化合物はげっ歯類の骨髄小核試験では通常不活性であるのに対し、肝臓では活性を示す例があることが明らかとなった (図 2)。例えば、マウス骨髄小核試験では 2,4-ジニトロトルエン (#1)、2,4,6-トリニトロトルエン (#2)

2-アミノ-4-ニトロフェノール (#3) は陰性を示すことが報告されているが、対照的にラット肝小核試験においては 2,4-ジニトロトルエン (#1)、2,6-ジニトロトルエン (#4)、2-ニトロフルオレン (#5) の経口投与によって陽性反応が認められている。芳香族ニトロ化合物の変異原性および染色体異常誘発性には、ニトロ還元酵素によるヒドロキシルアミンへの還元と、これに続く O-エステル化およびニトレンウムイオンの形成が関与していると考えられる。この反応種は DNA などの細胞求核性分子に対する結合能を有する。芳香族ニトロ化合物の組織特異的活性を考慮すると、ニトレンウムイオンを形成する代謝過程 (図 2) のひとつ以上において肝臓に存在する酵素が必要であり、代謝活性化により生成される反応種が骨髄では形成されない、または分布していない可能性がある。

図 2 芳香族ニトロ化合物の組織特異的活性と染色体異常誘発性の想定機序

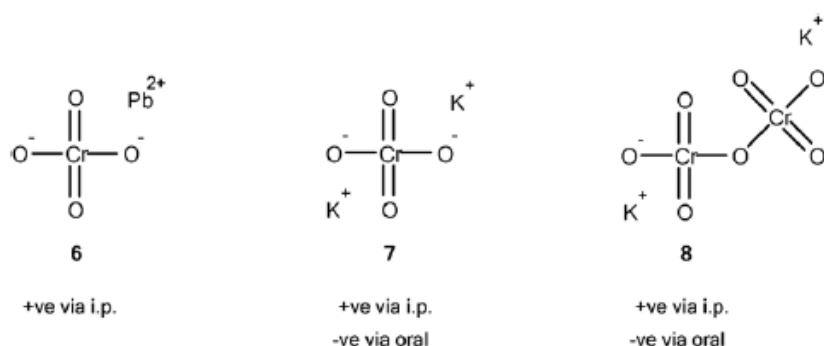


D.1.2. クロム化合物は投与経路特異的に活性を示す可能性がある

クロム化合物に関する *in vitro* アラートの *in vivo* データに対する PP は良好 (100%) であった。しかし、実験データを詳細に分析すると、活性が投与経路に依存することが明らかになった。確認した化合物は腹腔内投与時のみ活性を示し、経口投与時には不活性であった (図 3)。例えばマウス骨髄

小核試験において、クロム酸鉛 (#6)、クロム酸カリウム (#7)、二クロム酸カリウム (#8) の腹腔内投与で陽性反応が報告されているが、クロム酸カリウムおよび二クロム酸カリウムは経口投与時には小核を誘発しなかった。六価クロム化合物が経口投与で活性を示さないのは、消化管からの吸収不良が原因とされている。

図 3 クロム化合物の投与経路特異的活性

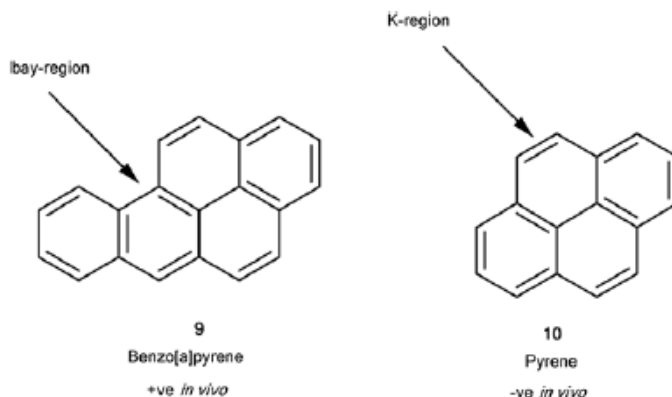


D.1.3. Bay領域を有するPAHは*in vivo*で活性を示す可能性が高い

多環芳香族炭化水素 (PAH) に関する *in vitro* アラートの *in vivo* データに対する PP は中程度 (50%) であった。しかしデータをより厳密に調査すると、化合物のあるサブクラスの大部分が活性であることが示された。*In vitro* では bay 領域を有する PAH と K 領域を有する PAH の両方が活性を示すが、*in vivo* では bay 領域を有する PAH の

みが活性を示すことがデータより示唆されている (図 4)。例として、7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン、ベンゾ[a]ピレン (#9)、ジベンズ[a,h]アントラセンなどが挙げられる。K 領域は有するが bay 領域を欠く化合物は、*in vivo* 細胞遺伝学的試験で概して陰性を示した。このような化合物としてはピレン (#10) およびフェナントレンがある。

図4 多環芳香族炭化水素の *in vivo* 活性



D.1.4. ヒドロペルオキシドは *in vivo* では染色体損傷を誘導しないと考えられる

調査を行ったアラートのうち9種では、評価する化合物が *in vivo* 細胞遺伝学的試験で概して陰性を示した。よってこれらの *in vitro* アラートは *in vivo* 活性の予測には適さないと結論づけられた。これら9種については新たな推論ルールは追加しなかったが、アラートコメントを更新し当該アラートクラスが *in vivo* で不活性である説明を追加した。一例として、ヒドロペルオキシドが挙げられる。ヒドロペルオキシドは *in vitro* 染色体異常試験では活性を示すが、骨髄または末梢血で行う *in vivo* 試験では活性を示さないと考えられる。例えば過酸化水素は、*in vitro* 染色体異常試験において S9 mix 非存在下で陽性反応が報告されているが、マウス骨髄小核試験での経口投与時および腹腔内投与時、ラット骨髄染色体異常試験においては陰性と報告された。これらのケースでは、投与された反応性過酸化物がげっ歯類モデルの発達した *in vivo* 防御機構によって十分な不活化を受けたと考えられる。過酸化水素および他のヒドロペルオキシドは、ペルオキシダーゼ酵素

によって水やアルコールおよび酸素に効率的に代謝されるが、このような防御機構は *in vitro* では存在しないか抑制されている場合がある。一方で、過酸化水素が発がん性試験で陽性を示している場合もあることに注意する必要がある。過酸化水素を経口投与（飲料水）したところマウス小腸でがんが発現した。したがってこの場合も組織特異的な活性である可能性があるが、本仮説を裏付ける十分な *in vivo* 遺伝毒性試験の実験データがない。上記の例は、この種のアラートに関して得られる情報が豊富にあること、および専門家が利用可能な生データを解釈することの利点を明らかにする。さらに *in vitro* と *in vivo* で認められる結果の違いを説明する本研究のより一般的な知見も反映している。すなわち *in vivo* と *in vitro* の結果の相違が、様々な ADME 特性に起因すると考えられる場合もある。活性化合物は試験を行う組織に到達しなければならず、化学種の組織到達能力はいくつかの要素に左右される。親化合物が直接的に染色体損傷を引き起こし反応性であれば、被験組織に到達することが重要である。そして到達しているか不明な

場合には、十分な曝露が予想される組織（通常投与部位近辺）で試験を行う必要がある。化合物が代謝活性化により遺伝毒性を発現すると考えられる場合には、必要な活性化が *in vivo* 系で行われるかどうか検討する必要がある。さらに必要であれば、選択した活性部位に近接する組織とこれらの代謝活性産物との反応性についても考慮すべきである。またいずれの場合も、*in vitro* では存在していなかった可能性のある *in vivo* 系の代謝不活化経路も考慮する必要がある。以上のような詳細な情報は、本研究の一環として更新したアラートのコメント要約に統合した。

本研究開始時には知識ベースの予測 *in silico* システム Derek Nexus における *in vivo* 染色体損傷のエンドポイントの予測能は限定的であり、このことは MMS によって

提供されたデータセットに対する Derek nexus の性能統計から明らかであった（表 1）。*In vivo* 染色体損傷データの大きなデータセットを統合し、さらに Derek の知識ベースに既存の知識を活用することにより、Derek Nexus における *in vivo* 染色体損傷の予測能は比較的短期間で著しく改善された。MMS データセットに対して感度と一貫性の向上（各々、4%～40%、55%～61%）を認め、これに伴う特異度の低下は軽微であった（最終的な特異度は 79%：表 4）。本研究で調査した *in vitro* 染色体損傷アラート 32 種のうち、19 種を *in vivo* 活性の予測に拡大適用し、4 種を新たな *in vivo* SAR アラートに発展させた。そして 9 種は利用可能なデータに基づき拡大適用には適さないと判断した。

表 4 MMS データセットに対する Derek Nexus 2014 の染色体損傷性（CD）予測性能

	DfW の <i>in vivo</i> CD 予測：不明確あるいは高	DfW の <i>in vivo</i> CD 予測：報告なし	試験報告数
<i>in vivo</i> CD 陽性	45	67	112
<i>in vivo</i> CD 陰性	28	102	130

感受性：45/112 = 40%、特異性：102/130 = 79%、一貫性：147/242 = 61%

E. 考察

特異的メカニズムを介して染色体損傷を引き起こす可能性のある化合物クラスに関して、知識ベースに既存の知識（*in vitro* 染色体損傷アラート）と *in vivo* 染色体損傷データの大規模データセットとを組み合わせることで活用することにより *in vivo* 染色体損傷に関する知識ベースの予測 *in silico* システムを開発するという本研究で述べたアプローチは、効率的な手段であることが明らかに

なった。さらに採用した手法では、*in vivo* 試験結果の専門家による解釈が同結果の予測システム内へのコード化以前に行われ、予測を行う際にこの解釈が考慮される。本研究の結果、*in vivo* 染色体損傷の予測能は大幅に向上し、MMS データセットに対する感度は研究開始前の 4%から現在の 40%に改善すると同時に特異度は良好に維持された（79%）。残りのアラートを評価する利用可能な *in vivo* データが限られているという

ことは、*in vivo* 染色体損傷のエンドポイントに対する感度を向上させるという点において本研究の手法が限界に達したことを示している。しかし今後は関連する他のエンドポイント（例、変異原性や発がん性）に対するアラートの調査や *in vivo* データのみに基づくアラートの開発といった代替的アプローチが、*in vivo* 染色体損傷エンドポイントの予測能向上に寄与すると考えられる。

F. 結論

In vivo 染色体損傷のエンドポイントに関するアラートが 33 種類構築され、さらに、*in vitro* 染色体損傷に関するアラート 9 種が更新された。その結果、Derek Nexus の *in vivo* 染色体損傷予測性は著しく改善された。

G. 研究発表

誌上発表

1. Steven Canipa, Alex Cayley, William C Drewe, Richard V Williams, Shuichi Hamada, Akihiko Hirose, Masamitsu Honma, Takeshi Morita, Using *in vitro* structural alerts for chromosome damage to predict *in vivo* activity and direct future testing. *Mutagenesis*, 31, 17-25, 2016.
2. Takeshi Morita, Shuichi Hamada, Kenichi Masumura, Akihiro Wakata, Jiro Maniwa, Hironao Takasawa, Katsuaki Yasunaga, Tsuneo Hashizume, Masamitsu 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.
3. Yurika Fujita, Takeshi Morita, Shoji Matsumura, Taisuke Kawamoto, Yuichi Ito, Naohiro Nishiyama, Hiroshi Honda, Comprehensive retrospective evaluation of existing *in vitro* chromosomal aberration test data by cytotoxicity index transformation, *Mutation Research* 802 (2016) 38-49
4. Petko I. Petkov, Terry W. Schultz, E. Maria Donner, Masamitsu Honma, Takeshi Morita, Shuichi Hamada, Akihiro Wakata, Masayuki Mishima, Jiro Maniwa, Milen Todorov, Elena Kaloyanova, Stefan Kotov, Ovanes G. Mekenyan, Integrated Approach to Testing and Assessment for Predicting Rodent Genotoxic Carcinogenicity, *Journal of Applied Toxicology*, 32, 1536-1550, 2016
5. Takeshi Morita, Chikako Uneyama, Genotoxicity assessment of 4-methylimidazole: Regulatory perspectives, *Genes and Environment* (2016) 38:20, DOI 10.1186/s41021-016-0050-z

学会発表

1. 本間 正充、増村 健一、森田 健：遺伝毒性発がん物質のリスク評価、第 43 回日本毒性学会、2016 年 6 月 28 日～7 月 1 日（7/1）、名古屋
2. 森田 健：安全性評価におけるイヌ慢性毒性試験とマウス発がん性試験の有用性、農薬評価におけるマウス発がん性試験の必要性、ラット発がん性試験に追加の意義、第 43 回日本毒性学会、

2016年6月28日～7月1日(6/29)
名古屋

3. Yurika Fujita, Hiroshi Honda, Shoji Matsumura, Taisuke Kawamoto, Yuichi Ito, Takeshi Morita, Osamu Morita, Cytotoxicity-index transformation formulae and statistical-structural alerts for improvisation of current in silico clastogenicity evaluation, 45th Annual EEMGS (European Environmental Mutagenesis and Genomics Society) meeting, August 14-18, 2016, Copenhagen, Denmark.
4. Hiroshi Honda, Yurika Fujita, Shoji Matsumura, Taisuke Kawamoto, Yuichi Ito, Takeshi Morita, Osamu Morita, Cytotoxicity-Index-Transformation Formulae And Statistical-Structural Alert Enabling Refinement Of in silico Evaluation of Chromosomal Damage, 47th Annual EMGS (Environmental Mutagenesis and Genomics Society) meeting, September 24-28, 2016, Kansas City, Missouri.
5. Hamada S, Shigano M, Wakata A, Kawakami S, Uno F, Sui H, Yamada K,

Hagio S, Momonami A, Maeda A, Terashima Y, Ohyama W, Morita T, Honma M, Hayashi M, Novel Liver Micronucleus Assay using Formalin-fixed Rodent Liver, 47th Annual EMGS (Environmental Mutagenesis and Genomics Society)meeting, September 24-28, 2016, Kansas City, Missouri.

6. 山田雅巳, 森田健: 遺伝毒性評価における染色体異常試験の要否を問う、日本環境変異原学会第45回大会、平成28年11月17日(木)～18日(金)つくば
7. 藤田侑里香、本田大士、松村奨士、伊藤勇一、松田知成、森田健、森田修: 各種遺伝毒性試験結果を用いた発がん性の統合的評価戦略、日本環境変異原学会第45回大会、平成28年11月17日(木)～18日(金)つくば

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし