

薬生薬審発0627第1号
平成30年6月27日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬・生活衛生局医薬品審査管理課長
（ 公 印 省 略 ）

「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインについて」の一部改正について

医薬品に含まれるDNA反応性（変異原性）不純物の評価及び管理の指針については、「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインについて」（平成27年11月10日付け薬生審査発1110第3号厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長通知。以下「課長通知」という。）により通知したところです。

今般、医薬品規制調和国際会議において、「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中DNA反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドライン」に関し、医薬品製造でよく使用され、変異原性物質や発がん物質であるとみなされている14種類の化学物質の許容摂取量とその算出方法を示す補遺が合意されたため、課長通知の別添を別添のとおり改正しましたので、貴管下関係業者等に御周知いただくようお願いいたします。

なお、課長通知の記3. 適用時期に記載した各経過措置は、引き続き適用されます。



(別添)

潜在的発がんリスクを低減するための 医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理

ICH 調和ガイドライン

本ガイドラインは 2017/5/31 の ICH 運営委員会の会合で ICH 工程の Step 4 に到達しており、ICH の各規制機関に採択されることが推奨されている。

目次

1.	緒言	1
2.	ガイドラインの適用範囲	1
3.	一般原則	2
4.	市販製品に関する検討事項	3
4.1	原薬の化学、製造及び管理に対する承認後の変更	4
4.2	製剤の化学、製造及び管理に対する承認後の変更	4
4.3	市販製品の臨床使用に対する変更	4
4.4	市販製品に関するその他の検討事項	5
5.	原薬及び製剤中の不純物に関する評価	5
5.1	合成不純物	5
5.2	分解生成物	6
5.3	臨床開発に関する検討事項	6
6.	ハザード評価の要件	7
7.	リスクの特性解析	8
7.1	TTC に基づく許容摂取量	8
7.2	化合物特異的なリスク評価に基づく許容摂取量	9
7.2.1	発がん性陽性データを有する変異原性不純物 (表1 のクラス1)	9
7.2.2	実質的な閾値の根拠が示されている変異原性不純物	9
7.3	一生涯よりも短い期間 (LTL) の曝露に関する許容摂取量	9
7.3.1	臨床開発	10
7.3.2	市販製品	10
7.4	複数の変異原性不純物に関する許容摂取量	11
7.5	アプローチの例外及び柔軟性	11

8.	管理	12
8.1	製造工程由来不純物の管理	12
8.2	管理方法の検討事項	14
8.3	定期的試験に関する検討事項.....	15
8.4	分解生成物の管理	15
8.5	ライフサイクルマネジメント.....	16
8.6	臨床開発に関する検討事項	16
9.	ドキュメンテーション	17
9.1	治験届	17
9.2	コモンテクニカルドキュメント（製造販売承認申請）	17
注記	18
用語の解説	23
参考文献	25
付録	26
付録1	： ICH M7ガイドラインの適用対象に関するシナリオ	26
付録2	： 想定される管理方法の事例	27
付録3	： ICH M7 補遺.....	30

潜在的発がんリスクを低減するための 医薬品中 DNA 反応性 (変異原性) 不純物の評価及び管理 M7(R1)

1. 緒言

原薬の合成では、反応性化学物質、試薬、溶媒、触媒、その他の助剤が使用される。化学合成やその後の分解により、すべての原薬及び製剤中には不純物が存在している。多くの不純物についての安全性確認及び管理については、ICH Q3A (R2) : 「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」及び Q3B (R2) : 「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」(1、2) で指針が示されているが、DNA 反応性不純物については、限られた指針しか示されていない。本ガイドラインは、潜在的発がんリスクを制限するために、こうした変異原性不純物の構造決定、分類、安全性確認及び管理に適用される実用的な枠組みを示すことを目的としている。本ガイドラインは、ICH Q3A (R2)、Q3B (R2) (注 1) 及び ICH M3 (R2) : 「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」(3) を補完するものである。

本ガイドラインでは、発がんリスクが無視できると予想される変異原性不純物のレベルを規定するにあたって、安全性及び品質の両面からリスクマネジメントを考慮することを強調している。最終の原薬又は製剤に存在する又は存在することが合理的に予測される変異原性不純物の評価と管理について、推奨される事項の概略を述べる。推奨される事項を述べるにあたっては、それら最終の原薬又は製剤の目的とする使用条件が考慮されている。

2. ガイドラインの適用範囲

本文書は、新原薬及び新製剤について、臨床開発段階及びその後の製造販売承認申請時における指針を示すことを目的としている。本文書は、市販製品の承認後申請、及び既承認製剤に含まれている原薬を用いた製剤の新規製造販売承認申請に対しても適用されるものの、いずれも以下の場合にのみ適用する。

- 原薬合成法の変更により、新規の不純物が生じるか、既存の不純物に対する判定基準が高くなる場合。
- 製剤処方や組成、製造工程の変更により、新規の分解生成物が生じるか、既存の分解生成物に対する判定基準が高くなる場合。
- 適応症又は投与方法の変更により、許容される発がんリスクレベルに著しく影響を及ぼす場合。

本ガイドラインに示される不純物の変異原性の評価は、次に掲げる種類の原薬及び製剤、すなわち生物学的製剤／バイオテクノロジー応用医薬品、ペプチド、オリゴヌクレオチド、放射性医薬品、醗酵生成物、生薬及び動植物由来の医薬品を対象としていない。

本ガイドラインは、ICH S9 (4) の適用範囲において定義されている進行がんを適応症とする医薬品の原薬及び製剤には適用されない。加えて、他の適応症についても、原薬が治療濃度で遺伝毒性を有し、発がんリスクの増加を招くことが予想される場合がある。このような場合、変異原性不純物への曝露は、その原薬の発がんリスクを著しく増加させるとは考えられない。したがって、非変異原性不純物に対する許容レベルで不純物を管理できると考えられる。

本ガイドラインに示される不純物の変異原性についての評価は、矯味剤、着色剤、香料、及び既存の市販製品に用いられている医薬品添加剤を対象としていない。製剤の包装に関連する溶出物は本ガイドラインの適用対象ではないが、本ガイドラインで示している潜在的発がんリスクを制限するための安全性リスク評価の原則は、必要に応じて利用することができる。本ガイドラインの安全性リスク評価の原則は、製剤に初めて使用され、かつ化学合成された医薬品添加剤中の不純物に対し、必要に応じて利用することができる。

3. 一般原則

本ガイドラインは、低レベルで存在する場合においても、DNA に直接損傷を与え突然変異を引き起こす可能性があり、それによってがんを誘発する可能性がある DNA 反応性物質に焦点を当てる。このような作用機序を有する変異原性発がん物質は、通常、細菌を用いる復帰突然変異（変異原性）試験により検出される。非変異原性である他の種類の遺伝毒性物質の作用機序は、通常は閾値を有しており、不純物として一般に存在しているレベルではヒトに発がんリスクをもたらすことはないのが普通である。したがって、潜在的な変異原性不純物の曝露と関連したヒトでの潜在的な発がんリスクを制限するため、細菌を用いる変異原性試験により、不純物の変異原性及び管理の必要性について評価を行う。細菌を用いる変異原性試験の結果を予測するには、確立された知識からなる化学構造に基づいた評価方法が有用である。この評価を行うには、入手可能な文献のレビュー、又はコンピュータによる毒性評価など、様々な方法がある。

試験が実施されていないいかなる化学物質に対しても、発がん性又は他の毒性のリスクが無視できると考えられる許容摂取量を規定するために、毒性学的懸念の閾値（TTC：threshold of toxicological concern）という概念が提唱された。TTC に基づく方法は、一般に非常に慎重な方法と考えられている。なぜならば、最も感受性の高い動物種と最も感受性の高い腫瘍誘発部位に対する、腫瘍発生率が 50% となる用量（TD₅₀）を用い、TD₅₀ からの単純な直線外挿により腫瘍発生率が 100 万分の 1 となる用量を求めるからである。TTC を適用して原薬及び製剤の変異原性不純物の許容限度値を評価する際には、10⁻⁵ という理論上の生涯過剰発がんリスクに相当する 1.5 µg/day という値が正当化されている。一部の構造グループは変異原性誘発能が高いため、TTC を下回る摂取量であっても、理論的には、著しい発がんリスクの可能性を伴うことが確認

されている。この強い変異原性発がん物質のグループは「cohort of concern」と呼ばれ、アフラトキシン様化合物、N-ニトロソ化合物及びアルキルアゾキシ化合物で構成される。

臨床開発期間、特に開発全般の経験が限られている初期段階では、管理戦略とその方法は十分に構築されていないと予想される。本ガイドラインは、確立されたリスク評価の戦略に基づき、変異原性不純物の許容摂取量を設定する。開発初期段階における許容リスクは、理論的に算出したレベルである、おおよそ 100 万人に 1 人のがんの増加と設定された。開発後期及び市販製品についての許容可能な発がんリスクは、理論的に算出されたレベルである、おおよそ 10 万人に 1 人の増加とした。これらのリスクレベルは、ヒトが一生涯に何らかの種類のがんを発症する確率である、3 人に 1 人以上と比べても、わずかな理論上のリスクの上昇にしか相当しない。なお、確立された発がんリスク評価は生涯曝露量に基づくものである。一生涯よりも短い期間（LTL：less-than-lifetime）の曝露では、臨床開発時及び製造販売時のいずれにおいても、不純物の許容摂取量を高く設定したとしても同程度のリスクレベルを維持することができる。発がんリスクレベルの数値（10 万人に 1 人）を用いることや、これをリスクに基づく用量（TTC）に変換したりすることは極めて仮定的な概念であり、実際のリスクを示す現実的指標とみなすべきではないものの、TTC の概念により、あらゆる変異原性化合物に対する安全な曝露量を推定することができる。一方で、TTC の算出は慎重な仮定に基づいていることから、TTC を上回ったとしても必ずしも発がんリスクの上昇にはつながらない。実際には、がんの発生率の増加は、10 万人に 1 人を大幅に下回る可能性が高い。加えて、げっ歯類を用いた試験で変異原性物質が非発がん物質であると確認された場合、発がんリスクの増加は予想されないものと考えられる。以上のすべての考察に基づくと、後になって変異原性物質であることが確認された不純物に曝露されていたとしても、その不純物にすでに曝露された患者の発がんリスクが必ずしも増加するとは限らない。何らかの処置を講じるかどうかは、リスク評価により決定される。

ある不純物に関して潜在的リスクが確認されている場合、その変異原性不純物の量が許容される発がんリスクレベル以下となることを保証するため、製造工程の理解や分析による管理を活用した適切な管理戦略を構築すべきである。

不純物が原薬の代謝物でもある場合がある。そのような場合、代謝物の変異原性に関するリスク評価により、不純物の安全性を確認することができる。

4. 市販製品に関する検討事項

本ガイドラインは回顧的に適用すること（すなわち、本ガイドラインの発出前に上市された製品に対する適用）を意図していないが、ある種の承認後の変更については変異原性不純物に関する安全性の再評価が必要となる。本項は、本ガイドラインの発出前、又は発出後に上市された製品に対する承認後の変更に応用する。8.5 項（ライフサイクルマネジメント）には、本ガイドラインの発出後に上市された製品に関するさらなる推奨事項が含まれる。

4.1 原薬の化学、製造及び管理に対する承認後の変更

原薬の化学、製造及び管理に関する承認後の申請には、出発物質以降の合成ルート、試薬、溶媒、工程条件などの変更による、変異原性不純物に伴う潜在的リスクの影響に関する評価を含めるものとする。具体的には、変更について評価し、変更により新たな変異原性不純物が生じるか、あるいは既存の変異原性不純物の判定基準が高くなるかどうかを判断しなければならない。変更による影響を受けない場合には、不純物の再評価を求めるものではない。例えば、製造工程の一部しか変更されない場合、変異原性不純物のリスク評価は、変更により新たな変異原性不純物が生じるか、変更が行われた工程において生成する変異原性不純物が増加するか、上流工程からの既知の変異原性不純物が増加するかどうか限定すべきである。このような変更に伴う規制当局への申請では、9.2 項で概要を示しているように評価について説明しなければならない。原薬、中間体、又は出発物質の製造場所の変更、あるいは原料の供給業者の変更の際には、変異原性不純物についてのリスクの再評価は不要である。

新たな原薬供給業者を申請する場合、その供給業者の製造する原薬が申請される地域で販売されている既存薬と同じ合成ルートを用いている証拠があれば、変異原性不純物の許容できるリスクやベネフィットを示す十分な根拠とみなし、本ガイドラインに従った評価は不要である。そうでない場合には、本ガイドラインに従った評価が期待される。

4.2 製剤の化学、製造及び管理に対する承認後の変更

製剤に関する承認後申請（例えば、組成や製造工程、剤形の変更など）には、新たな変異原性分解生成物、又は既存の変異原性分解生成物の判定基準が高くなることに伴う潜在的リスクの評価を含むものとする。該当する場合には、規制当局への申請の際に新たな管理戦略を提出することができる。原薬に対する変更がない場合は、製剤に使用される原薬の再評価を推奨するものではなく、求められていない。製剤の製造場所の変更に関しては、変異原性不純物についてのリスクの再評価は不要である。

4.3 市販製品の臨床使用に対する変更

市販製品の臨床使用に対する変更のうち、変異原性不純物の限度値の再評価が必要となる可能性があるものには、臨床用量の著しい増量、投与期間の延長（特に、変異原性不純物に変更前の適応症では生涯許容摂取量を上回る量で管理されていたが、新たな適応症に伴う投与期間の延長により、もはや適切ではなくなる場合）、又は適応症が、高い許容摂取量が妥当とされる重篤若しくは生命を脅かす疾患（7.5 項）から、既存の不純物の許容摂取量がもはや適切ではない、重篤度が低い疾患に変更される場合などがある。一日当たりの用量の増量又は投与期間の延長がない場合、新たな投与経路又は妊婦や小児を含む患者集団への適応症の拡大に伴う、市販製品の臨床使用の変更については、再評価を必要としない。

4.4 市販製品に関するその他の検討事項

懸念される特別な理由があれば、市販製品への本ガイドラインの適用が必要となる場合がある。

「cohort of concern」(3項)に分類される構造でない限り、不純物に警告構造が認められるだけでは追加措置を開始するのに不十分と考えられる。しかしながら、製造販売承認申請のための全般的な管理戦略及び規格を確立した後に得られた、不純物に関連する新たなハザードデータ(クラス1又は2に分類、6項)は、懸念される特別な理由と考えられる。この不純物に関連する新たなハザードデータは、関連する規制上の試験ガイドラインに適合する質の高い科学研究によって得られたものとし、データ記録又は報告書が容易に入手できる必要がある。同様に、既知のクラス1又はクラス2の変異原性物質が市販製品中に新たに確認された場合についても、懸念の理由となり得る。これらいずれの場合においても、申請者がこの新たな情報を知ったときには、本ガイドラインに従い評価を行うべきである。

5. 原薬及び製剤中の不純物に関する評価

新原薬の合成及び保管、並びに新製剤の製造及び保管の間に生じる可能性が高い実際の不純物及び潜在的な不純物について評価すること。

不純物の評価は2段階の過程で行う。

- 構造が決定されている実際の不純物についての変異原性を検討。
- 潜在的な不純物が最終原薬中に存在する可能性を評価し、変異原性についての更なる評価の必要性を判断。

合成不純物及び分解生成物に適用する手順は、それぞれ5.1項及び5.2項で説明する。

5.1 合成不純物

実際の不純物には、ICH Q3Aの報告の必要な閾値を超えて原薬中に認められる不純物が含まれる。実際の不純物の構造決定は、そのレベルがICH Q3Aの構造決定の必要な閾値を超える場合に実施することが期待される。一部の不純物については、構造決定の必要な閾値未満であっても、構造が決定されていることがある。

原薬中の潜在的な不純物としては、出発物質、出発物質から原薬に至る合成ルート上の試薬及び中間体が含まれる。

構造を決定した不純物のうち、出発物質及び中間体中に認められている不純物、並びに出発物質から原薬に至る合成ルートにおいて合理的に予想される副生成物については、原薬に持ち越されるリスクを評価すべきである。一部の不純物については、原薬に持ち越されるリスクはほとんどないと考えられるため(例えば、長い合成ルートの初期合成段階における不純物など)、

ある工程以降から不純物の変異原性を評価することに関し、その妥当性をリスクに基づいて示すことができる。

原薬合成の後期に用いられる出発物質（かつ、その出発物質の合成ルートがわかっている場合）については、その出発物質の合成の最終段階の工程について潜在的な変異原性不純物に関する評価を行うべきである。

構造が既知である実際の不純物及び上記に定義されるような潜在的な不純物については、変異原性について6項に従って評価するべきである。

5.2 分解生成物

実際の原薬分解生成物には、提案された長期保存条件下、一次包装及び二次包装で原薬を保存中に、ICH Q3A の報告の必要な閾値を超えて認められる分解生成物が含まれる。製剤中の実際の分解生成物には、提案された長期保存条件下、一次包装及び二次包装で製剤の保存中に、ICH Q3B の報告の必要な閾値を超えて認められた分解生成物、並びに当該製剤の製造中に生成する不純物が含まれる。実際の分解生成物の構造決定は、そのレベルが ICH Q3A/Q3B の構造決定の必要な閾値を超える場合に実施することが期待される。一部の分解生成物については、構造決定の必要な閾値未満であっても構造が決定されていることがある。

原薬及び製剤中の潜在的な分解生成物は、長期保存条件下で生成することが合理的に予測される分解生成物である。潜在的な分解生成物には、加速安定性試験（例えば、40°C/75%相対湿度で6ヵ月間）及び ICH Q1B (5) に示されている光安定性を確認するための試験において、ICH Q3A/Q3B の構造決定の必要な閾値を超えて生成するが、長期保存条件下、一次包装中において原薬又は製剤でまだ確認されていない分解生成物が含まれる。

例えば、分解に関する化学の原理、関連する苛酷試験、及び開発時の安定性試験から得た知識など、関連する分解経路の知識は、変異原性評価の対象となる潜在的分解生成物を選択する際に指標として役立つことができる。

最終の原薬又は製剤中に存在する可能性が高く、構造が既知である実際の分解生成物及び潜在的な分解生成物については、6項に従って変異原性を評価する。

5.3 臨床開発に関する検討事項

5.1 項及び 5.2 項に示した不純物の評価を臨床開発中の製品に適用することが期待されている。しかしながら、利用できる情報は限られている。例えば、長期安定性試験及び光安定性試験からの情報は臨床開発時には得られていないことがあるため、潜在的な分解生成物に関する情報

は限られる場合がある。また、ICH Q3A/Q3B に示された閾値は臨床開発中の製品には適用されないことから、構造が決定される不純物が少なくなる。

6. ハザード評価の要件

ハザード評価では、実際の不純物及び潜在的な不純物を表 1 に従ってクラス 1、2 又は 5 として分類するために、がん原性試験及び細菌を用いる変異原性試験に関するデータについてのデータベースや文献検索による初期分析が必要である。そのような分類に用いるデータが得られない場合は、細菌を用いる変異原性試験の予測を目的とした構造活性相関 (SAR: structure-activity relationship) の評価を実施すべきである。これにより、不純物をクラス 3、4 又は 5 に分類できる。

表 1: 潜在的な変異原性及びがん原性に関する不純物の分類と管理措置

クラス	定義	提案される管理措置 (詳細は 7 項及び 8 項に記載)
1	既知の変異原性発がん物質	化合物特異的な許容限度値以下で管理する
2	発がん性が不明の既知の変異原性物質 (細菌を用いる変異原性試験で陽性*であり、げっ歯類の発がん性データがない物質)	許容限度値 (適切な TTC) 以下で管理する
3	警告構造を有し、原薬の構造とは関連しない警告構造であり、変異原性試験のデータが存在しない	許容限度値 (適切な TTC) 以下で管理する、又は細菌を用いる変異原性試験を実施する 変異原性がない場合はクラス 5 変異原性がある場合はクラス 2
4	警告構造を有するが、試験によって変異原性がないことが示されている原薬又は原薬に関連する化合物 (工程中間体など) と同じ警告構造である	非変異原性不純物として扱う
5	警告構造を有しないか、警告構造を有するが変異原性もしくは発がん性のないことを示す十分なデータが存在する	非変異原性不純物として扱う

* 又は遺伝子突然変異誘発と関連した DNA 反応性を示唆する、その他の関連する陽性の変異原性データ (例えば、*in vivo* 遺伝子突然変異試験における陽性所見など)

コンピュータによる毒性評価は、細菌を用いる変異原性試験の結果を予測する(Q)SAR 法を用いて実施すべきである (6)。互いに相補的な 2 種類の(Q)SAR 予測法を適用すべきである。一

つは、専門的経験に基づくルールベースの方法、二つ目は統計ベースの方法とする。これらの予測法を用いる(Q)SAR モデルは、経済協力開発機構 (OECD) によって定められたバリデーションの一般原則に従っている必要がある。

相補的な二つの(Q)SAR 法 (専門的経験に基づくルールベースの方法及び統計ベースの方法) において警告構造のないことが示されれば、その不純物には変異原性に関する懸念がないと結論するのに十分であり、更なる試験を推奨するものではない (表 1 のクラス 5)。

必要に応じて、陽性、陰性、相反又は結論不可能な予測結果に関連する更なる根拠を示すとともに、最終結論を支持する合理的な根拠を示すため、コンピュータシステムに基づく全ての解析結果は専門的な知識によりレビューすることができる。

問題とされる警告構造 (表 1 のクラス 3) をフォローアップするには、適切な管理対策を行うか、不純物単独での細菌を用いる変異原性試験を実施することができる。細菌を用いる変異原性試験を適切に実施し (注 2) その結果が陰性であれば、構造に基づく懸念は払拭されることから、更なる遺伝毒性評価は推奨されない (注 1)。これらの不純物は非変異原性不純物とみなすべきである (表 1 のクラス 5)。細菌を用いる変異原性試験の結果が陽性であれば、さらなるハザード評価や管理対策を必要とする (表 1 のクラス 2)。例えば、不純物のレベルを適切な許容限度値で管理できない場合、細菌を用いる変異原性試験の結果の *in vivo* 条件下における関連性を理解するために、その不純物を *in vivo* 遺伝子突然変異試験で検証することが推奨される。他の *in vivo* 遺伝毒性試験を選択するにあたっては、その不純物の作用機序及び予想される標的組織への曝露に関する知見に基づき (注 3)、その科学的な妥当性を示す必要がある。*in vivo* 試験は既存の ICH 遺伝毒性ガイドラインを考慮してデザインすべきである。適切な *in vivo* 試験の結果は、化合物特異的不純物の限度値を設定する際の裏付けとすることができる。

細菌を用いる変異原性試験で原薬又は関連化合物を試験した結果が陰性であるならば、それらと共通の警告構造 (例えば、同じ部位及び同じ化学的環境の警告構造など) を持つ不純物は非変異原性と判断される (表 1 のクラス 4)。

7. リスクの特性解析

6 項に記載されているハザード評価の結果、各不純物は表 1 の 5 つのクラスのいずれかに分類される。クラス 1、2 及び 3 に分類される不純物について、許容摂取量の算出に用いるリスク特性解析の原則を本項で述べる。

7.1 TTC に基づく許容摂取量

変異原性不純物の TTC に基づく許容摂取量である 1.5 $\mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ は、リスクが無視できる程度 (理論上の過剰発がんリスクは生涯曝露において 10 万分の 1 未満) とみなされており、一般

的には多くの医薬品に対し、管理に用いる許容限度値を算出する既定値として使用できる。この方法は通常、長期投与（10年超）を目的とした医薬品中の発がん性データが得られていない変異原性不純物に使用される（クラス2及び3）。

7.2 化合物特異的なリスク評価に基づく許容摂取量

7.2.1 発がん性陽性データを有する変異原性不純物（表1のクラス1）

十分な発がん性データが存在する場合、許容摂取量の算出を目的とした化合物特異的なリスク評価を、TTCに基づく許容摂取量の代わりに適用するべきである。既知の変異原性発がん物質については、発がん性の強さを直線外挿する既定の方法により、化合物特異的な許容摂取量を算出できる。あるいは、国際的規制機関で使用されているような確立された他のリスク評価手法を適用して許容摂取量を算出したり、規制当局が公表している既存値を使用してもよい（注4）。

化学的類似性を示す理論的根拠及びそれを裏付けるデータを示すことにより、既知の発がん物質クラスと化学的に類似している不純物については、化合物特異的な許容摂取量を個別に算出できる（クラス特異的な許容摂取量、注5）。

7.2.2 実質的な閾値の根拠が示されている変異原性不純物

DNA以外の標的と相互作用する化合物だけでなく、DNA反応性化合物でも、用量反応関係が非線形であるか実質的な閾値を持つような機序が存在することが、次第に認識されてきている。それらの作用は、例えばDNAとの接触前の迅速な解毒作用や、誘導されたDNA損傷の効率的な修復などにより、調節されている可能性がある。これらの化合物への規制上の対応としては、データが入手可能な場合、無作用量（NOEL：no-observed effect level）の同定と不確実係数（ICH Q3C（R5）参照）（7）に基づき、許容1日曝露量（PDE：permissible daily exposure）を算出することができる。

化合物特異的なリスク評価（7.2項）で算出した許容摂取量は、短期における使用に関して、次項（7.3.1項及び7.3.2項）に規定したものと同じ比率で調整するか、もしくは0.5%以下のいずれか低い値で制限する。例えば、生涯曝露の化合物特異的な許容摂取量が15 µg/dayである場合、生涯よりも短い期間の限度値（表2）は、100 µg（投与期間が1年超～10年）、200 µg（1ヵ月超～12ヵ月）、又は1200 µg（1ヵ月未満）という1日摂取量まで増量できる。ただし、1日当たりの最大用量が例えば100 mgの薬剤については、投与期間が1ヵ月未満の許容1日摂取量を1200 µgではなく0.5%（500 µg）に制限することになる。

7.3 生涯よりも短い期間（LTL）の曝露に関する許容摂取量

既知の発がん物質の標準的なリスク評価では、累積投与量に応じて発がんリスクが増加すると想定している。したがって、生涯にわたって連続的に低用量で投与される場合の発がんリスクは、同一の累積曝露量をより短期間に平均して投与した場合と同等と考えられる。

TTCに基づく許容摂取量である 1.5 µg/day は、一生涯にわたって毎日曝露されても安全であると考えられる。医薬品中の変異原性不純物に対する LTL の曝露に関しては、一生涯の累積許容量 (1.5 µg/day×25,550 days = 38.3 mg) を LTL 曝露期間中の総曝露日数にわたって均等に分配する方法を適用する。これにより、変異原性不純物の 1 日摂取量を、曝露が一生涯にわたる場合より高くすることができる一方で、連日投与も非連日投与も、リスクレベルを同程度に維持することが可能となる。表 2 は上記の概念から得られたものであり、臨床開発段階及び市販における、一生涯よりも短い期間から生涯にわたる曝露の許容摂取量を示している。間歇投与の場合には、許容 1 日摂取量は投与された期間ではなく総投与日数に基づくべきであり、投与日数は該当する表 2 の投与期間と関連させるべきである。例えば、週 1 回 2 年間投与する (すなわち、104 日の投与日数) 医薬品については、1 回あたりの許容摂取量は 20 µg となる。

表 2：個々の不純物に対する許容摂取量

投与期間	1 ヶ月以下	1 ヶ月超 12 ヶ月まで	1 年超 10 年まで	10 年超 一生涯
1 日摂取量 [µg/day]	120	20	10	1.5

7.3.1 臨床開発

この LTL の概念により、1 ヶ月以下、1~12 ヶ月、及び 1 年を超えて第 III 相臨床試験を終えるまでの臨床開発における限定された投与期間に応じた変異原性不純物の許容摂取量が推奨される (表 2)。このような補正した許容摂取量は、まだベネフィットが確立されていない臨床開発の初期では 10^{-6} のリスクレベルを、開発後期には 10^{-5} のリスクレベルを維持している (注 6)。

投与日数が 14 日以内の第 I 相臨床試験については、変異原性不純物に対して補正した許容摂取量を厳密に使用することなく、代替アプローチを適用することができる。このアプローチにおいては、既知の変異原性発がん物質 (クラス 1)、発がん性が不明の既知の変異原性物質 (クラス 2)、及び「cohort of concern」に分類される不純物のみを、7 項に記載されている許容限度値で管理する (8 項を参照)。これ以外のすべての不純物は、非変異原性不純物として取り扱うことができる。これには警告構造を持つ不純物 (クラス 3) が含まれているが、警告構造が認められるだけでは、期間が限られている第 I 相臨床試験において評価を実施することにはつながらない。

7.3.2 市販製品

市販製品に対する、表 2 の投与期間と許容摂取量の分類は、大部分の患者が曝露されると予期される期間に対して適用することを意図している。これらの摂取量を適用するにあたって、様々なシナリオにともなった摂取量の案を、表 4、注 7 に記載している。一部の患者集団では、市販製品の分類上の上限を超える治療期間となる場合がある (例えば、10 µg/day という許容摂取量

に対し治療期間が 15 年など 10 年を超える場合)。これは、10 年間治療される大部分の患者で算出した総リスクと比較して、無視できる程度の増加（先に挙げた例では、1.5/100,000 への微増）と考えられる。

7.4 複数の変異原性不純物に関する許容摂取量

TTC に基づく許容摂取量は個々の不純物に適用すべきである。クラス 2 又はクラス 3 の不純物が 2 つ存在する場合には、個別の限度値を適用する。原薬の規格に規定されたクラス 2 又はクラス 3 の不純物が 3 つ以上の場合には、臨床開発及び市販製品の変異原性不純物の合計は、表 3 に記載されている値に制限すべきである。

配合剤については、それぞれの有効成分ごとに規制するべきである。

表 3：複数の不純物に対する許容 1 日総摂取量

投与期間	1 ヶ月以下	1 ヶ月超 12 ヶ月まで	1 年超 10 年まで	10 年超 一生涯
1 日 総摂取量 [µg/day]	120	60	30	5

原薬の規格に個別に規定されたクラス 2 及びクラス 3 の不純物のみを合計値の計算に含める。ただし、化合物特異的な許容摂取限度値やクラスに関連した許容摂取限度値を有する不純物（クラス 1）は、クラス 2 及びクラス 3 の不純物の合計値には含めない。また、製剤中で生成する分解生成物は個別に管理し、合計の限度値は適用しない。

7.5 アプローチの例外及び柔軟性

- 食品や内因性代謝（例えば、ホルムアルデヒドなど）に由来する不純物への曝露量が極めて大きい場合、より高い許容摂取量の設定を正当化できる場合がある。
- 重症疾患、余命が限られる場合、後期発症性の慢性疾患、又は治療法の選択肢が限られている場合には、適切な許容摂取量について個別の例外を正当化することができる。
- 例えばアフラトキシン様構造、N-ニトロソ構造、アルキルアゾキシ構造などの一部の変異原性物質の構造クラスに分類される化合物は、極めて強い発がん性を示す可能性がある（cohort of concern）。このような化合物が医薬品中に不純物として認められた場合には、これらの強い発がん物質に対する許容摂取量は本ガイドラインに規定された許容摂取量よりも著しく低い値となることを見込まれる。本ガイドラインの原則を使用することは可能だが、医薬品開発及び市販製品における許容摂取量を正当化する

ためには、例えば、可能なら類似構造を持つ物質の発がん性データを用いるなどして、通常、ケースバイケースの方法を開発するべきである。

7項で述べた上記のリスク対応はすべての投与経路に適用可能であり、許容摂取量の見直しは一般に必要とされない。考慮すべき例外には、特定の投与経路での懸念がデータによって示されている場合が含まれ、それらの懸念についてはケースバイケースで評価する必要がある。また、慎重なリスク対応を適用していることから、これらの対応方法はすべての患者集団に適用することができる。

8. 管理

管理戦略は最新の製品及び製造工程の理解から導かれる、製造プロセスの稼働性能及び製品品質を保証する計画された管理の一式である (ICH Q10) (8)。管理戦略には以下のような事項が含まれるが、これらに限らない。

- 物質特性の管理 (原料、出発物質、中間体、試薬、溶媒、一次包装材料を含む)
- 設備及び装置の運転条件
- 製造工程の設計に事実上含まれている管理
- 工程内管理 (工程内試験及び工程パラメータを含む)
- 原薬及び製剤に関する管理 (例えば、出荷試験)

ある不純物が表1のクラス1、2、3とされている場合、原薬及び製剤中のその不純物のレベルが許容限度値以下であることを保証する管理戦略の構築が重要となる。原薬の製造工程に関連する化学及び製剤の製造工程についての十分な知識は、原薬及び製剤の総合的な安定性に関する理解と併せ、適切な管理を開発する基本となる。製剤中の変異原性不純物を管理する戦略の開発は、ICH Q9 (9) に示されたリスクマネジメントプロセスと一致する。製品及び工程の理解並びにリスクマネジメントの原則に基づく管理戦略は、工程の設計及び管理と適切な分析試験の組み合わせを導き、これにより、管理を上流に移行するとともに、最終製品の試験の必要性を最小にする機会が得られる。

8.1 製造工程由来不純物の管理

原薬の管理戦略を構築するには、次の4つの方法が可能である。

オプション1

原薬の規格に不純物の試験を含め、適切な分析法を用いて許容限度値以下の値を判定基準とする。

オプション1の管理方法については、ICH Q6A (10)に基づき、定期的検証試験を適用することが可能である。原薬中の変異原性不純物のレベルが許容限度値の30%未満であることを、パイロットスケールでは連続する6バッチ以上、又は生産スケールでは連続する3バッチ以上のデータを用いて示すことができる場合、定期的検証試験が妥当とされる。この条件を満たさない場合には、原薬の規格によるルーチン試験が推奨される。その他の検討事項については8.3項を参照すること。

オプション2

原料、出発物質又は中間体の規格に不純物の試験を含めるか、工程内管理として不純物の試験を実施し、適切な分析法を用いて許容限度値以下の値を判定基準とする。

オプション3

原料、出発物質又は中間体の規格に不純物の試験を含めるか、工程内管理として不純物の試験を実施し、適切な分析法を用いて原薬中の不純物の許容限度値を超える値を判定基準とする。加えて、実証された不純物の挙動と除去及び関連する工程管理により、後続する工程において追加試験を必要とせずとも、原薬中の不純物レベルが許容限度値未満であることを保証する。

このオプションは、実験室スケールの実験データ（添加実験が推奨される）をレビューすることにより原薬中の不純物レベルが許容限度値の30%未満であることを示せる場合に正当化できる。必要に応じて、パイロットスケール又は実生産スケールのバッチのデータにより裏付けることができる。事例1及び2を参照すること。オプション3の妥当性を示すには他の方法を使用することもできる。

オプション4

工程パラメータと残留する不純物のレベルに与える影響（不純物の挙動と除去に関する知識を含む）について十分な確信をもって理解されており、この不純物に対する試験が必要とされないほど原薬の不純物のレベルが許容限度値未満となる（すなわち、いずれの規格にも不純物を記載する必要がない）。

変異原性不純物のレベルに影響を及ぼすプロセス化学及び工程パラメータが理解されており、不純物が最終原薬中に許容限度値を超えて残留するリスクが無視できるほど小さいと判定した場合は、分析試験に代わり工程管理による管理戦略が適切であるといえる。多くの場合、この管理方法は科学的原理のみに基づいて妥当とすれば十分である。オプション4の方法の妥当性を示すために、科学的リスク評価の要素を使用することができる。このリスク評価は、不純物の挙動と除去に影響する物理化学的特性及び工程要素に基づくことができ、化学反応性、溶解性、揮発性、イオン化性や、不純物を除去するためデザインしたあらゆる物理的な工程が含まれる。

このリスク評価の結果は、工程による不純物の除去に関する推定パージファクターとして示してもよい (11)。

オプション4は、本質的に不安定な不純物（例えば、水と速やかかつ完全に反応する塩化チオニルなど）や、合成初期に導入され効果的に除去される不純物に対し、特に有用である。合成の後期に不純物が生成する、もしくは導入される場合においても、オプション4が適切な場合があるが、プロセスに特有のデータをもって正当化しなければならない。

8.2 管理方法の検討事項

オプション4について、オプション3も同様であるが、科学的原理のみに基づくだけでは正当化できない場合、管理方法を支持する分析データが期待される。これには、下流の化学による不純物の構造変化（「挙動」）に関する適切な情報、パイロットスケールのバッチに関する分析データ、そして場合によっては不純物を意図的に添加した実験室スケールの研究（「添加実験」）を含めることができる。このような場合、不純物の挙動・除去に関する論拠が頑健であり、不純物が許容限度値を超えて最終原薬中に残留する可能性が無視できる程度であることを一貫して保証するものであると実証することが重要である。パージファクターが開発データに基づく場合、予測されるスケール依存性又は非依存性について述べることが重要である。開発段階で用いた小規模モデルが実生産スケールを代表しないと考えられる場合、パイロット規模のバッチ又は初期の実生産バッチでの適切な管理を確認することが、一般的には適切である。パイロットバッチや実生産バッチからのデータの必要性は、実験室スケール又はパイロットスケールのデータから算出したパージファクターの大きさ、不純物の導入ポイント、及び下流工程における除去ポイントに関する知識によって左右される。

オプション3及びオプション4の妥当性を示すことができない場合、原料、出発物質又は中間体の規格、又は工程内管理として（オプション2）、あるいは原薬の規格（オプション1）に、許容限度値での不純物に対する試験を含めるものとする。合成の最終工程で導入される不純物については、妥当性が示されない限り、オプション1の管理方法の適用が期待される。

変異原性不純物のレベルが許容限度値未満である場合、「合理的に実行可能な限り低減する」（ALARP : as low as reasonably practicable）という原則を必ずしも適用しなくてもよい。同様に、代替合成ルートを探索したことを必ずしも示さなくともよい。

管理を行っても変異原性不純物のレベルを許容限度値未満まで低減できず、そのレベルが合理的に実行可能な限り低減したものである場合、リスク・ベネフィット分析に基づき、より高い限度値を正当化できる場合がある。

8.3 定期的試験に関する検討事項

上記オプションには、規格に試験を含めることが推奨されるものの、すべてのバッチの出荷に際してルーチン試験を必要としなくてもよい場合が含まれる。この手法は、ICH Q6A で定期的試験又はスキップ試験と呼ばれ、「定期的検証試験」とも呼ぶことができる。この手法は、不純物の生成・導入後の工程によって不純物が除去されることを実証できるならば適切な場合がある。定期的検証試験を許容するには、工程が管理された状態にあること（すなわち、一貫して規格を満たす高品質な製品を生産し、適切に確立された設備、装置、工程及び操作管理計画に従っている工程）が条件であることに留意すべきである。試験の結果、変異原性不純物のレベルが定期的試験を行うに当たって設定された判定基準に適合しないようなことがあれば、医薬品の製造業者は直ちに完全な試験（すなわち、すべてのバッチについて規定された項目を試験する）を開始し、不適合の原因が明確に判定され、是正措置が実施され、その工程が再び管理状態にあることが文書に記録されるまで継続しなければならない。ICH Q6A に示されているように、定期的検証試験において不適合となった場合には規制当局に通知し、試験を実施しなかった出荷済みのバッチについてリスク・ベネフィットを評価する。

8.4 分解生成物の管理

変異原性を有するとみなされた潜在的な分解生成物については、その分解経路が原薬及び製剤の製造工程又は提案される包装形態及び保存条件と関連があるか理解することが重要である。潜在的な分解生成物の関連性を判断するため、提案された包装形態において、適切な分析法を用い、適切に計画した加速安定性試験（例えば、40°C/75%の相対湿度、6 ヶ月）を実施することが推奨される。あるいは、分解経路との関連性を明らかにするため、長期安定性試験を実施する前に、提案された市販包装形態において、適切に設計され、高温条件での速度論的に同等な短期安定性試験を実施することができる。製品では未だ確認されていないが、可能性のある分解経路に関する知識に基づいた、潜在的な分解生成物の関連性を理解するには、この種の試験が特に有用である。

これらの加速試験の結果に基づき、提案された包装形態及び保存条件下で許容限度値に近いレベルで分解生成物が生成されることが予測される場合は、分解生成物の生成を管理する取り組みが求められる。このような場合、他に妥当性が示されない限り、提案された保存条件（市販包装形態を用い）での長期安定性試験により、原薬又は製剤の分解生成物をモニターすることが期待される。一般に、変異原性分解生成物について規格値を設定することが適切かどうかは、これらの安定性試験の結果によって決まる。

製剤開発や包装設計によっても変異原性分解生成物のレベルを許容限度値未満に管理できないことが予測され、そのレベルが合理的に実行可能な限り低減したものである場合、リスク・ベネフィット分析に基づき、より高い許容限度値を正当化できる。

8.5 ライフサイクルマネジメント

本項は、本ガイドラインの公開後に承認された製品への適用を意図としている。

ICH Q10 で示した品質システムの要素及び経営陣の責任は、ライフサイクルの各段階における、科学及びリスクに基づく手法を用いることを奨励し、それにより製品ライフサイクルの全期間にわたり継続的改善を促進する。製品及び製造プロセスの知識は、製品の開発から終結までを含む、製品の商業的寿命の期間を通して管理すべきである。

原薬又は製剤の製造工程の開発及び改善は通常、そのライフサイクル全体を通して継続的に行われる。管理戦略の有効性を含め、製造工程の稼働性能を定期的に評価すべきである。実生産から得られる知識を利用すれば、工程の理解や工程の稼働性能をさらに改善し、管理戦略を修正することができる。

製造工程に対する何らかの変更を提案する場合、原薬及び製剤の品質に対する影響について評価する必要がある。この評価は製造工程の理解に基づくべきであり、提案した変更による影響を分析するために適切な試験が必要であるか判断しなければならない。また、分析法の改善が不純物の構造同定につながる可能性がある。このような場合、本ガイドラインで説明しているように新規構造の変異原性について評価する。

製品のライフサイクル全期間にわたり、意図した、又は意図していない変更が工程に発生した場合には、試験が推奨されるか再評価することが重要となる。これは、許容限度値での日常的モニタリングが実施されていない場合（オプション3又はオプション4の管理方法）、又はバッチごとの試験ではなく定期的試験を適用している場合に当てはまる。この試験は製造工程の適切なポイントで実施すべきである。

統計的工程管理及び工程計測値の傾向解析は、不純物を適切に管理するための製造プロセスの継続する適切性及び能力に有用となる場合がある。統計的工程管理は、不純物が日常的にモニターされていない場合（例えば、オプション4など）においても、不純物の生成や除去に影響を与える工程パラメータを根拠とすることができる。

あらゆる変更事項は品質システムの一部として内部変更マネジメントプロセスの対象とすべきである（ICH Q10）。申請書類で承認されている情報に対する変更は、各極の規制及びガイドラインに従って規制当局に報告する必要がある。

8.6 臨床開発に関する検討事項

製品と工程に関する知識は開発の過程を通じて蓄積されていくと認識されている。したがって、臨床開発試験段階における管理戦略を支持するデータは、製造販売承認申請時に比べて少ないことが予想される。原薬又は製剤中に存在する可能性が最も高い不純物に対する分析の取り組み

みを優先させるため、プロセス化学の基本原理に基づくリスクベースの方法が推奨される。不純物が存在する可能性が低い場合、初期の臨床開発を支持するために、分析データは必ずしも期待されていないが、同様の状況であっても製造販売承認申請においては、管理方法を支持するために分析データが適切な場合もある。また、市販処方設計は臨床開発の後期に行われることも認識されているため、臨床開発の初期には製剤分解生成物に関連する取り組みが限られていると考えられる。

9. ドキュメンテーション

本ガイドラインに関連する情報は、以下の各段階において提示する必要がある。

9.1 治験届

- 変異原性を評価する不純物構造の数及び分析データの集積は、いずれも臨床開発期間を通じて増加することが期待される。
- 14日以内の第I相臨床試験については、7項で概説している、クラス1及びクラス2の不純物及び「cohort of concern」に含まれる不純物に焦点を置き、変異原性不純物のリスクを軽減する取り組みに関する説明を含めること。14日を越える第I相臨床試験及び第IIa相臨床試験については、分析管理を要するクラス3の不純物も含めること。
- 第IIb相及び第III相臨床試験については、(Q)SARにより評価した不純物の一覧を含めるべきであり、すべてのクラス1、クラス2、又はクラス3の実際の不純物及び潜在的な不純物について、管理計画とともに説明すること。評価に使用した *in silico* (Q)SAR システムについて記述すること。実際の不純物に関する細菌を用いる変異原性試験の結果を報告すること。
- 存在する可能性が低い潜在的な不純物については、8.6項に記載されているように、分析データではなく化学的論拠が適切な場合がある。

9.2 コモンテクニカルドキュメント（製造販売承認申請）

- 本ガイドラインに従って評価した製造工程に関連する実際の不純物や分解生成物及び潜在的な不純物や分解生成物について、変異原性不純物の分類及びこの分類の根拠を記載すること。
 - これには、*in silico* (Q)SAR の結果及び使用したシステムの種類、そして必要に応じてクラス4及びクラス5の不純物について総合的な結論に至った裏付けとなる情報を含める。
 - 不純物について細菌を用いる変異原性試験を実施した場合、当該試験について試験報告書を提出する。
- 提案された規格及び管理手法の妥当性について記載すること（例えば、ICH Q11 例 5b など）（12）。例えばこの情報には、許容摂取量、関連する日常的モニタリングの設定ポイント及びその感度が含まれる。オプション3及びオプション4の管理方法につい

ては、パージファクターに関する知識の要約、及び管理につながる要素（例えば、工程ステップ、洗浄液への溶解性など）の特定が重要である。

注記

注1 ICH M7 ガイドラインの勧告では、不純物が点突然変異を引き起こす可能性を評価するための最新の手法が示されており、このような不純物は安全なレベルに管理されることから、ICH Q3A/Q3B で規定されている安全性確認の必要な閾値よりも低いか高いかを問わず、変異原性がある可能性についてさらに安全性評価を行うことを必要とされない。これには、始めに(Q)SAR ツールを使用して細菌における変異原性を予測することが含まれる。長期投与において不純物の1日量が1 mg を超える場合には、ICH Q3A/Q3B で推奨している遺伝毒性評価を考慮することができる。不純物の量が1 mg 未満の場合、他に規定されている安全性確認の必要な閾値に関わらず、更なる遺伝毒性試験は必要ない。

注2 ICH S2 (R1) 及び OECD 471 ガイドラインに準拠した十分適切なプロトコルを用いて、細菌を用いる変異原性試験を一試験実施すれば、不純物に変異原性がある可能性を評価できる（13 及び 14）。試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP：Good Laboratory Practices）の規則を遵守して実施することが求められる。しかしながら、GLP 規則を完全には遵守していないことが、臨床試験及び製造販売承認を支持するデータとして使用できなくなることを必ずしも意味するものではない。そのような逸脱は試験報告書に記載する必要がある。例えば、被験物質の調製又は分析を GLP 規則に遵守して行えない場合がある。検出された警告構造に対する感受性が証明されている試験菌株に限定される場合もある。単離や合成ができないか、又は化合物量が限られている場合の不純物については、現行の試験ガイドラインに準拠し ICH に適合した細菌を用いる変異原性試験が、推奨される最高試験濃度で実施できないことがある。このような場合、妥当と考えられる高濃度での試験を可能とするため、ICH に準拠した試験との一致性が高いことが証明されている小規模の試験系により、細菌を用いる変異原性試験を実施することができる。

注3 *in vitro* 変異原性物質（細菌を用いる変異原性試験で陽性）の *in vivo* への関連性を検討するための試験

<i>in vivo</i> 試験	目的に適した試験法選択の妥当性を示す要素
トランスジェニック突然変異試験	<ul style="list-style-type: none"> 細菌を用いる変異原性試験で陽性。試験に選択した組織や臓器が妥当であることを示す
<i>Pig-a</i> 試験（血液）	<ul style="list-style-type: none"> 直接作用する変異原性物質（細菌を用いる変異原性試験が S9 非存在下で陽性）*
小核試験（血液又は骨髄）	<ul style="list-style-type: none"> 直接作用する変異原性物質（細菌を用いる変異原性試験が S9 非存在下で陽性）でかつ染色体異常誘発作用が確認されている化合物*

ラット肝不定期 DNA 合成 (UDS) 試験	<ul style="list-style-type: none"> 特に細菌を用いる変異原性試験が S9 存在下でのみ陽性 原因となる肝代謝物について以下が確認されている <ul style="list-style-type: none"> 試験に用いた動物種で生成される バルキーアダクトを誘発する
コメット試験	<ul style="list-style-type: none"> 妥当性を示す必要あり (アルカリに不安定な部位や一本鎖切断などの形成といった、突然変異に至る可能性のある初期 DNA 損傷に特有な作用機序を有した化合物クラス) 試験に選択した組織や臓器が妥当であることを示す
その他	<ul style="list-style-type: none"> 説得力のある根拠を示す。

* 間接的に作用する (代謝活性化を必要とする) 変異原性物質については、代謝物の曝露量が妥当であることを立証する必要がある。

注4 TD₅₀からの直線外挿の例

TD₅₀ 値 (腫瘍発生率が 50%となる用量であり、発がんリスクの確率が 1/2 であることと同等) などのげっ歯類の発がん性データから、化合物特異的許容摂取量を算出することができる。10 万分の 1 (すなわち、生涯許容リスクレベル) の確率への直線外挿は、単純に TD₅₀ を 50,000 で除すことで実施できる。これは TTC の算出に用いられる手順と類似している。

計算例：エチレンオキシド

発がん性データベースによれば、エチレンオキシドの TD₅₀ 値は 21.3 mg/kg body weight/day (ラット)、及び 63.7 mg/kg body weight/day (マウス) である。許容摂取量の算出には、より低い (すなわち、より慎重な) ラットでの値を用いる。

動物 10 万匹中 1 匹に腫瘍を引き起こす用量を求めるには、以下のように 50,000 で除す。

$$21.3 \text{ mg/kg} \div 50,000 = 0.42 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

ヒトの総 1 日量は以下のように求める。

$$0.42 \text{ } \mu\text{g/kg/day} \times 50 \text{ kg body weight} = 21.3 \text{ } \mu\text{g/person/day}$$

このように、1 日当たり 21.3 μg のエチレンオキシドの一生涯にわたる摂取は、10⁻⁵ の理論上の発がんリスクに相当し、この値が原薬中に不純物として存在する場合の許容摂取量となる。

発がんリスクの評価に関する代替方法及び公表された規制上の限度値

ヒトとの関連性とは関係なくげっ歯類のがん原性試験から最も慎重な TD₅₀ 値を用いる方法を選択する代わりに、入手可能な発がん性データを毒性専門家が詳細に評価してもよい。これは、直線外挿の基準点を求めるための基礎として、ヒトのリスク評価との関連

性が最も高い所見（動物種、臓器など）を最初に特定するために行われる。また、用量-反応曲線の形状についてより直接的に考察するため、発がん性の数値的指標として TD_{50} 値を用いる代わりに、10%ベンチマーク用量信頼下限値（BMDL10：benchmark dose lower confidence limit 10%、げっ歯類における発がん率が10%以下であると95%の確率で信頼できる推定最低用量）のようなベンチマーク用量を用いることもできる。その場合、単純に BMDL10 を 10,000 で除すことで、10 万分の 1（すなわち、生涯許容リスクレベル）の確率への直線外挿を実施できる。

化合物特異的許容摂取量も、適切な生涯リスクレベルである 10^{-5} を使い、世界保健機関（WHO、International Program on Chemical Safety [IPCS] Cancer Risk Assessment Programme）などの国際的に認知された機関が公表した推奨値から求めることができる。一般に、規制上の限度値として適用される値は最新の科学的に裏付けされたデータ又は方法に基づいている必要がある。

注5 変異原性不純物の化合物特異的許容摂取量の算出は、化学的に定義された既知の発がん物質のクラスに構造が類似している（発がん性データがない）変異原性不純物に適用してもよい。例えば、単官能基塩化アルキルの発がん性に関連する因子は特定されており（15）、これを用いて、医薬品合成によく用いられる塩化アルキルの一群である、単官能基塩化アルキルの安全許容摂取量を修正することができる。多官能基塩化アルキルと比較して、単官能基化合物は極めて弱い発がん物質であり、 TD_{50} 値は 36～1810 mg/kg/day の範囲にある（ $n=15$ 、明確に異なる 2 つの官能基を持つエピクロロヒドリンは除外している）。したがって 36 mg/kg/day という TD_{50} 値は、単官能基塩化アルキルの許容摂取量を算出する際、クラス特異的発がん性に対し、依然として非常に慎重である基準点として用いることができる。この発がんレベルは、既定の生涯 TTC ($1.5 \mu\text{g/day}$) に相当する TD_{50} である 1.25 mg/kg/day の 10 分の 1 以下であるため、単官能基塩化アルキルの一生涯及び一生涯より短い期間の 1 日摂取量を既定量の 10 倍とすることが妥当となる。

注6 医薬品中の変異原性不純物に対する一生涯より短い期間の許容摂取量の設定については、臨床開発に対して段階的 TTC 限度値を設定した前例がある（16）。毒性学の基本概念である Haber の法則の原理では、濃度（C：concentration）×時間（T：time）= 定数（k：constant）であり、一生涯より短い期間の許容摂取量（AI：acceptable intake）の算出はこの原理に基づく。したがって、発がん性は投与量及び曝露期間の両方に基づいている。

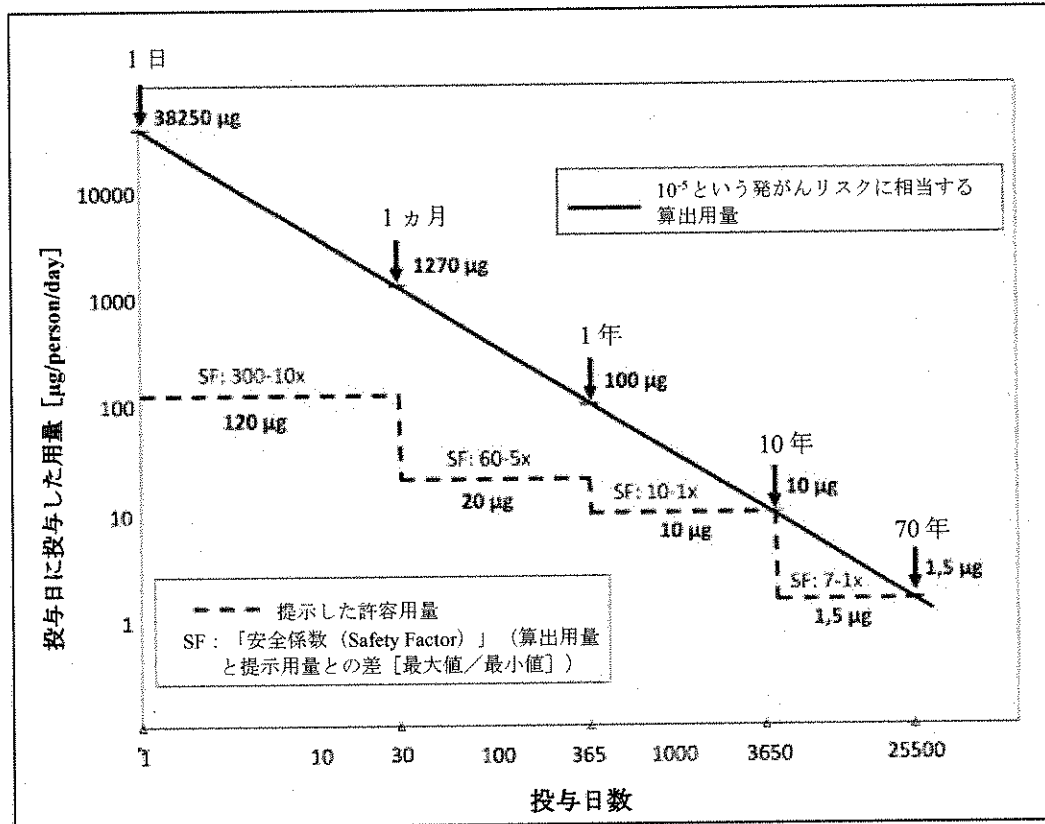


図 1: 投与期間の関数として表した 1 : 100,000 という理論上の発がんリスクに相当する量として算出した変異原性不純物の 1 日量と、7.3 項で推奨している許容摂取量レベルとの比較。

図 1 の実線は、 10^{-5} という発がんリスクに相当する変異原性不純物の 1 日摂取量と投与日数との直線関係を表す。この計算は、一生涯の投与に対し本ガイドラインで適用される TTC レベル、すなわち $1.5 \mu\text{g}/\text{person}/\text{day}$ というレベルに基づいており、以下の式を用いている。

$$\text{一生涯より短い期間の AI} = \frac{1.5 \mu\text{g} \times (365 \text{日} \times \text{一生涯} 70 \text{年} = 25,550)}{\text{総投与日数}}$$

したがって算出した 1 日摂取量レベルは、投与期間が 70 年の場合 $1.5 \mu\text{g}$ 、10 年では $10 \mu\text{g}$ 、1 年では $100 \mu\text{g}$ 、1 ヶ月では $1270 \mu\text{g}$ 、単回投与の場合約 38.3 mg となる。その結果いずれも同一の累積摂取量となるため、発がんリスクは理論的に同一となる (10 万分の 1)。

階段状の破線は、臨床開発中の製品及び市販製品について本ガイドラインの 7 項で推奨したとおりに一生涯より短い期間の曝露に補正した、実際の 1 日摂取量レベルを表す。提示したこれらのレベルは一般に算出値より著しく低いため、これによって得られる安全係数は投与期間が短くなるほど大きくなる。

投与期間が6ヵ月以下である場合、提示した許容1日摂取量は、 10^{-6} という発がんリスクレベルにも合致している。そのため、ベネフィットがまだ確立していない、健常者や患者を対象とした初期の臨床試験に適用可能である。この場合、前述のグラフに示したように、安全係数は10分の1に減少すると考えられる。

注7

表4：許容摂取量を適用する様々な投与期間の臨床使用シナリオの例

シナリオ ¹	許容摂取量 ($\mu\text{g}/\text{day}$)
投与期間が1ヵ月以下：例えば、救急処置に用いられる医薬品（解毒剤、麻酔薬、急性虚血性脳卒中）、光線角化症、シラミ治療など	120
投与期間が1ヵ月超12ヵ月まで：例えば、最大12ヵ月の投与を伴う抗感染症治療（HCV）、非経口栄養剤、抗インフルエンザ薬の予防的投与（5ヵ月程度）、消化性潰瘍、生殖補助医療（ART）、早期分娩、妊娠中毒症、術前投与（子宮摘出術）、骨折治癒など（これらは短期使用であるが半減期が長い）	20
投与期間が1年超10年まで：例えば、平均余命が短い病期にある疾患（重度のアルツハイマー病）、長期生存する患者集団で使用される非遺伝毒性型抗がん療法（乳癌、慢性骨髄性白血病）、10年以下の使用とするよう特別に注意喚起された医薬品、急性の症状再発を治療するため間歇的に投与される薬剤 ² （慢性ヘルペス、痛風発作、禁煙のような物質依存症）、黄斑変性、HIV ³ など	10
投与期間が10年超から一生涯：例えば、幅広い年齢層が生涯使用する可能性が高い長期使用の適応症（高血圧、脂質異常症、喘息、アルツハイマー病（重度のアルツハイマー病を除く）、ホルモン療法（例えば成長ホルモン、甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモンなど）、リポジストロフィー、統合失調症、うつ病、乾癬、アトピー性皮膚炎、慢性閉塞性肺疾患、嚢胞性線維症、季節性及び通年性のアレルギー性鼻炎など	1.5

¹ この表は一般的な例を示しており、各例はケースバイケースで評価すべきである。例えば、重度のアルツハイマー病のように患者の平均余命が限られている可能性がある症例では、その医薬品の使用が10年を超える場合であっても、 $10 \mu\text{g}/\text{day}$ という値を許容できる。

² 10年を超える期間にわたる間歇的な使用であるが、算出した累積用量に基づく1年超10年までの分類に該当する。

³ HIVは慢性適応症と考えられるが、5～10年後には医薬品に対する抵抗性が現れ、治療が他のHIV薬に変更される。

用語の解説

許容摂取量 (AI) (acceptable intake)

本ガイドラインでは、発がんリスクを無視できる摂取量レベル、又は重篤又は生命を脅かす疾患に対する適応症についてリスクとベネフィットとのバランスが適切である摂取量レベルを意味する。

許容限度値 (acceptable limit)

原薬又は製剤中の不純物の最高許容濃度。許容摂取量及び医薬品の1日用量から決定される。

判定基準 (acceptance criterion)

分析手順の結果が受け入れ可能か判定するための限度値、範囲、その他の適切な基準。

管理戦略 (control strategy)

最新の製品及び製造工程の理解から導かれる、製造プロセスの稼働性能及び製品品質を保証する計画された管理の一式。管理には、原薬及び製剤の原材料及び構成資材に関連するパラメータ及び特性、設備及び装置の運転条件、工程管理、完成品規格及び関連するモニタリング並びに管理の方法及び頻度を含み得る。

累積摂取量 (cumulative intake)

人が経年的に曝露された場合の物質の総摂取量。

分解生成物 (degradation product)

時間とともに及び／又は光、熱、pH及び水の作用、あるいは医薬品添加剤や直接容器／施栓系との反応により、原薬が化学変化を起こして生成した分子。

DNA 反応性 (DNA-reactive)

DNA との化学反応により DNA に直接損傷を引き起こす能力。

専門的知識 (expert knowledge)

本ガイドラインでは、既存データのレビュー及び他の関連情報の利用により *in silico* モデルによる変異原性の予測の正確性を評価することを、専門的知識と定義する。

遺伝毒性 (genotoxicity)

誘発の機序に関係なく、ゲノムに生じた有害な変化の総称。

不純物 (impurity)

原薬又は医薬品添加剤以外に原薬又は製剤中に存在する成分。

変異原性不純物 (mutagenic impurity)

適切な変異原性試験（例えば、細菌を用いる変異原性試験）において変異原性を有することが確認されている不純物。

定期的検証試験 (periodic verification testing)

ICH Q6A では定期的試験又はスキップ試験とも呼ばれている。

(Q)SAR 及び SAR

本ガイドラインでは、実験データから得られた（定量的）構造活性相関を用いた、化合物の分子（部分）構造とその変異原性活性との相関関係をいう。

パージファクター (purge factor)

除去はある工程が不純物の量を低減する能力を反映しており、パージファクターは工程の上流点での不純物レベルを下流点での不純物レベルで除した値と定義される。パージファクターは測定する場合や予測する場合がある。

警告構造 (structural alert)

本ガイドラインでは、変異原性に関連する化学構造群又は分子（部分）構造。

参考文献

1. International Conference on Harmonisation (2006). Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances.
2. International Conference on Harmonisation (2006). Q3B(R2): Impurities in New Drug Products.
3. International Conference on Harmonisation (2009). M3(R2): Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals.
4. International Conference on Harmonisation (2009). S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals.
5. International Conference on Harmonisation (1996). Q1B: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.
6. Sutter A, Amberg A, Boyer S, Brigo A, Contrera JF, Custer LL, Dobo KL, Gervais V, Glowienke S, van Gompel J, Greene N, Muster W, Nicolette J, Reddy MV, Thybaud V, Vock E, White AT, Müller L (2013). Use of in silico systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013 67:39-52.
7. International Conference on Harmonisation (2011). Q3C(R5): Impurities: Guideline for Residual Solvents.
8. International Conference on Harmonisation (2008). Q10: Pharmaceutical Quality System.
9. International Conference on Harmonisation (2005). Q9: Quality Risk Management.
10. International Conference on Harmonisation (2000). Q6A: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances.
11. Teasdale A., Elder D., Chang S-J, Wang S, Thompson R, Benz N, Sanchez Flores I, (2013) Risk Assessment of Genotoxic Impurities in New Chemical Entities: Strategies To Demonstrate Control. *Org Process Res Dev* 17:221–230.
12. International Conference on Harmonisation (2012). Q11: Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities).
13. International Conference on Harmonisation (2011). S2(R1): Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use.
14. Test 471. Bacterial Reverse Mutation Test OECD Guideline for Testing of Chemicals Section 41997July
15. Brigo, A. and Müller, L. (2011) Development of the Threshold of Toxicological Concern Concept and its Relationship to Duration of Exposure, in *Genotoxic Impurities* (Ed. A. Teasdale), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470929377.ch2
16. Müller L., Mauthe R.J., Riley C.M., Andino M.M., De Antonis D., Beels C., DeGeorge J., De Knaep A.G.M., Ellison D., Fagerland J.A., Frank R., Fritschel B., Galloway S., Harpur E., Humfrey C.D.N., Jacks A.S.J., Jagota N., Mackinnon J., Mohan G., Ness D.K., O'Donovan M.R., Smith M.D., Vudathala G., Yotti L. (2006). A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 44:198-211.

付録

付録 1: ICH M7 ガイドラインの適用対象に関するシナリオ

シナリオ	原薬への適用	製剤への適用	コメント
新原薬及びその製剤の承認申請	適用	適用	M7 ガイドラインの主たる目的
新原薬及びその製剤の治験届	適用	適用	M7 ガイドラインの主たる目的
ICH S9 で示された抗悪性腫瘍薬の新原薬の治験届	適用外	適用外	M7 ガイドラインの適用範囲外
希少疾病用薬の新原薬の治験届	適用	適用	ケースバイケースで、不純物の限度値を高くできる
原薬の製造工程に変更がない既存の原薬を使用した新製剤の治験届	適用外	適用	合成法に変更がない限り、M7 ガイドラインは市販製品に対する回顧的適用を目的とはしていない。原薬の合成法には変更がないため、原薬の再評価は必要ない。製剤は新規であるため、本ガイドラインの適用が求められる。
既承認の原薬を使用した新製剤の承認申請	適用外	適用	4.2 項参照
ある ICH 地域において既承認の製品について、別の ICH 地域で初めて承認申請を行う場合。当該製品には変更なし。	適用	適用	相互認証がないため、ある ICH 地域において既承認の製品は、別の ICH 地域における初めての承認申請では新製品とみなされる。
原薬の新たな供給業者又は新たな製造場所を追加する承認申請の場合。これらの製造工程には変更なし。	適用外	適用外	原薬の合成法が既承認の方法と一致している限り、変異原性不純物のリスク再評価は必要ない。申請者は既承認の工程や製品に変更がないことを証明する必要がある。4.1 項参照。
進行がんを適応症とする既存の製品 (ICH M7 の発出後に承認され、ICH S9 に基づき不純物の限度値がより高く設定されている) を、生命が脅かされていない疾患を適応症として新たに承認申請する場合	適用	適用	患者集団及び許容される発がんリスクが変更されているため、既承認の不純物の管理戦略及び限度値について再評価する必要がある。4.3 項参照。

新原薬及び既存の原薬を含む 新配合剤の承認申請	適用（新 原薬） 適用外 （既存の 原薬）	適用	新原薬に対して M7 ガイドラインを適用する。既存の原薬には、M7 ガイドラインの既存製品への回顧的な適用を意図していない。製剤については、新製剤に分類されるため、新規の分解生成物又はより高いレベルの分解生成物に対して本ガイドラインが適用される。
----------------------------	-----------------------------------	----	---

付録 2：想定される管理方法の事例

事例 1：オプション 3 の管理戦略の例

中間体 X は原薬から 2 つ離れた工程で形成し、中間体 X 中には不純物 A が日常的に検出されている。不純物 A は安定な化合物であり、原薬まで持ち越される。実験室スケールで、不純物 A の中間体 X へのスパイク試験を種々の濃度で実施した。これらの試験の結果は、不純物 A が中間体 X 中に 1% 存在する場合であっても、原薬中の TTC に基づく限度値の 30% 未満まで一貫して除去された。この中間体 X は原薬から 2 つしか離れていない工程で形成し、中間体 X 中の不純物 A のレベルは比較的高いため、この工程の除去能力について更なる確認のため、複数のパイロットスケールバッチの原薬中の不純物 A の量を測定した。その結果は、TTC に基づく限度値の 30% 未満であった。したがって、中間体 X 中の不純物 A の管理として、許容限度値を 1.0% とすることは妥当であり、原薬規格でこの不純物を試験する必要はない。

事例 2：オプション 3 の管理戦略の例：標準的分析法を用いたスパイク試験から予測されるパーセントを根拠とした場合

出発物質 Y は 5 工程からなる合成の第 3 工程で導入され、出発物質 Y 中には 0.1% 未満の不純物 B が通常の分析法によって日常的に検出されている。出発物質中の 0.1% という不純物の規格が許容できるか判断するため、不純物 B を 10% までの様々な濃度で出発物質 Y に添加した実験室スケールでの除去試験を行ったところ、最後の 3 工程を通して 500 倍を超えるパーセントファクターが確認された。このパーセントファクターを用いると、出発物質 Y 中の 0.1% という規格から、原薬中の不純物 B の予測レベルは 2 ppm 未満となった。この結果は、原薬中のこの不純物に対する TTC に基づく限度値である 50 ppm より低いことから、出発物質 Y 中の不純物 B の規格である 0.1% は正当化され、パイロットスケール又は実生産スケールバッチの原薬のデータを提出する必要はない。

事例 3 : オプション 2 及びオプション 4 の管理戦略の例 : 構造的に類似している変異原性不純物の管理

5 工程からなる合成の第 1 工程中間体は芳香族ニトロ化合物であり、少量の不純物 C を含む可能性がある。不純物 C は第 1 工程中間体の位置異性体であり、芳香族ニトロ化合物でもある。第 1 工程中間体中の不純物 C は、通常の分析法では検出されていないが、少量で存在する可能性がある。第 1 工程中間体は、細菌を用いる変異原性試験において陽性である。第 2 工程の水素化反応により、99%の第 1 工程中間体は、相当する芳香族アミンに変換される。これは工程内試験により確認されている。残留する第 1 工程中間体芳香族ニトロ化合物の除去に関して評価したところ、その後続く第 3 工程及び第 4 工程における除去ポイントに基づいた、高いパージファクターが予測された。第 5 工程における除去は期待できず、第 1 工程中間体の TTC に基づく限度値を第 4 工程中間体の規格として設定された (オプション 2 の管理手法)。位置異性体である不純物 C は、第 1 工程中間体と同じ除去ポイントで除去されると予測されるため、常に第 1 工程中間体よりはるかに少なくなる。したがって試験は不要であり、不純物 C にオプション 4 の管理戦略を用いることが支持され、追加の実験室スケール又はパイロットスケールのデータは必要とされない。

事例 4 : オプション 4 の管理戦略の例 : 高反応性不純物

塩化チオニルは反応性の高い化合物であり、変異原性を有する。この試薬は 5 工程からなる合成の第 1 工程で導入される。合成の複数のポイントにおいて、多量の水が使用される。塩化チオニルは瞬時に水と反応するため、原薬に残留することはない。オプション 4 による管理が適しており、実験室スケール又はパイロットスケールのデータは不要である。

ガイドラインの実施：

M7は公開後に実施が推奨される。ただし、ガイドラインが複雑であるため、ICHでの公開18ヵ月後までは、M7の適用は求められない。

18ヵ月という期間とは別に下記の事項が適用される。

1. ICHでの公開後はM7に従ってエームス試験を実施すること。ただし、M7の公開前にエームス試験を実施している場合、やり直しをする必要はない。
2. M7の公開前に、開発プログラムが第IIb相又は第III相の治験を開始していた場合、これらのプログラムの製造販売承認申請や承認までの期間については、次に挙げる事項が適用される。
 - 6項に概要を示した、2つのQSAR評価を実施する必要はない。
 - 5項に概要を示した、製品中の不純物の評価範囲に準拠している必要はない。
 - 9項に概要を示した、ドキュメンテーションの推奨事項に準拠している必要はない。
3. 商業生産工程の開発も同様の課題が伴うことを考慮し、M7がICHで公開されてから36ヵ月後までは、第IIb相又は第III相治験を含まない新規製造販売承認申請へのM7の適用は求められない。

付録3: ICH M7 補遺

ICH M7 ガイドライン原則の化合物特異的な許容摂取量算出への適用

目次

略語一覧	31
緒言	33
方法	33
Acceptable Intakes (AIs) or Permissible Daily Exposures (PDEs)	39
アクリロニトリル (CAS# 107-13-1)	41
アニリン (CAS# 62-53-3) 及びアニリン塩酸塩 (CAS# 142-04-1)	46
塩化ベンジル (α -クロロトルエン、CAS# 100-44-7)	52
ビス (クロロメチル) エーテル (BCME、CAS# 542-88-1)	58
<i>p</i> -クロロアニリン (CAS# 106-47-8) 及び <i>p</i> -クロロアニリン塩酸塩 (CAS# 20265-96-7)	62
1-クロロ-4-ニトロベンゼン (パラ-クロロニトロベンゼン、CAS# 100-00-5)	66
<i>p</i> -クレシジン (2-メトキシ-5-メチルアニリン、CAS# 120-71-8)	71
ジメチルカルバミルクロリド (CAS# 79-44-7)	74
硫酸ジメチル (CAS# 77-78-1)	78
塩化エチル (クロロエタン、CAS# 75-00-3)	82
グリシドール (CAS# 556-52-5)	85
ヒドラジン (CAS# 302-01-2)	88
過酸化水素 (CAS# 7722-84-1)	93
塩化メチル (Chloromethane, CAS# 74-87-3)	98
注 1	101
注 2	103
注 3	105

略語一覽

AI	Acceptable Intakes
ATSDR	Agency for Toxic Substances & Disease Registry
BC	Benzyl Chloride
BCME	Bis(chloromethyl)ether
BUA	Biodegradable in water Under Aerobic conditions
CAC	Cancer Assessment Committee
CCRIS	Chemical Carcinogenesis Research Information System
CHL	Chinese Hamster Lung fibroblast cell line
CICAD	Concise International Chemical Assessment Document
CIIT	Chemical Industry Institute of Toxicology
CNS	Central Nervous System
CPDB	Carcinogenicity Potency Database
CYP	Cytochrome P-450
DMCC	Dimethylcarbamyl Chloride
DMS	Dimethyl Sulfate
DNA	Deoxyribose Nucleic Acid
EC	European Commission
ECHA	European Chemical Agency
EFSA	European Food Safety Authority
EMA	European Medicines Agency
EPA	Environmental Protection Agency
EU	European Union
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized As Safe
HSDB	Hazardous Substance Database
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPCS	International Programme on Chemical Safety
IRIS	Integrated Risk Information System
JETOC	Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & Information Center
JRC	Joint Research Centre
LOAEL	Lowest-Observed Adverse Effect Level
MTD	Maximum Tolerated Dose
NA	Not applicable
NC	Not calculated; individual tumour type incidences not provided in WHO, 2002
NCI	National Cancer Institute
NOAEL	No-Observed Adverse Effect Level
NOEL	No-Observed Effect Level
NSRL	No Significant Risk Level
NTP	National Toxicology Program
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PCE	Polychromatic Erythrocytes
PDE	Permissible Daily Exposure
RfC	Reference Concentration
ROS	Reactive Oxygen Species
SCCP	Scientific Committee on Consumer Products
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
SCE	Sister Chromatid Exchanges
SIDS	Screening Information Dataset

TBA	Tumor Bearing Animal
TD50	Chronic dose-rate in mg/kg body weight/day which would cause tumors in half of the animals at the end of a standard lifespan for the species taking into account the frequency of that tumor type in control animals
TTC-based	Threshold of Toxicological Concern-based
UDS	Unscheduled DNA Synthesis
UNEP	United Nations Environmental Programme
US EPA	United States Environmental Protection Agency
WHO	World Health Organization

緒言

ICH M7 ガイドラインでは、発がん性データが陽性の変異原性不純物に対する適切な許容摂取量 (AI) の算出について論じており (7.2.1 項)、次のように述べている。「十分な発がん性データが存在する場合、許容摂取量の算出を目的とした化合物特異的なリスク評価を、TTC に基づく [毒性学的懸念の閾値に基づく] 許容摂取量の代わりに適用すべきである。既知の変異原性発がん物質については、発がん性の強さを直線外挿する既定の方法により、化合物特異的許容摂取量を算出できる。あるいは、国際的規制機関で使用されているような確立された他のリスク評価手法を適用して許容摂取量を算出したり、規制当局が公表している既存値を使用してもよい。」

この ICH M7 補遺では、医薬品製造でよく使用され、ICH M7 で示された化合物特異的摂取量を求める原則を例示する目的に有用であり、変異原性物質や発がん物質であるとみなされている一連の化学物質について、AI や、許容 1 日曝露量 (PDE) が求められている¹。一連の化学物質には、作用機序が変異原性である可能性が高い発がん物質の AIs を求める際に用いる主な方法が、ICH M7 での「既定の方法」である、計算した発がん性推定値の TD₅₀ からの直線外挿である化合物が含まれる。変異原性物質や発がん物質である幾つかの化学物質 (ICH M7 でクラス 1 に分類) は、非変異原性の作用機序を介して腫瘍を誘発するかもしれない。したがって、追加化合物には化合物特異的摂取量を求めるために代替原則 (例、PDE、以下参照) を強調するものが含まれる。その他の化合物 (例えば、アニリン) には、これまでの認識では変異原性発がん物質とされているものの、利用可能なデータから非変異原性物質であることが示されているものを含めている。

ICH M7 では 7.2.2 項で次のように述べている。「DNA 以外の標的と相互作用する化合物だけでなく、DNA 反応性化合物でも、用量反応関係が非線形であるか実質的な閾値を持つような機序が存在することが、次第に認識されてきている。それらの作用は、例えば DNA との接触前の迅速な解毒作用や、誘導された DNA 損傷の効果的な修復などにより、調節されている可能性がある。これらの化合物への規制上の対応としては、データが入手可能な場合、無作用量 (NOEL : no-observed effect level) の同定と不確実係数 (ICH Q3C (R5) 参照) に基づき、許容 1 日曝露量 (PDE : permissible daily exposure) を算出することができる。」

この補遺では、ICH Q3C(R5) (1) で示された不確実係数を用いて計算された PDE 算出を正当化する一部のクラス 1 化学物質に対して、作用機序の評価を説明するための実例が含まれる。このような化学物質には、酸化ストレスを誘発する過酸化水素や、メトヘモグロビン血症の結果生じたヘモジデリン沈着により二次的に腫瘍を誘発するアニリンが含まれる。

この補遺で示した AI 値や PDE 値は発がんリスクに関連していることを強調しておく。品質基準のようなその他の考慮すべき事項が、最終的な製品の規格に影響する可能性がある。例えば ICH M7 ガイダンス (section 7.2.2) では、化合物特異的なリスク評価から許容摂取量が計算された場合、上限値は 0.5%、具体的には、一日当たりの最大用量が 100 mg の薬剤では 500 µg になることに言及している。

方法

AI を算出するために、この補遺の中で用いた一般的工程には、文献レビュー、発がん性推定値の選択 [TD₅₀、発がん性データベース (CPDB (2) から引用したもの、又は CPDB と同一の方法を用いた公表試験から計算したもの]、そして最後に、適切な AI、あるいは閾値作用機序のための十分な証拠がある場合は、適切な PDE の計算 (3 項参照) が含まれる。文献レビューでは、一般集団への曝露 (すなわち、食品、水、空気)、変異原性や遺伝毒性、発がん性に関連したデータに注目する。ICH M7 での DNA 反応性変異原性物質の説明に基づき、細菌を用いる復帰突然

¹ このような化学物質には、その特性 (化学反応性、溶解性、揮発性、イオン化性) により、多くの合成工程時で効率的に除去され、それゆえ許容摂取量に基づいた規格が通常は必要無いものが含まれている。

変異試験 (Ames test) での結果が、化学物質が変異原性物質であると決定する主な基準として用いられた。その他の遺伝毒性試験データ、特に in vivo のデータは、腫瘍誘発が起こり得る作用機序を評価する際に考慮された。化合物特異的な評価では、許容される曝露レベルとして国の規制値や国際的な規制値 (例えば、US EPA、US FDA、EMA、ECHA、WHO) が記載されている。発がん性の前駆事象 (例えば刺激性や炎症、又はメトヘモグロビン血症など) として作用する変化が観察された場合は評価したが、急性毒性試験、反復毒性試験、生殖毒性試験、神経毒性試験、発生毒性試験での毒性情報については詳しく評価しなかった。

1. 標準方法

1.1 直線作用機序と AI の算出

ICH M7 の注 4 では次のように述べている。「TD₅₀ 値 (腫瘍発生率が 50% となる用量であり、発がんリスクの確率が 1/2 であることと同等) などのげっ歯類の発がん性データから、化合物特異的許容摂取量を算出することができる。10 万分の 1 (すなわち、生涯許容リスクレベル) の確率への直線外挿は、単純に TD₅₀ を 50,000 で除すことで実施できる。これは TTC の算出に用いられる手順と類似している。」

したがって、TD₅₀ 値からの直線外挿は、「閾値機序」が確立していない、すなわち非線形の用量-反応曲線を生じる作用機序について理解されていないクラス I 不純物 (既知の変異原性発がん物質) に対する AI を算出するのに適切と考えられた。多くの場合、発がん性データは CPDB から入手され、その結論はがん原性試験に関する報告書の原著者の意見 (CPDB での「著者の意見」)、又は CPDB で提供される統計解析の結論に基づいた。選択した化学物質について、すでに計算されている TD₅₀ 値が CPDB で特定されていた場合、この値を用いて AI を計算し、関連する発がん性データは再解析せず、TD₅₀ 値も再計算しなかった。

頑健なデータが CPDB では入手できず文献で入手できた場合、CPDB に示されている方法に基づき TD₅₀ を計算した (3)。用量計算のための動物の体重、呼吸量、摂水量の仮定値は、ICH Q3C 及び ICH Q3D (1、4) から採用した。

1.2 試験の選択

CPDB 内の試験の品質は様々であるが、CPDB では採用基準、例えば、試験動物が曝露された期間が一生涯に占める割合のような基準を課している。本補遺では、試験が比較的低い品質であった場合、追加の基準を適用した。ここでは、以下のシナリオの 1 つ以上に該当した試験を、品質の比較的低い試験と定める。

- 各性別における用量当たりの動物数が 50 匹未満
- 用量段階が 3 段階未満
- 同時対照の不在
- 間歇投与 (1 週間につき 5 日未満)
- 投与期間が一生涯より短い

概して、より頑健な試験を用いて限度値を求めた。ただし、試験のその他の面が頑健だった場合、例えば投与が 1 週間につき 3 日だが (例えば塩化ベンジル) それを上回る用量に耐えられないだろうと考えられる証拠がある場合、すなわち National Toxicology Programme (NTP) 又は ICH S1C(R2) (5) で定義された最大耐量に達した場合などでは、これらの基準をすべて満たさなくても、一部の例では AI の算出に十分適すると判断した。発がん性推定値の計算では間歇投与や、塩化ベンジルのような一生涯より短い投与を考慮に入れ、例えば、1 週間に 3 回投与した 1 日投与量に 3/7 を掛けて平均 1 日投与量を出すよう、CPDB で示された用量段階は、推定 1 日投与量を反映するよう補正された。動物の投与期間が 24 カ月未満の場合は、同様の補正が行われた。TD₅₀ が 10 万分の 1 の過剰発がんリスクに直線外挿されるリスク評価は、極めて慎重であること

を考慮すると、それ以上に完全なデータが存在しない場合は、頑健性の低いデータの使用が許容可能とされうる。そのような場合は、化合物特異的な評価において、推奨される方法の基礎を支持する合理的な根拠が与えられる。

1.3 腫瘍及び部位の選択

ある動物種における性別毎の特定臓器部位の最小 TD₅₀ が、最も頑健な試験から選択された。試験が複数存在する場合、CPDB では TD₅₀ の調和平均値を計算しているが、本補遺では最小 TD₅₀ をより慎重な推定値とみなした。「腫瘍を擁する動物」(TBA)として編集されたデータは、CPDB から TD₅₀ を選択する際に適切とせず、より感度の高い発がん性推定値として適切な場合は、1つの組織(例えば肝臓など)に腫瘍型が混在している(例えば腺腫及び癌腫など)データを用いた。

1.4 投与経路

ICH M7 の 7.5 項では次のように述べている。「7項で述べた上記のリスク対応はすべての投与経路に適用可能であり、許容摂取量の見直しは一般に必要とされない。考慮すべき例外には、特定の投与経路での懸念がデータによって示されている場合が含まれ、それらの懸念についてはケースバイケースで評価する必要がある。」

本補遺では、異なる投与経路でのがん原性試験から頑健なデータを入手でき、腫瘍部位が経路特異的ではないと考えられた場合、最も低い TD₅₀ 値を示した投与経路での TD₅₀ が AI の算出には選択されるため、通常はすべての投与経路について適切であると考えられる。ケースバイケースで例外が必要となる可能性があり、例えば、接触部位で強力な発がん物質の場合、特定の投与経路の AI 又は PDE が必要かもしれない。刺激などのその他の毒性も特定の経路に対する AI を制限する可能性があるが、M7 と同様に本補遺では腫瘍原性のみを考慮した。ここでは、腫瘍が部位特異的であり(例えば、吸入曝露の結果として気道腫瘍が発生したが遠位部に腫瘍を伴わない場合)、TD₅₀ が他の投与経路より低い場合は、その投与経路について個別の AI を定めた(例えば、ジメチルカルバモイルクロリド、ヒドラジン)。

1.5 TD₅₀ による AI の算出

TD₅₀ からの AI の算出は次の通りである(例として ICH M7 の注 4 参照)。

$$AI = TD_{50} / 50,000 \times 50 \text{ kg}$$

体重補正では、任意のヒト成人の体重を男女とも 50 kg と仮定する。このように比較的少ない体重とすれば、このような種類の計算でよく用いられる標準的体重である 60 kg や 70 kg に対し、安全係数が追加されることになる。成人患者の一部は体重が 50 kg 未満であることが認識されているが、このような患者は、AI の決定に用いられる本質的慎重さ(すなわち、最も感受性が高い臓器部位の直線外挿)により配慮されていると考えられる。

2. AI 算出に関する代替方法の検討

2.1 腫瘍のヒトとの関連性

ICH M7 の注 4 では次のように述べている。「ヒトとの関連性とは関係なくげっ歯類のがん原性試験から最も慎重な TD₅₀ 値を用いる方法を選択する代わりに、入手可能な発がん性データを毒性専門家によって詳細に評価してもよい。これは、直線外挿の基準点を求めるための基礎として、ヒトのリスク評価との関連性が最も高い所見(動物種、臓器など)を最初に特定するために行われる。」

AI 算出に対し、入手可能な発がん性データのヒトとの関連性が検討された。非線形の用量反応で生じる毒性に伴うげっ歯類での作用は、医薬品不純物で想定される毒性のない低濃度において、ヒトと関連していない。例えば、*p*-クロロアニリンの場合、最も感受性の高い腫瘍誘発部位は脾臓であるが、これらの腫瘍はヘモジデリン沈着を伴っており、非線形の用量反応性のある作用機序であると考えられるため、ヘモジデリン沈着を誘発しない低用量ではヒトと関連していないと考えられた。*p*-クロロアニリンの場合、肝臓腫瘍に対しては変異原性作用機序が排除できなかったため、より高い TD₅₀ をもつ肝臓腫瘍を直線外挿して AI が計算された。ヒトと関連していないと考えられる腫瘍の 2 つ目の分類は、代謝の種差を伴う塩化メチルのような、げっ歯類に特異的な作用機序の関与する腫瘍である。

2.2 公表された規制上の限度値

ICH M7 の注 4 では次のようにも述べている。「化合物特異的許容摂取量も、適切な生涯リスクレベルである 10⁻⁵ を用い、世界保健機関 (WHO、International Programme on Chemical Safety [IPCS] Cancer Risk Assessment Programme) などの国際的に認知された機関が公表した推奨値から求めることができる。一般に、規制上の限度値として適用される値は最新の科学的に裏付けされたデータ又は方法に基づいている必要がある。」

本補遺では、入手可能な規制上の限度値について説明している (職業衛生上の限度値については、通常は地域特有なものであり異なるリスクレベルを用いることから省略している)。ただし、ICH M7 の既定方法として、また化合物間の一貫性を保持するため、通常は AI を算出する主な方法として慎重な TD₅₀ からの直線外挿を用いた。発がんリスク評価方法のわずかな違いにより推奨限度値に差が生じる場合があると認識されているが (例えば計算時の体表面積の補正)、直線外挿を計算の基本としている場合、その差は通常は極めて小さい。

3. 非線形 (閾値) 作用機序及び PDE の算出

ICH M7 では 7.2.2 項で次のように述べている。「DNA 以外の標的と相互作用する化合物だけでなく、DNA 反応性化合物でも、用量反応関係が非線形であるか実質的な閾値を持つような機序が存在することが、次第に認識されてきている。それらの作用は、例えば DNA との接触前の迅速な解毒作用や、誘導された DNA 損傷の効率的な修復などにより、調節されている可能性がある。これらの化合物への規制上の対応としては、データが入手可能な場合、無作用量 (NOEL: no-observed effect level) の同定と不確実係数 (ICH Q3C (R5) 参照) に基づき、許容 1 日曝露量 (PDE: permissible daily dose) を算出することができる。」

in vitro 及び *in vivo* での変異原性に対して閾値が提案されている DNA 反応性化学物質の例として、エチルメタンサルホン酸がある (6、7)。閾値が確立されているような場合は直線外挿ではなく、不確実係数を用いた PDE 計算の方が適切である。

この「閾値」方法は、腫瘍誘発に対する非線形の用量反応に基づいて、低用量ではヒトとの関連性がない作用機序をもつ発がん物質 (2.1 項) に対して実施する化合物特異的な評価で、適切と考えられた。

メトヘモグロビン血症や、脾臓のような組織にヘモジデリン沈着を誘発し、続いて炎症や腫瘍を誘発する化学物質 (例えば、アニリンや類似化合物など)。

これを裏付ける証拠には、変異原性を示す証拠が弱いなど、変異原性が作用機序の鍵であったことを示す確実な証拠がないこと (例えばアニリン) や、*in vivo* 遺伝毒性 (DNA 付加体など) と腫瘍誘発がみられた部位や動物種に相関がないことなどがある。

局所の刺激や炎症に関連して腫瘍 (げっ歯類の前胃腫瘍など) を誘発し、接触部位で発がん性を有する化学物質は、医薬品の潜在的な不純物としては刺激を生じさせない低濃度では、ヒトへの曝露とは関連性がないと考えられる (例えば、塩化ベンジル)。

酸化的損傷を介して作用するが、内在性防御機構が豊富に存在するため、低用量では有害な影響の生じない化学物質 (例えば過酸化水素など)。

閾値作用機序のある発がん物質の許容曝露量は PDE の計算により確立した。PDE の方法については ICH Q3C(R5) (1) 及び ICH Q3D (4) で詳しく説明している。

4. 環境 (例えば食事) 中の曝露に基づく許容限度値

ICH M7 の 7.5 項に記載しているように、「食品や内因性代謝 (例えば、ホルムアルデヒドなど) に由来する不純物への曝露量が極めて大きい場合、より高い許容摂取量の設定を正当化できる場合がある。」例えば、ホルムアルデヒドは経口投与では発がん物質ではないため、規制上の限度値は非がんのエンドポイントに基づいている。Health Canada (8)、WHO IPCS (9) 及び米国環境保護庁 (EPA) (10) は体重 50 kg のヒトに対して、0.2 mg/kg/day あるいは 10 mg/day を経口投与の限度値として推奨している。

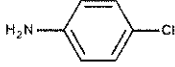
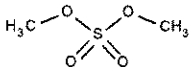
References

1. International Conference on Harmonisation (2011). Q3C(R5): Impurities: Guideline for Residual Solvents
2. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
3. Carcinogenicity Potency Database (CPDB): [Online]. Available from: URL: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/td50.html>
4. International Conference on Harmonisation (2014). Q3D: Impurities: Guideline for Elemental Impurities
5. International Conference on Harmonisation (2008). S1C(R2): Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals
6. Müller L, Gocke E, Lave T, Pfister T. Ethyl methanesulfonate toxicity in Viracept-A comprehensive human risk assessment based on threshold data for genotoxicity. *Toxicol Lett* 2009; 190:317-29.
7. Cao X, Mittelstaedt RA, Pearce MG, Allen BC, Soeteman-Hernández LG, Johnson GE, et al. Quantitative dose-response analysis of ethyl methanesulfonate genotoxicity in adult gpt-delta transgenic mice. *Environ Mol Mutagen* 2014; 55:385-99.
8. Health Canada. 2001 Priority substances list assessment report: Formaldehyde. Ottawa. Ministry of Public Works and Government Services. February. [Online]. Available from: URL: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl2-lsp2/index_e.html
9. World Health Organization (WHO). International Programme on Chemical Safety (IPCS). 2002. Concise International Chemical Assessment Document 40. Formaldehyde. [Online]. Available from: URL: <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad40.pdf>
10. US Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1990; Available from: URL: <http://www.epa.gov/iris/>

Acceptable Intakes (AIs) or Permissible Daily Exposures (PDEs)

Compound	CAS#	Chemical Structure	AI or PDE (µg/day)	Comment
Linear extrapolation from TD₅₀				
Acrylonitrile	107-13-1		6	TD ₅₀ linear extrapolation
Benzyl Chloride	100-44-7		41	TD ₅₀ linear extrapolation
Bis(chloromethyl)ether	542-88-1		0.004	TD ₅₀ linear extrapolation
1-Chloro-4-nitrobenzene	100-00-5		117	TD ₅₀ linear extrapolation
<i>p</i> -Cresidine	120-71-8		45	TD ₅₀ linear extrapolation
Dimethylcarbamoyl chloride	79-44-7		5 0.6 (inhalation)*	TD ₅₀ linear extrapolation
Ethyl chloride	75-00-3		1,810	TD ₅₀ linear extrapolation
Glycidol	556-52-5		4	TD ₅₀ linear extrapolation
Hydrazine	302-01-2		39 0.2 (Inhalation)*	TD ₅₀ linear extrapolation
Methyl chloride	74-87-3	Cl-CH ₃	1,361	TD ₅₀ linear extrapolation
Threshold-based PDE				
Aniline Aniline HCl	62-53-3 142-04-1		720	PDE based on threshold mode of action (Hemosiderosis)
Endogenous and/or Environmental Exposure				
Hydrogen peroxide	7722-84-1	HO—OH	68,000 or 0.5% whichever is lower	68 mg/day is 1% of estimated endogenous production

「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性 (変異原性)
不純物の評価及び管理」ガイドライン

Compound	CAS#	Chemical Structure	AI or PDE (µg/day)	Comment
Other Cases				
<i>p</i> -Chloroaniline <i>p</i> -Chloroaniline HCl	106-47-8 20265-96-7		34	AI based on liver tumors for which mutagenic mode of action cannot be ruled out
Dimethyl Sulfate	77-78-1		1.5	Carcinogenicity data available, but inadequate to derive AI. Default to TTC

*Route specific limit

アクリロニトリル (CAS# 107-13-1)

ヒトへの曝露の可能性

一般集団の曝露に関する入手可能なデータはない。

変異原性/遺伝毒性

アクリロニトリルは *in vitro* で変異原性及び遺伝毒性があり、*in vivo* では潜在的に陽性である。

世界保健機関 (WHO) の Concise International Chemical Assessment Document (CICAD、1) は、アクリロニトリルの詳細なリスク評価を提供している。この評価文書において、酸化代謝はアクリロニトリルが遺伝毒性作用を示すための重要なステップであり、DNA 反応性代謝物としてシアノエチレンオキシドが関係していると示している。様々な系を用いた遺伝毒性試験の詳細な評価が引用文献とともに示されており (1)、ここでは主要な結論のみを纏める。

アクリロニトリルは以下において変異原性を示す：

細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames) として、*Salmonella typhimurium* TA 1535 及び TA 100 を用いたラット又はハムスター S9 存在下のみの試験、及び複数の *E. coli* 株を用いた代謝活性化系非存在下の試験

S9 存在下で再現性があり、また S9 非存在下では幾つかのケースでのヒトリンパ芽球及びマウスリンフォーマ細胞

飲水により曝露されたラットの脾臓 T 細胞

In vivo 遺伝毒性試験では陰性又は結論づけられず、肝臓における DNA 結合性に関する報告は一貫して陽性であるが、脳では矛盾した結果が得られている。

発がん性

IARC により、アクリロニトリルはグループ 2B の発がん物質、おそらくヒトに対する発がん性があると分類されている (2)。

アクリロニトリルはマウス及びラットにおいて多臓器発がん物質であり、ラットでは脳が主な標的臓器である。CPDB (3) に引用された経口がん原性試験は 4 試験あり、この他に経口試験 3 試験の結果が文献 1 で要約されている。これら 7 試験のうち 1 試験のみが陰性だったが、この試験は 1 用量のみの短期間の検討であった (4)。

試験デザインが頑健であり、最も慎重な TD₅₀ 値であったことに基づき、経口 AI の算出には CPDB に引用されたマウスのアクリロニトリルの NCI/NTP 試験 (5) を選択した。この 2 年間の試験では、雌雄ラットに 3 用量のアクリロニトリルを強制経口投与した。ハーダー腺及び前胃に統計学的に有意な腫瘍の増加がみられた。

Dow Chemical の報告として CPDB に引用された Quast ら (6) の 1980 年の試験において、最も感受性の高い TD₅₀ は、雌ラットの星状細胞腫 (5.31 mg/kg/day) である。しかしながら、この試験はその後詳細が説明され (7)、公表文献で算出された用量は CPDB に記載された用量より高かった。Quast (7) は、35、100 及び 300 ppm の飲水中濃度から、体重及び試験中に認められた飲水量の低下で補正して mg/kg/day の用量を算出している。これらの数値から導かれる星状細胞腫に対する TD₅₀ は雄 20.2 mg/kg/day、雌 20.8 mg/kg/day であり、一方、CPDB で算出された値は 6.36 及び 5.31 mg/kg/day であった。(表に示す通り、前胃腫瘍に対して Quast (7) が概算した用量から算出した TD₅₀ 値は、同じ試験において CPDB で算出された値より高かった。) 中枢神経系 (CNS) の腫瘍が記載されているが (7)、下表に示すように最も感受性の高い TD₅₀ は前胃腫瘍であった。

3 種類のラット飲水試験の頑健性は低いと考えられた。最大の試験 (8) では 5 つのアクリロニトリル投与群の動物が各群 100 匹、対照動物が 200 匹であったが、6、12、18、24 カ月後に 1 群 20 匹

を連続して屠殺した。WHO (1) 及び US EPA (9) によるデータ概要では、全時点を合わせたデータに基づく腫瘍発生率を示している。したがって、報告された腫瘍発生率は、全動物を 2 年間飼育した場合に観察されるであろう総腫瘍数を過小評価しているかもしれない。2 試験 (10, 11) では、胃、ジンバル腺及び脳に腫瘍が認められたが、2 用量のみであり、個別の腫瘍の種類は報告されていない (1)。

アクリロニトリルは吸入経路でも試験されている。1 用量につき雌雄各 50 匹を 2 年間アクリロニトリルに曝露したところ、脳腫瘍が観察された (12)。ただし、この試験では 2 用量しか投与をしていない。他の吸入試験でも脳腫瘍が観察されたが、1 群当たりの動物数や曝露期間に不足があるか、1 用量であった。

Acrylonitrile – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref.5*	50 B6C3F1 Mice (F)	2 years Gavage	50	3: 1.79;7.14;14.3 mg/kg/d	Forestomach	6.77 ⁺
	50 B6C3F1 Mice (M)	2 years Gavage	50	3: 1.79;7.14;14.3 mg/kg/d	Forestomach	5.92 ⁺
Ref. 6	~50 SD Spartan rats (F)	2 years Drinking water	~80	3: 2.00;5.69;15.4 mg/kg/d	Astrocytoma	5.31 ⁺⁺ (20.8)
	~50 SD Spartan rats (M)	2 years Drinking water	~80	3: 1.75;4.98;14.9 mg/kg/d	Stomach, non- glandular	6.36 ⁺⁺ (9.0)
Ref 7 (Report of Ref. 6)	~50 SD female Spartan rats	2 years Drinking water	~80	3: 4.4;10.8; 25 mg/kg/d	Stomach, non- glandular	19.4
	~50 SD male Spartan rats	2 years Drinking water	~80	3: 3.4;8.5;21.3 mg/kg/d	Stomach, non- glandular	9.0
Ref. 8 ^y	100 male rats	~2 years Drinking water	~200	5: 0.1-8.4 mg/kg/d	Brain astrocytoma	(22.9) ⁺
	100 female rats	~2 years Drinking water	~200	5: 0.1-10.9 mg/kg/d	Brain astrocytoma	(23.5) ⁺
Ref. 11 ^y	100/sex Rats	19-22 mo Drinking water	~98	2: ~0.09; 7.98 mg/kg/d	Stomach, Zymbal's gland, brain, spinal cord	NC
Ref. 10*	50/sex Rats	18 mo Drinking water	No	2: 14;70 mg/kg/d	Brain, Zymbal's gland, forestomach	NC [^]
Ref. 13	20 male CD rats	2 years Drinking water	No	3: 1; 5; 25 mg/kg/d	Zymbal's gland	30.1

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 4	40/sex SD rats	1 year 3d/wk Gavage	75/sex	1: 1.07 mg/kg/d	Neg in both sexes	NA
Ref. 12	100/sex SD Spartan rat	2 years 6 h/d; 5d/wk Inhalation	~100	2: M: 2.27; 9.1 F: 3.24; 13.0 mg/kg/d	Brain Astrocytoma Male	32.4
Ref. 4	30/sex SD rats	1 year 5d/wk Inhalation	30	4: M: 0.19; 0.38; 0.76; 1.52 F: 0.27; 0.54; 1.0; 2.17 mg/kg/d	Brain glioma Male	19.1
Ref. 4	54 female SD rats	2 years 5d/wk inhalation	60	1: 11.1 mg/kg/d	Brain glioma	(132) ^ψ

Studies listed are in CPDB (Ref. 3) unless otherwise noted.

The TD₅₀ values represent the TD₅₀ from the most sensitive tumor site.

TD₅₀ values in parentheses are considered less reliable as explained in footnotes.

*Carcinogenicity study selected for AI calculation; in CPDB

^NC= Not calculated as individual tumor type incidences not provided in WHO (Ref. 1).

+TD₅₀ calculated based on astrocytoma incidence implied as most significant site by WHO (Ref. 1). Serial sampling reduced number of animals exposed for 2 years, so tumor incidences may be underestimates.

*Taken from the CPDB. Note that based on the dose calculations by the author (Ref. 7) the TD₅₀ for astrocytomas and stomach tumors in Spartan rats (20.8 and 9.0) are higher than those in the CPDB.

NA= Not applicable.

†Not in CPDB. Summarized in Refs. 1 and 9.

ψ Single dose-level study.

発がん性の作用機序

発がん性の作用機序は結論できていないが、DNA 相互作用の関与は否定できない (1)。前胃腫瘍に加え、CNS 腫瘍がラットの複数のがん原性試験でみられ、前胃腫瘍はマウスでも最も感受性の高い腫瘍だった。

前胃腫瘍は局所の刺激及び炎症を伴っており、Quast (7) はラットでみられたこれらの腫瘍と、他の炎症及び変性変化を伴う過形成及び/又は異常角化症との典型的な関連性を指摘している。高濃度で経口投与されたげっ歯類における前胃腫瘍 (接触部位への作用) は、刺激性のない低濃度ではヒトへの曝露とは関連しない可能性がある (14)。アクリロニトリルは、単なる接触部位発がん物質ではない。胃腸管及び舌のように直接曝露される組織に加え、腫瘍は CNS にみられた。前胃腫瘍はラットにアクリロニトリルを飲水投与及びマウスに強制経口投与した後に認められた。したがって、マウス前胃腫瘍に基づいてアクリロニトリルの AI を算出した。

規制上の限度値や公表された限度値

US EPA (9) は、ラットの飲水試験における多臓器腫瘍の発生率に基づき、10 万分の 1 のリスクレベルにおける経口スロープファクターを 0.54 /mg/kg/day 及び飲水限度値を 0.6 µg/L と算出した。この飲水限度値は 50 kg のヒトの 1 日量である約 1 µg/day に等しい。

許容摂取量 (AI)

AI を算出するための試験選択の根拠

吸入試験も経口試験 (強制経口投与及び飲水) も利用できる。いずれの経路でも CNS の腫瘍がみられ、アクリロニトリルは全ての経路で曝露後速やかに吸収されて評価対象の組織に分布するため (1)、固有の吸入 AI は不要と考えられた。AI を算出するため最も頑健ながん原性試験を選択する際は、US EPA (9) がアクリロニトリルの飲水限度値の算出に用いた全てのがん原性試験を考慮した。アクリロニトリルを雌雄マウスに強制経口投与して算出した TD₅₀ に基づき、AI の算出に NCI/NTP 試験 (5) を選択した。最小 TD₅₀ を示す腫瘍は雄マウスの前胃腫瘍であり、TD₅₀ 値は 5.92 mg/kg/day だった。方法の 2.2 項で考察したように、ここでは AI の算出に TD₅₀ からの直線外挿を使用し、また、わずかな計算方法の違いにより計算値が異なることが予想される。したがって、潜在的な医薬品不純物について以下に算出した AI は、US EPA (9) による飲水から算出したものよりわずかに高い。

AI の算出

生涯 AI = TD₅₀/50,000 × 50 kg

生涯 AI = 5.92 (mg/kg/day)/50,000 × 50 kg

生涯 AI = 5.9 µg/day (6 µg/day)

References

1. World Health Organization (WHO). Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) 39. Acrylonitrile. [Online]. Geneva. 2002; Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad39.htm>
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. Acrylonitrile 1999; Vol. 71, 43.
3. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
4. Maltoni C, Ciliberti A, Cotti G, Perino G. Long-term carcinogenicity bioassays on acrylonitrile administered by inhalation and by ingestion to Sprague-Dawley rats. Annals of the New York Academy of Sciences 1988;534:179-202.
5. National Toxicology Program (NTP) Toxicology and Carcinogenesis Studies of Acrylonitrile (CAS No. 107-13-1) in B6C3F1 Mice (Gavage Studies). NTP TR 506 NIH Publication No. 02-4440. 2001;198.
6. Quast JF, Wade CE, Humiston CG, Carreon RM, Hermann EA, Park CN et al, Editors. A Two-Year Toxicity and Oncogenicity Study with Acrylonitrile Incorporated in the Drinking Water of Rats, Final Report. Dow Chemical USA, Midland, MI; 1980.
7. Quast, JF Two-year toxicity and oncogenicity study with acrylonitrile incorporated in the drinking water of rats. Toxicol Lett 2002;132:153-96.
8. Bio/Dynamics Inc. Monsanto Company. 1980. A twenty-four month oral toxicity/carcinogenicity study of acrylonitrile administered in the drinking water to Fischer 344 rats. Final report. Four volumes. St. Louis, MO. Project No. 77-1744; BDN-77-27.
9. US EPA. Acrylonitrile (CAS# 107-13-1). Integrated Risk Information System (IRIS) [Online].1987. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=206

10. Bigner DD, Bigner SH, Burger PC, Shelburne JD, Friedman HS. Primary brain tumors in Fischer 344 rats chronically exposed to acrylonitrile in their drinking water. *Food and Chemical Toxicology* 1986; 24:129-37.
11. Bio/Dynamics Inc. Monsanto Company, Division of Biology and Safety evaluation. 1980. A twenty-four month oral toxicity/carcinogenicity study of acrylonitrile administered to Spartan rats in the drinking water. Final report. Two volumes. St. Louis, MO. Project No. 77-1745; BDN-77-28.
12. Quast JF, Schuetz DJ, Balmer MF, Gushow TS, Park CN, McKenna MJ, editors. A Two-Year Toxicity and Oncogenicity Study with Acrylonitrile Following Inhalation Exposure of Rats; Final Report. Dow Chemical USA, Midland, MI; 1980.
13. Gallagher GT, Maull EA, Kovacs K, Szab S. Neoplasms in rats ingesting acrylonitrile for two years. *J Am Col Toxicol* 1988 7(5):603-15.
14. Proctor DM, Gatto NM, Hong SJ, Allamneni KP. Mode-of-action framework for evaluation of the relevance of rodent forestomach tumors in cancer risk assessment. *Toxicol. Sci* 2007; 98:313-26.

アニリン (CAS# 62-53-3) 及びアニリン塩酸塩 (CAS# 142-04-1)

ヒトへの曝露の可能性

アニリンは、一部の食品 (すなわち、トウモロコシ、穀類、豆、茶) で自然に存在するが、曝露のより大きな発生源は工業環境にある。

変異原性/遺伝毒性

アニリンは、*Salmonella* を用いた復帰突然変異試験 (Ames) で変異原性を示さない。アニリンは、幾つかの *in vitro* と *in vivo* 遺伝毒性試験が陽性であり、遺伝毒性発がん物質であるというこれまでの認識により本補遺に含まれる。

アニリンは、S9 存在下又は非存在下の *Salmonella* 菌又は *E.Coli* WP2 *uvrA* の標準的な 5 菌株において、変異原性を示さない (1、2、3、4、5、6、7、8)。

アニリンは、S9 存在下及び非存在下の L5178Y 細胞を用いるマウスリンフォーマ tk 試験で、0.5 ~ 21 mM のような極めて高濃度で陽性を示した (9、10、11)。

染色体異常試験では、S9 存在下あるいは非存在下でのハムスター細胞株で、例えば約 5~30 mM の非常に高濃度で、細胞毒性がみられる濃度において、幾つかの陰性の報告や陽性結果が得られている (1、12、13、14、15)。

In vivo では、380 mg/kg を 2 日間腹腔内 (i.p.) 投与した後の雄 CBA マウスの骨髄で、染色体異常は増加しなかった (16) が、500 mg/kg を雄 PVR ラットへ経口投与した 18 時間後に染色体異常がわずかに増加したことが報告された (17)。

経口あるいは腹腔内投与したマウス骨髄 (18、19、20、21) やラット骨髄 (17、22) において、多くの試験の小核誘発性は陽性であったが、ほとんどの陽性は共通して、約 300 mg/kg を上回る高用量においてみられた。500、1000 及び 2000 ppm の 90 日間摂餌投与により、雌雄の B6C3F1 マウスの末梢血において小核の増加を生じさせた (23)。

In vivo では、61~420 mg/kg のアニリンを単回 i.p.投与した 24 時間後に、雄 Swiss マウスの骨髄で、背景を超える最大 2 倍に達する姉妹染色分体交換 (SCE) の弱い増加がみられた (24、25)。この研究において、アルカリ溶出試験でマウス骨髄に DNA 鎖切断は検出されなかった。

発がん性

IARC により、アニリンはグループ 3、ヒトに対する発がん性について分類することができないとされている (4)。

染料産業の労働者の膀胱癌は当初、アニリン曝露に関連すると考えられたが、その後β-ナフチルアミン、ベンジジン及びその他のアミン類のような、アニリン染料生産中の他の中間物質への曝露が原因とされた。

化学工業毒性学研究所 (CIIT、26) は、CD-F ラット (雌雄各 130 匹/群) にアニリン塩酸塩を 0、200、600、2000 ppm で 2 年間摂餌投与する試験を行なった。高用量群の雄ラットでのみ、原発性脾臓肉腫の発生率上昇を認めた。3 段階の用量群があり、用量当たりの動物数が大きい (各性別 130 匹) という頑健な試験デザインに基づき、この試験をアニリンの PDE 算出に選択した。

CIIT の試験結果は、米国国立がん研究所によるアニリン塩酸塩の摂餌試験 (27) のそれと一致しており、この試験では雄ラットには脾臓を含む多くの臓器での血管肉腫が増加し、悪性褐色細胞

腫の発生率には有意な用量関連傾向があった。マウスでは (27) 極めて高用量においても、いずれの腫瘍も統計学的に有意な増加はみられなかった。

頑健性の低い試験デザインで試験をした場合、アニリンそのものは、ラットに腫瘍を誘発しなかった (28)。

Aniline and Aniline HCl – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 26* Aniline HCl	130/sex/ group, CD-F rats	2 years Diet	130	3: 200, 600 and 2000 ppm in diet (M;7.2; 22; 72 mg/kg/d)	Spleen sarcoma (high dose). NOEL at low dose	Not reported
Ref. 27** Aniline HCl	50/sex/group, F344 rats	103 weeks (107-110 wk study) Diet	50	2: 3000 and 6000 ppm in diet (F: 144;268 M: 115;229 mg/kg/d)	Spleen hemangio- sarcoma/ Male	160 (Male)
Ref. 27** Aniline HCl	50/sex/group B6C3F1 mice	103 weeks (107-110 wk study) Diet	50	2: 6000 and 12000 ppm in diet (F: 741;1500 M: 693;1390 mg/kg/d)	Negative	NA
Ref. 28** Aniline	10-18/group, male Wistar rats	80 weeks Diet	Yes	3: 0.03, 0.06 and 0.12% in diet (15;30;60 mg/kg/d)	Negative	NA

*Carcinogenicity study selected for PDE calculation. Not in CPDB.

** Taken from CPDB (Ref. 29). The TD₅₀ values represent the TD₅₀ from the most sensitive tumor site.

NA = Not applicable

発がん性の作用機序

動物実験では、アニリンは高用量でメトヘモグロビン血症と溶血を引き起こし、溶血は造血誘発による小核の増加へ間接的につながる可能性があった (19, 30, 31)。小核はラットとマウスの両方で誘発される一方、アニリン誘発性の腫瘍がラットでみられたがマウスでみられなかったことも、遺伝毒性がアニリン誘発性腫瘍の主な作用機序ではないことの証拠とされている。

脾臓でのアニリン誘発毒性は発がん性の一因であり、フリーラジカルの形成や組織損傷を介していると考えられる (32)。高用量 (10 mg/kg 超) のアニリンにより脾臓で鉄が蓄積するが、これはアニリンが赤血球へ優先的に結合し、損傷した細胞が脾臓に蓄積する結果である。脾臓における鉄を介した酸化ストレスは、脂質過酸化、マロンジアルデヒド-タンパク質付加体、タンパク

質酸化、形質転換増殖因子-β1 の上方制御を誘発するらしく、いずれもアニリン曝露後のラット脾臓で検出されている (33)。酸化ストレスの増加は、アニリンへの長期曝露中における持続的事象であると考えられ、ラットで観察された細胞過形成、線維症、腫瘍原性の一因となっていた可能性がある (32、34)。マウスに腫瘍原性がないことは、ラットと比べて脾臓でみられる毒性が比較的軽度であることが関係している可能性がある (17、35)。

発がん性に対するこのような毒性の作用機序を裏付けるものとして、ラットのアニリン誘発性腫瘍原性の用量反応は非線形となっている (36)。同系統のラットを用いている NCI 試験及び CIIT 試験を考慮した場合、アニリン塩酸塩を 0.02% の濃度 (雄では約 7.2 mg/kg/day のアニリンに等しい) で摂餌投与しても腫瘍はみられなかった。このことは、脾臓でのアニリンに由来する結合放射標識の蓄積パターンを評価した試験 (37) と併せ、アニリンの発がん性には閾値が存在するという結論を裏付けている (36)。この証拠の重みから、これらの腫瘍は主な変異原性作用機序の結果ではないという結論が裏付けられる (38)。

規制上の限度値や公表された限度値

US EPA (36) は、CIIT 試験 (26) に基づき、線形多段階手順を用いて、アニリンの量的発がんリスク評価の概要を示している。その結果、発がん強度スロープ曲線は 0.0057/mg/kg/day であり、10 万分の 1 の生涯発がんリスクと関連している用量は 120 µg/day と計算されている。ただしこの評価では、脾臓でのアニリンの蓄積が非線形であるため、この手順がスロープファクターの算出に最適の方法ではない可能性があるとして記述している (39)。10 mg/kg 未満の用量では、アニリンの蓄積はわずかでありヘモジデリン沈着はみられず、すでに述べたとおり、ヘモジデリン沈着はラットにみられる脾臓腫瘍の誘発に重要である可能性がある。

許容1日曝露量 (PDE)

アニリンの許容摂取量の根拠をラットで観察された脾臓腫瘍の直線外挿とするのは、脾臓腫瘍の用量反応が非線形であること、またアニリンが変異原性物質ではないこと、そして遺伝毒性がアニリン誘発性発がんの作用機序では重要でないことから、不適切であると考えられる。PDE は、ICH Q3C (40) で定めた過程を用いて算出された。

PDE 算出のための試験選択の根拠

CIIT の 2 年間のラットがん原性試験 (26) から得たデータを用いた。用量レベルは摂餌中 200、600、2000 ppm のアニリン塩酸塩であり、7.2、22、72 mg/kg/day のアニリンの用量レベルに等しい。腫瘍は高用量の雄に認められ、22 mg/kg/day では脾臓の間質性肉腫が 1 件確認された。これらのデータに基づき、最低用量である 7.2 mg/kg/day を用いて腫瘍に関する無影響量 (NOEL) を定義している。

The PDE の計算は、(NOEL × 体重補正 (kg)) / F1 × F2 × F3 × F4 × F5 である。

ICH Q3C で概要が示されているように、アニリンの PDE の決定には以下の安全係数を適用した。

F1 = 5 (ラットからヒトへ)

F2 = 10 (個人間のばらつき)

F3 = 1 (少なくとも半生涯の試験期間)

F4 = 10 (重篤な毒性—遺伝毒性ではない発がん性)

F5 = 1 (NOEL を使用)

生涯 PDE = 7.2 mg/kg/day × 50 kg / (5 × 10 × 1 × 10 × 1)

生涯 PDE = 720 µg/day

References

1. Chung KT, Murdock CA, Zhou Y, Stevens SE, Li YS, Wei CI, et al. Effects of the nitro-group on the mutagenicity and toxicity of some benzamines. *Environ. Molecul. Mutagen.* 1996; 27:67-74.
2. IARC. Some aromatic amines, anthraquinones and nitroso compounds, and inorganic fluorides used in drinking water and dental preparations. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1982;27: 39.
3. IARC. Genetic and related effects: An update of selected IARC Monographs from volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1987. Addendum 6: 68.
4. IARC. Overall evaluation of carcinogenicity: An update of IARC monographs volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1987. Addendum 7: pp. 99 and 362.
5. Jackson MA, Stack HF, Waters MD. The genetic toxicology of putative nongenotoxic carcinogens. *Mutat Res* 1993; 296:241-77.
6. Brams A, Buchet JP, Crutzen-Fayt MC, De Meester C, Lauwerys R, Leonard A. A Comparative Study, With 40 Chemicals, of The Efficiency of ohe Salmonella Assay and the SOS Chromotest (Kit Procedure). *Toxicol. Lett.* 1987; 38:123-33.
7. Rashid KA, Arjmand M, Sandermann H, Mumma RO. Mutagenicity of chloroaniline / lignin metabolites in the Salmonella/microsome assay; *J Environ Sci Health* 1987; Part B B22(6):721-9.
8. Gentile JM, Gentile GJ and Plewa M. Mutagenicity of selected aniline derivatives to Salmonella following plant activation and mammalian hepatic activation; *Mutat. Res.* 1987; 188:185-96.
9. Wangenheim J, Bolcsfoldi G. Mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds; *Mutagenesis* 1988; 3(3):193-205.
10. Amacher DE, Paillet SC, Turner GN, Ray VA, Salsburg DS. Point mutations at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.* 1980; 72: 447-74.
11. McGregor DB, Brown AG, Howgate S, McBride D, Riach C, Caspary WJ. Responses of the L5178y mouse lymphoma cell forward mutation assay. V: 27 Coded Chemicals; *Environ Mol Mutagen* 1991; 17: 196-219.
12. Abe S, Sasaki M. Chromosome aberrations and sister chromatic exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl: Cancer Inst.* 1977; 58: 1635-41.
13. Ishidate M, Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.* 1977; 48: 337-54.
14. Ishidate M Jr. The data book of chromosomal aberration tests *in vitro* on 587 chemical substances using Chinese hamster fibroblast cell line (CHL cells). Tokyo. The Realize Inc. 1983; p26.
15. Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, et al. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese Hamster Ovary cells: Evaluations Of 108 Chemicals; *Environ. Mol. Mutagen.* 1987; 10 Suppl 10:1-175.
16. Jones E, Fox V. Lack of clastogenicity activity of aniline in the mouse bone marrow. *Mutagenesis* 2003; 18:283-6.

17. Bomhard EM. High-dose clastogenic activity of aniline in the rat bone marrow and its relationship to the carcinogenicity in the spleen of rats. *Arch. Toxicol.* 2003 77: 291-7.
18. Westmoreland C, Gatehouse DG. Effects of aniline hydrochloride in the mouse bone marrow micronucleus test after oral administration. *Carcinogenesis* 1991; 12:1057-9.
19. Ashby J, Vlachos DA, Tinwell H. Activity of aniline in the mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutat. Res.* 1991; 263: 115-7.
20. Sicardi SM, Martiarena JL, Iglesias MT. Mutagenic and analgesic activities of aniline derivatives. *J Pharm Sci* 1991; 80:761-4.
21. Ress NB, Witt KL, Xu J, Haseman JK, Bucher JR. Micronucleus induction in mice exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. *Mutat Res* 2002; 521:201-8.
22. George E, Andrews M, and Westmoreland C. Effects of azobenzene and aniline in the rodent bone marrow micronucleus test. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1551-5.
23. Witt KL, Knapton A, Wehr CM, Hook GJ, Mirsalis J, Shelby MD et al. Micronucleated erythrocyte frequency in peripheral blood of B6C3F1 mice from short-term, prechronic and chronic studies of the NTP carcinogenesis bioassay program. *Environ Mol Mutagen* 2000; 36: 163-94.
24. Parodi S, Pala M, Russo P, Zunino A, Balbi C, Albini A, et al. DNA damage in liver, kidney, bone marrow, and spleen of rats and mice treated with commercial and purified aniline as determined by alkaline elution assay and sister chromatid exchange induction. *Cancer Res.* 1982; 42:2277-83.
25. Parodi S, Zunino A, Ottaggio L, De Ferrari M, Santi L. Lack of correlation between the capability of inducing sister chromatid exchanges *in vivo* and carcinogenic potency for 16 aromatic amines and azo derivatives. *Mutat Res* 1983; 108:225-38.
26. CIIT. 1982. 104-week chronic toxicity study in rats with aniline hydrochloride. Final report. Report prepared for CIIT by Hazleton Laboratories America, Inc. CIIT Docket No. 11642. CIIT, Research Triangle Park, NC.
27. NCI (National Cancer Institute) National Toxicology Program. Technical report on the bio-assay for Aniline hydrochloride for possible carcinogenicity. (CAS No., 142-04-1). NCI-CG-TR-130. 1978. Available from : URL:
https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr130.pdf
28. Hagiwara A, Arai M, Hirose M, Nakanowatari J-I, Tsuda H and Ito N. Chronic effects of norharman in rats treated with aniline. *Toxicol Lett.* 1980; 6:71-5.
29. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL:
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
30. Steinheider G, Neth R, Marguardt H. Evaluation of nongenotoxic and genotoxic factors modulating the frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of mice. *Cell Biol. Toxicol* 1985; 1:197-211.
31. Tweats D, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Nohmi TT, et al. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat Res* 2007; 627:78-91.

32. Khan MF, Wu X, Boor PJ, Ansari GAS. Oxidative modification of lipids and proteins in aniline induced splenic toxicity. *Toxicol Sci* 1999; 48:134-40.
33. Khan MF, Wu X, Wang JL. Upregulation of transforming growth factor-beta 1 in the spleen of aniline-induced rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 187:22-8.
34. Weinberger MA, Albert RH, Montgomery SB. Splenotoxicity associated with splenic sarcomas in rats fed high doses of D & C Red No. 9 or aniline hydrochloride. *J Natl Cancer Inst* 1985; 5:681-7.
35. Smith RP, Alkaitis AA, Shafer PR. Chemically induced methemoglobinemias in the mouse. *Biochem. Pharmacol* 1967; 16:317-28.
36. Bus JS, Popp JA. Perspectives on the mechanism of action of the splenic toxicity of aniline and structurally-related compounds. *Food. Chem. Toxicol.* 1987; 25: 619-26.
37. Robertson O, Cox MG, Bus JS. Response of the erythrocyte and spleen to aniline insult in Fischer 344 rats. *Toxicologist* 1983; 3:128.
38. Bomhard EM, Herbold BA. Genotoxic activities of aniline and its metabolites and their relationship to the carcinogenicity of aniline in the spleen of rats. *Crit. Rev. Toxicol.* 2005; 35:783-835.
39. US Environmental Protection Agency. Aniline (CAS No 62-53-3). Integrated Risk Information System (IRIS) [Online]. 1988 Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0350_summary.pdf
40. International Conference on Harmonisation (2011). Q3C(R5): Impurities: Guideline for Residual Solvents.

塩化ベンジル (α -クロロトルエン、CAS# 100-44-7)

ヒトへの曝露の可能性

ヒトへの曝露は主に職業での吸入によるが、頻度は少ないものの汚染した地下水の摂取による曝露もある。

変異原性/遺伝毒性

塩化ベンジルは *in vitro* で変異原性及び遺伝毒性があるが、これらは哺乳類を用いた *in vivo* では認められない。

The International Agency for Research on Cancer (IARC) は、塩化ベンジルの変異原性/遺伝毒性データについて詳細に概説を行い、論文を公表した (1)。ここに幾つかの主要な結論を纏める。

塩化ベンジルは以下において変異原性を示す。

Salmonella typhimurium TA100 を用いた細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames 試験) の結果は、試験施設間及び施設内で一貫していないが、気相では明らかな復帰変異コロニー数の増加を示している (2)。

チャイニーズハムスター細胞 (1)。

塩化ベンジルは、マウスの骨髄を用いた *in vivo* 小核試験において、経口、腹腔内又は皮下投与後に小核を誘発しなかったが、静脈内投与後のマウスにおいて、DNA 付加体を形成した (1)。

発がん性

塩化ベンジルはグループ 2A、ヒトに対して発がん性がある可能性が高いと分類されている (3)。

塩化ベンジルが、F-344 ラット及び B6C3F1 マウスにコーン油を媒体として強制経口投与により週 3 回 104 週間投与された (4)。ラットには 0、15、30 mg/kg (推定 1 日量 : 0、6.4、12.85 mg/kg) を投与し、マウスには 0、50、100 mg/kg (推定 1 日量 : 0、21.4、42.85 mg/kg) を投与した。ラットでは、雌の高用量群で甲状腺 C 細胞腺腫/癌腫のみに腫瘍発生率の統計学的に有意な増加が認められた (対照群 8% に対して 27%)。これらの甲状腺癌が投与に関連した変化か否かについての考察は下記に記載されている。複数の毒性試験が実施されたが、C 細胞過形成はこの一生涯の試験の雌にしか認められなかった。

マウス (4) では、雌雄ともに高用量で前胃乳頭腫及び前胃癌 (主に乳頭腫) の発生率の統計学的に有意な増加が認められた (対照群が 0% であったのに対し、雄 62% 及び雌 37%)。腫瘍が認められないマウスの胃には上皮過形成が認められた。また、雄で血管腫又は血管肉腫の発生率の統計学的に有意な増加が高用量で認められ (対照群 0% に対し 10%)、肝臓の癌腫又は腺腫の発生率の統計学的に有意な増加が低用量でのみ認められたが (対照群 33% に対して 54%)、これらは雌では認められなかった。雌で肺胞-細気管支の腺腫又は癌腫の発生率の統計学的に有意な増加が高用量で認められたが (対照群 1.9% に対して 12%)、雄では認められなかった。

発がん性を評価するため、他にも試験が実施されたが、AI の算出に利用するには試験デザインの面で不適切と考えられた。局所投与で実施された 3 つの試験のうちの 1 試験 (5) では皮膚癌の発生率が増加したが、統計学的な有意差は認められなかった (ベンゼン対照群 0% に対して 15%)。塩化ベンジルが皮膚がんを誘発する可能性を確認するため、クロトン油及びホルボールエステルの TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) をプロモーターとして用いたイニシエーション-プロモーション試験が実施されたが (6、7、8)、試験期間が限られており、また、報告書は予備的知見として公表されたが、最終的な結果は文献に記載されていない。皮下投与後には投与部位に肉腫が認められた (9)。

Benzyl chloride – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex or tumor observations	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 4*	52/sex/group F344 rat	2 year 3 times/wk Gavage	52	2: 15 and 30 mg/kg (6 and 12 mg/kg/d)	Thyroid C-cell neoplasm/ Female	40.6
Ref. 4	52/sex/group B6C3F1 mouse	2 year 3 times/wk Gavage	52	2: 50 and 100 mg/kg (21 and 42 mg/kg/d)	Forestomach papilloma, carcinoma/ Male	49.6
Ref. 5	11/group female ICR mouse	9.8 mo 3 times/wk for 4 wks, 2 times/wk Dermal	Yes (benzene treated)	1: 10 µL	No skin tumors	NC ^
Ref. 5	20/group female ICR mouse	50 weeks 2 times/wk Dermal	20 (benzene treated)	1: 2.3 µL	Skin squamous cell carcinoma	NC ^
Ref. 6	20/group male ICI Swiss albino mouse	>7 mo 2 times/wk Dermal, in toluene	20	1: 100 µg/mouse	No skin tumors	NC ^
Ref. 9	14 (40 mg/kg), and 8 (80 mg/kg) BD rat	51 weeks 1 time/wk Subcutaneous	Yes	2: 40 and 80 mg/kg/wk	Injection site sarcoma	NC ^
Ref. 7	40/sex/group Theiler's Original mouse	10 mo 1 dose (in tolene); wait 1 wk Promoter (croton oil) 2 times/wk	40	1: 1 mg/mouse	No skin tumors	NC ^
Ref. 8	Sencar mice	6 mo 1 dose; Promoter (TPA) 2 times/wk	Yes	3: 10; 100 and 1000 µg/mouse	20% skin tumors [5% in TPA controls] (DMBA controls had skin tumors by 11 weeks)	NC ^

Studies listed are in CPDB (Ref. 10) unless otherwise noted.

* Carcinogenicity study selected for the AI calculation

¹NC= Not calculated; small group size, limited duration. Not included in CPDB as route with greater likelihood of systemic exposure is considered more relevant.

発がん性の作用機序

CPDB (10) において、塩化ベンジルについて計算された最小TD₅₀となる腫瘍型 (発がん性が最も高いもの) は、マウスの前胃腫瘍及び雌ラットの甲状腺C細胞腫瘍である。潜在的な不純物が関連する、刺激性のない低用量でのヒトのリスク評価について、この前胃腫瘍の関連性は極めて疑わしい。

げっ歯類の前胃腫瘍は、ヒトへのリスク評価において、多くの議論の対象となっている。非変異原性の化学物質では、強制経口投与後、前胃に接触した高濃度の被験物質に関連した炎症や刺激により過形成が生じ、最終的に腫瘍が発生する可能性があると認識されている。ヒトでは経口投与された物質は急速に食道を通過するのに対し、げっ歯類では強制経口投与された物質は腺胃に排出される前に一定時間前胃に残存する場合がある。このような腫瘍誘発は、刺激が生じない用量ではヒトと関連していない。同様な炎症作用及び過形成作用は変異原性化学物質によっても認められ、このような非変異原性での高用量効果による作用機序が相対的にどのくらい寄与するのか判断するのは、直接的な突然変異誘発と比較してより複雑である。しかし、損傷による二次的機序に基づくと考えられる刺激や炎症を引き起こす濃度にも関連している接触部位での腫瘍形成については、確固たる症例がしばしば生じ得る。細胞増殖は、非線形の用量反応性となる腫瘍形成で重要な役割を果たすと考えられており、前胃 (又はその他の接触部位) の腫瘍は低用量でのヒトへの曝露と関連していない。

Proctor ら (11) は、既知の遺伝毒性がヒト組織と関連している可能性があるか (ある化合物が *in vivo* で遺伝毒性を有するかについても含まれる)、経口投与によるどのような種類の腫瘍も前胃に特異的であるか、腫瘍は前胃を刺激する用量や MTD を上回る用量でのみ認められるか、を考慮し、発がんリスク評価において前胃腫瘍の関連性を評価するための体系立てられた方法を提案した。

上記や表で説明したように、塩化ベンジルはラット及びマウスにおいて、強制経口投与による高用量の曝露後 (前胃腫瘍)、注射による高用量の曝露後 (注射部位の肉腫) 及び高感受性の Sencar マウスの皮膚腫瘍イニシエーション-プロモーションモデルにおいて、局所塗布による高用量の曝露後、主に接触部位で腫瘍を誘発する。Screening Information Dataset (SIDS) for high volume chemicals の OECD 報告書では、塩化ベンジルは急性及び反復投与試験において、皮膚、眼、粘膜に対し強い刺激性を示したと説明している (12)。Fischer 344 ラットの雄に 250 mg/kg 以上、雌に 125 mg/kg 以上の塩化ベンジルを週 3 回経口投与した後に、雌雄各 10 匹が前胃における重度の急性及び慢性胃炎のため 2-3 週間以内に死亡し、潰瘍を伴うものも多く認められた

(4)。雌ラットの低用量では、前胃の過形成 (62 mg/kg) や前胃の角化亢進 (30 mg/kg) などの増殖性変化が認められた。マウスのがん原性試験では前胃腫瘍の発生率が高く、また、Lijinsky ら (4) は亜慢性用量設定試験でラットの前胃において非腫瘍性病変も観察したが、ラットのがん原性試験では前胃において腫瘍はほとんど発生しなかった。ラットでの用量-反応曲線のスロープは急峻であり MTD の確立が困難であることから、著者はラットの試験で用いた用量がラットで有意な発がん性を誘発する量よりわずかに低すぎたと推測した。

塩化ベンジルの場合、接触部位の腫瘍に加えその他の腫瘍型についても、その投与と関連している可能性があるとして考察された。マウスの経口投与試験で、Lijinsky は前胃腫瘍以外の発がん作用を意義がないと見なし、これには雄における内皮の腫瘍、雌のみにおける肺の肺胞-細気管支の腫瘍 (これらはいずれも統計的に有意ではない) 及び雄の低用量のみにおける肝細胞の腫瘍 (この腫瘍型は用量に関連していなかったため考慮しなかった) の増加が含まれた。OECD SIDS (12) がマウスの 26 週間経口毒性試験における重度から中等度の用量に関連した肝臓の過形成の観察所見を報告していることは注目に値する。

雄マウスでは循環器系の血管腫/血管肉腫 (TD₅₀は 454 mg/kg/day)、雌ラットでは甲状腺 C 細胞腺腫又は癌腫 (TD₅₀は 40.6 mg/kg/day) の統計学的に有意な増加が報告された。雌ラットの高用量群における甲状腺 C 細胞腫瘍の発生頻度は、雌の同時対照群より高かったが (対照群では 52 匹中 4 匹だったのに対し 52 匹中 14 匹)、雄の同時対照群とは同程度であった (52 匹中 12 匹)。雄では、甲状腺 C 細胞腫瘍の発生頻度は、対照群より塩化ベンジル投与群の方が低かった。NTP の試験 (13、14) で収集された Fisher 344 ラットの背景対照群のデータにおいて、この系統のラットの C 細胞腺腫及び癌腫の発生頻度が雌雄とも同程度であるものの、範囲は雄の方が広いことを示している。したがって、塩化ベンジルを投与した雌ラットの甲状腺腫瘍の発生頻度を雌雄の同時対照群と比較することは妥当であると考えられ、雌の甲状腺腫瘍は当時に引用した背景対照群の範囲を上回っていたが (10%)、投与に関連しているかについては疑わしい。

規制上の限度値や公表された限度値

US EPA (15) は 1.7×10^{-1} mg/kg/day という経口スロープファクターを算出し、これは US EPA の仮定を用いた場合の 10 万分の 1 のリスクレベルである 2 µg/L 又は約 4 µg/day に相当する。

許容摂取量 (AI)

AI を計算するための試験選択の根拠

塩化ベンジルの発がん性に関する最も頑健な評価は、(強制) 経口投与を用いた Lijinsky らの試験 (4) だった。この試験では、動物に対して一般的な NCI/NTP の試験のように週 5 日ではなく、週 3 日の投与を行っていた。しかし、最高用量が最大耐量に近いことを示す証拠があったため、全体としてこのラットの試験は AI を計算するのに適していると考えられた。同じレポートに記載された 26 週間の用量設定試験 (4) では、それぞれ 125 mg/kg 又は 250 mg/kg (週 3 日) を投与された雌雄のラット 10 匹全例が 2~3 週間以内に死亡した。死因は前胃における重度の胃炎及び潰瘍であり、心筋壊死の認められる例も多かった。62 mg/kg 投与群では、雌の 26 匹中 4 匹のみが 26 週間まで生存し、心筋壊死及び前胃の過形成が認められた。30 mg/kg 投与群の雌の数例では、前胃の角化亢進が認められた。62 mg/kg 投与群では、雌雄で体重増加の抑制が認められ、雄では統計学的に有意な抑制が認められた。したがって、がん原性試験で選択した高用量は 30 mg/kg (週 3 回投与) だった。この用量では、2 年間のがん原性試験において、生存率に対照群との差はなかったが、雄ラット 3 匹では前胃の扁平上皮癌及び乳頭腫が認められたため、生涯試験をより高用量で行なうことができたとは考えにくい。

標準的方法を示した 2.2 項で説明したように、TD₅₀ からの直線外挿を AI 算出の方法として用いた。上記のとおり、刺激や炎症を引き起こす可能性のある濃度を十分に下回る、医薬品に含まれる不純物のような低濃度に曝露されたヒトにおいて、塩化ベンジルが接触部位の腫瘍のリスクを引き起こすことは極めて考えにくい。したがって、雄マウスにおいて認められた前胃腫瘍を AI の算出に用いるのは妥当ではないと考えられる。雌ラットにおいて認められた甲状腺 C 細胞腫瘍は、対照群のラットでもよく発生するため、この腫瘍の意義にも疑問が残る。しかしながら、これらの腫瘍が原因不明であり、甲状腺 C 細胞腫瘍は最小 TD₅₀ である 40.6 mg/kg/day を示したため、この腫瘍を用いて AI を算出した。

AI の算出

$$\text{生涯 AI} = \text{TD}_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 40.6 \text{ (mg/kg/day)}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 40.6 \text{ } \mu\text{g/day (41 } \mu\text{g/day)}$$

References

1. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. [Online] 1972-PRESENT. (Multivolume work). 1999. Available from: URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-19.pdf>
2. Fall M, Haddouk H, Morin JP, Forster R. Mutagenicity of benzyl chloride in the *Salmonella*/microsome mutagenesis assay depends on exposure conditions. *Mutat Res* 2007; 633:13-20.
3. IARC. An update of selected IARC Monographs from volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1987. Suppl. 7: 126-7; 148-9.
4. Lijinsky W. Chronic Bioassay of Benzyl Chloride in F344 Rats and (C57BL/6J X BALB/c) F1 Mice. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76:1231-6.
5. Fukuda K, Matsushita H, Sakabe H, Takemoto K. Carcinogenicity of benzyl chloride, benzal chloride, benzotrichloride and benzoyl chloride in mice by skin application, *Gan* 1981; 72(5): 655-64.
6. Ashby J, Gaunt C, Robinson M. Carcinogenicity bioassay of 4-chloromethylbiphenyl (4CMB), 4-hydroxymethylbiphenyl (4HMB) and benzyl chloride (BC) on mouse skin: Interim (7 month) report. *Mutat Res* 1982; 100:399-401.
7. Coombs MM. Attempts to initiate skin tumors in mice in the 2-stage system using 4-chloromethylbiphenyl (4CMB), -hydroxymethylbiphenyl (4HMB) and benzyl chloride (BC), Report of the experiment at 10 months, *Mutat Res* 1982; 100:403-5.
8. Coombs MM. The UKEMS Genotoxicity Trial: A summary of the assays for skin tumour induction in mice, the subcutaneous implant test and the sebaceous gland suppression test. *Mutat Res* 1982; 100:407-9.
9. Druckrey H, Kruse H, Preussmann R, Ivankovic S, Landschuetz C. Cancerogenic alkylating substances. III. Alkyl-halogenides, - sulfates, - sulfonates and strained heterocyclic compounds. 1970; 74(3):241-73.
10. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
11. Proctor DM, Gatto NM, Hong SJ, Allamneni KP. Mode-of-action framework for evaluation of the relevance of rodent forestomach tumors in cancer risk assessment. *Toxicol Sci* 2007; 98:313-26.
12. OECD Chemicals Screening Information Dataset (SIDS) for high volume chemicals benzyl chloride report published by the United Nations Environmental Programme (UNEP) [Online]. Available from: URL: <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSIDS/100447.pdf>
13. Haseman JK, Huff J, Boorman GA. Use of historical control data in carcinogenicity studies in rodents. *Toxicol Pathol* 1984; 12:126-35.
14. Haseman JK, Hailey JR, Morris RW. Spontaneous neoplasm incidence in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice in two-year carcinogenicity studies: A National Toxicology Program update, *Toxicol Pathol* 1998; 26:428-41.

15. US Environmental Protection Agency. Benzyl chloride (CAS 100-44-7). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online] 1989. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0393_summary.pdf

ビス (クロロメチル) エーテル (BCME、CAS# 542-88-1)

ヒトへの曝露の可能性

工業的利用においては主に吸入となるが、環境において急速に分解されるため、環境曝露はごくわずかであり、このことは大気中や水中に BCME が存在しないと報告されたことで裏付けられている (1)。

変異原性/遺伝毒性

BCMEは*in vitro*及び*in vivo*で変異原性及び遺伝毒性がある。

BCMEは以下において変異原性を示す。

*Salmonella typhimurium*による細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames) (2)

*In vivo*では、吸入で6カ月間曝露されたラットの骨髄細胞において、BCMEは染色体異常を誘発しなかった (3)。BCMEに曝露された労働者の末梢リンパ球には、染色体異常発生率にわずかな上昇を認めた (4)。

発がん性

BCMEは、US EPAによりグループA、ヒトにおいて既知の発がん物質 (5)、また、IARCによりグループ1、ヒトへの発がん性があると分類されている (6)。

上記の総説が示すように、多くの疫学研究から (吸入により) BCMEに曝露された労働者で肺癌リスクの上昇が明らかとなっている。以下の試験で説明されているように、吸入による曝露後、BCMEはラット及びマウスの気道にて発がん性を示す。

最も頑健な試験デザインと最小TD₅₀値であったことに基づいて、Leongら (3) の試験をAIの算出に選択した。雄Sprague-Dawleyラット及びHa/ICRマウスの群を1、10、100 ppbのBCMEに6 h/day、週5日で6カ月間吸入曝露し、その後自然に死亡するまで生涯観察した (約2年間)。6カ月間の曝露期間終了時に屠殺したラットの群を評価したところ、血液学的検査、肺洗浄液の剥離細胞診、骨髄細胞の細胞遺伝学的パラメータに異常はみられなかった。ただし、100 ppb (7780 ng/kg/day、又は~8 µg/kg/day) のBCMEに曝露されている生存ラットの86.5%は、その後に鼻腫瘍 (嗅上皮の腫瘍である鼻腔神経上皮腫、ヒトでまれな神経芽細胞腫に類似) を発症し、これらのラットの約4%は肺腺腫を発症した。10又は1 ppbのBCMEに曝露されたラットでは腫瘍を認めなかった。100 ppbのBCMEに曝露されたマウスは鼻腫瘍を発症しなかったが、対照マウスと比較して有意に肺腺腫発生率が上昇した。10又は1 ppbのBCMEに曝露されたマウスでは肺腺腫発生率が有意に上昇しなかった。

吸入試験において、雄 Sprague-Dawley ラットに 0.1 ppm (100 ppb) の単一用量の BCME に 6 時間 /day、週 5 日を 10、20、40、60、80、又は 100 日間曝露し、生涯観察した (7)。投与動物では、対照群と比較していくつかの気道腫瘍の著しい発生増加がみられた。

BCMEは接触部位発がん物質であり、マウスで注射部位に肉腫 (8)、また皮膚に腫瘍を発生させる (9)。皮下投与した新生児マウスには肺腺腫も誘発する (10)。

Bis(chloromethyl)ether (BCME) – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/dose group	Duration/Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 3*	~104/group Rat, male Sprague-Dawley.	28 weeks 6 h/d, 5 d/wk Inhalation	104	3: 1; 10; 100 ppb (53;528; 7780 ng/kg/d)	Nasal passage - esthesioneuro- epitheliomas	0.00357
Ref. 3	138-144/group Mouse, male ICR/Ha.	25 weeks 6 h/d, 5 d/wk Inhalation	157	3: 1; 10; 100 ppb (0.295; 2.95;33.6 ng/kg/d)	Lung adenomas	No significant increases
Ref. 7	30-50 treated for different durations with same concentration, male Sprague Dawley rats.	6h/d, 5d/wk, for 10, 20, 40, 60, 80, and 100 exposures. Inhalation	240	1: 0.1 ppm	Lung and nasal cancer	NC [^]
Ref. 7	100/group male Golden Syrian Hamsters.	Lifetime 6h/d, 5d/wk, Inhalation	NA	1: 1 ppm	One undifferentiated in the lung	NC [^]
Ref. 9	50/group female ICR/Ha Swiss mice.	424-456 days, once weekly Intra- peritoneal	50	1: 0.114 mg/kg/d	Sarcoma (at the injection site)	0.182

Studies listed are in CPDB (Ref. 11) unless otherwise noted.

*Carcinogenicity study selected for AI calculation

[^]NC= Not calculated due to non-standard carcinogenicity design. Not in CPDB.

NA= Not available since controls were not reported in the study

発がん性の作用機序

BCME は変異原性発がん物質であり、許容摂取量は TD₅₀ からの直線外挿により算出される。

規制上の限度値や公表された限度値

US EPA (5) では、Kuschner ら (7) による吸入試験データの線形多段階モデリングに基づいて、経口発がんスロープファクターは 220 per mg/kg/day と計算された。10 万分の 1 の生涯発がんリスクと関連する吸入用量 (及び経口用量) は 3.2 ng/day (吸入については 1.6×10^{-8} mg/m³、経口曝露については 1.6×10^{-6} mg/L) である。

許容摂取量 (AI)

AI 算出に用いた試験の選択根拠

BCME は *in vitro* の変異原性物質であり、動物及びヒトにおいてがんを引き起こし、既知のヒトの発がん物質として分類されている。経口投与によるがん原性試験は実施されていないため、腹

腔内注射試験及び吸入試験を AI 設定の根拠とみなす。最も感受性の高い評価項目は、吸入がん原性試験 (3) における雄ラットの鼻腫瘍 (鼻腔神経上皮種) の増加であり、TD₅₀ は 3.57 µg/kg/day だった。TD₅₀ から直線外挿により算出した AI である ~4 ng/day は、US EPA の推奨値である 3.2 ng/day と本質的に同一だった。この試験 (3) は信頼性のあるデザインであり、複数の用量段階が設定され、1 群につき 50 匹を超えていた。

吸入曝露された部位以外の腫瘍についての証拠はない。皮膚塗布後の新生児マウスの肺腫瘍について記述している上記の試験 (10) は、皮膚塗布の結果として吸入が生じた場合は確定的でない可能性がある。しかし、本補遺において吸入データから算出した AI は極めて慎重である (1.5 µg/day の規定値より桁が低い) ため、他の経路に適用可能であると考えられる。吸入データに基づき US EPA が算出した限界値が、吸入した BCME 及び摂取した BCME (飲水) の双方に推奨されており、この AI と類似している (4 ng/day 対 3.2 ng/day)。

AI の算出

$$\text{生涯 AI} = \text{TD}_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 3.57 \text{ µg/kg/day}/50,000 \times 50$$

$$\text{生涯 AI} = 0.004 \text{ µg/day or } 4 \text{ ng/day}$$

References

1. NIH ROC. National Institutes of Health. Report on Carcinogens, Twelfth Edition [Online]. 2011. Available from: URL: [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/bis\(chloromethyl\)ether.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/bis(chloromethyl)ether.pdf)
2. Nelson N. The chloroethers - occupational carcinogens: A summary of laboratory and epidemiology studies. Ann. NY Acad Sci 1976; 271:81-90.
3. Leong BKJ, Kociba RI, Jersey GC. A lifetime study of rats and mice exposed to vapors of bis(chloromethyl) ether. Toxicol Appl Pharmacol 1981; 58:269-81.
4. IARC. Bis(chloromethyl)ether and chloromethyl methyl ether (technical-grade). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Lyon. 1987; Addendum 7: 131-3.
5. U.S. Environmental Protection Agency. Bis(chloromethyl)ether (CAS# 542-88-1). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1999. Available from: URL: <http://www.epa.gov/iris/subst/0375.htm>
6. IARC. Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1982; Volumes 1 to 29, Addendum 4.
7. Kuschner M, Laskin S, Drew RT, Cappiello V, Nelson N. Inhalation carcinogenicity of alpha halo ethers. III. Lifetime and limited period inhalation studies with bis(chloromethyl)ether at 0.1 ppm. Arch Environ Health 1975; 30:73-7.
8. Van Duuren BL, Sivak A, Goldschmidt BM, Katz C, Melchionne S. Carcinogenicity of halo ethers. J Nat Cancer Inst 1969; 43: 481-6.
9. Van Duuren BL, Goldschmidt BM, Seidman I. Carcinogenic activity of di- and trifunctional α-chloro ethers and of 1,4-dichlorobutene-2 in ICR/HA swiss mice. Cancer Res 1975; 35:2553-7.

10. Gargas JL, Reese WH Jr, Rutter HA. 1969. Induction of lung adenomas in newborn mice by bis(chloromethyl) ether. Toxicol Appl Pharmacol 1969; 15:92-96.
11. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>

***p*-クロロアニリン (CAS# 106-47-8) 及び *p*-クロロアニリン塩酸塩 (CAS# 20265-96-7)**

ヒトへの曝露の可能性

工業的曝露は、染料、織物、ゴムなどの工業で可能性がある (1)。環境中に放出されると、好気条件下の水中で本質的に生分解される (2)。

変異原性/遺伝毒性

p-クロロアニリンは *in vitro* で変異原性を示し、*in vivo* の遺伝毒性については限られた証拠しかない。

様々な試験系を用いた遺伝毒性試験の詳細なレビューは、文献とともに WHO (3) により提供されているため、ここに主要な結論のみを纏める。

p-クロロアニリンは以下の試験で変異原性を示す：

細菌を用いた復帰突然変異試験 (Ames) ；いくつかの施設で2から3倍の復帰変異コロニー数の増加が認められたが、認められなかった施設もある。

マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いる *tk* 遺伝子突然変異試験の陽性結果 (3) は、著しい細胞毒性を伴うわずかな増加であり、「総合的評価ファクター (global evaluation factor)」を用いた陽性試験に対する現行の基準を満たしていない (4)。

チャイニーズハムスター卵巣細胞における染色体異常のわずかな増加が認められたが、2つの試験施設で一貫していない。

In vivo では 180 mg/kg を単回経口投与されたマウスでは小核が増加しなかったが、300 mg/kg/day を投与されたマウスでは3日間投与後に有意な増加が認められた。

発がん性

ヒトでは証拠が不十分であるが、動物では発がん性を示す十分な証拠があることから、IARC により、*p*-クロロアニリンはグループ 2B、おそらくヒトに対して発がん性があると分類されている (5)。

動物を用いたがん原性試験は、*p*-クロロアニリンあるいはその塩酸塩である *p*-クロロアニリン塩酸塩について実施されている。

AI の算出には、強制経口投与で実施された NTP (6) 試験を用いた。この試験では脾臓腫瘍の発生率上昇に基づくと、*p*-クロロアニリン塩酸塩は雄ラットでがん原性を示した (肉腫の複合発生率：媒体対照 0/49 例、低用量 1/50 例、中用量 3/50 例、高用量 38/50 例)。脾臓の線維症は線維肉腫に進行するおそれがある前腫瘍性病変であり、雌雄両性に認められた (6、7)。雌ラットにおいて、脾臓腫瘍は中用量ラット 1 例及び高用量ラット 1 例のみに認められた。雌雄ラットの副腎褐色細胞腫の発生率上昇は *p*-クロロアニリン投与と関連している可能性があるが、悪性褐色細胞腫は増加しなかった。雄マウスでは高用量群で肝臓や脾臓での血管肉腫の発生率が、媒体対照よりも高かった (0 mg/kg/day で 4/50 例；2.1 mg/kg/day で 4/49 例；7.1 mg/kg/day で 1/50 例；21.4 mg/kg/day で 10/50 例)。肝細胞腺腫や肝細胞癌の (複合型) 発生率は、投与された雄マウスで増加し、これらのうち肝細胞癌は (0 mg/kg/day で 3/50 例；2.1 mg/kg/day で 7/49 例；7.1 mg/kg/day で 11/50 例；21.4 mg/kg/day で 17/50 例) であった。雌マウスの試験は陰性であった。NTP (6) の最終結論は、雄ラットでの発がん性には明らかな証拠があること、雌ラットでの発がん性の証拠は曖昧であること、雄マウスでの発がん性には証拠がいくつかあること、及び雌マウスでの発がん性を示す証拠はないこととされた。

より以前の試験では、ラット及びマウスに

-クロロアニリンが摂餌投与された (8)。投与された雄ラットで脾臓腫瘍が、マウスでは血管肉腫が認められた。腫瘍の発生率からは発がん性が強く支持されたが、これらの試験条件下ではラットとマウスに対する

-クロロアニリンの発がん性を結論する十分な証拠が認められない、とNCIは結論した。

-クロロアニリンは飼料中で不安定であり、動物には目標を下回る濃度で投与された可能性があった (3)。したがって、本試験は不十分とみなされる。

***p*-Chloroaniline and *p*-Chloroaniline HCl – Details of carcinogenicity studies**

Study	Animals /dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 6* <i>p</i> -chloroaniline HCl	50/group male B6C3F1 mice	103 weeks 5 times/wk Gavage	50	3: 3; 10; 30 mg/kg (2.1; 7.1; 21.4 mg/kg/d)	Hepatocellular adenomas or carcinomas	33.8
Ref. 6 <i>p</i> -chloroaniline HCl	50/group female B6C3F1 mice	103 weeks 5 times/wk Gavage	50	3: 3; 10; 30 mg/kg (2.1; 7.1; 21.4 mg/kg/d)	Negative	NA
Ref. 6 <i>p</i> -chloroaniline HCl	50/group male Fischer 344 rat	103 weeks 5 times/wk Gavage	50	3: 2; 6; 18 mg/kg (1.4; 4.2; 12.6 mg/kg/d)	Spleen fibrosarcoma, haemangiosarcoma, osteosarcoma	7.62
Ref. 6 <i>p</i> -chloroaniline HCl	50/group female Fischer 344 rat	103 weeks 5 times/wk Gavage	50	3: 2; 6; 18 mg/kg (1.4; 4.2; 12.6 mg/kg/d)	No significant increases; equivocal	NA
Ref. 8	50/group male Fischer 344 rat	78 weeks (study duration: 102 wk) Diet	20	2: 250; 500 ppm (7.7; 15.2 mg/kg/d)	Mesenchymal tumors (fibroma, fibrosarcoma, haemangiosarcoma, osteosarcoma, sarcoma not otherwise specified) of the spleen or splenic capsule	72
Ref. 8	50/group female Fischer 344 rat	78 weeks (study duration: 102 wk) Diet	20	2: 250; 500 ppm (9.6, 19 mg/kg/d)	Negative	NA
Ref. 8	50/group male B6C3F1 mice	78 weeks (study duration: 91 wk) Diet	20	2: 2500; 5000 ppm (257; 275 mg/kg/d)	Haemangiosarcomas (subcutaneous tissue, spleen, liver, kidney) Increased incidence of all vascular tumors	Not significant (CPDB)

Study	Animals /dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 8	50/group female B6C3F1 mice	78 weeks (study duration: 102 wk) Diet	20	2: 2500; 5000 ppm (278, 558 mg/kg/d)	Haemangiosarcomas (liver and spleen) Increased incidence of combined vascular tumors	1480

Studies listed are in CPDB (Ref. 9).

*Carcinogenicity study selected for AI calculation.

NA = Not applicable

発がん性の作用機序

p-クロロアニリンは雄ラットにおいて、アニリン及び構造的に関連性のある物質で典型的にみられる、脾臓の線維肉腫や骨肉腫のような腫瘍を誘発した。*p*-クロロアニリンの反復曝露はチアノーゼ及びメトヘモグロビン血症を誘発し、続いて血液、肝臓、脾臓及び腎臓において、血液学的パラメータ、巨脾並びに脾臓、肝臓及び腎臓における一部には髄外造血を伴った中等度から重度のヘモジデリン沈着を示した (6、8)。これらの影響は、化合物が誘発した過剰な溶血によって二次的に発生しており、再発性の貧血とも一致している (3)。これらの証拠は、がん原性の間接的なメカニズムを示し、メトヘモグロビン血症の他、脾臓の線維化や過形成に続いて発生し (10)、*p*-クロロアニリンやその代謝物が DNA と直接作用したことに関連した腫瘍誘発ではないことを支持する。同様に、*in vivo* での小核誘発の報告は、アニリンと同様に再発性の貧血や造血変化による二次的なものだと考えられた (11、12)。

最小 TD₅₀ となる腫瘍型は、雄ラットでの脾臓腫瘍であった。しかし、この腫瘍型は非線形の用量関係を伴っているため、脾臓腫瘍は許容摂取量の算出に用いなかった。非腫瘍性の変化 (血液毒性) に基づき、WHO (3) は、2µg/kg/day (すなわち、体重 50 kg のヒトで 100 µg/day) を推奨している。

p-クロロアニリンの *in vitro* 変異原性試験では、施設間で再現性のないわずかな突然変異の増加がみられているのみであるが、肝臓腫瘍の作用機序として突然変異の関与を否定できない。

規制上の限度値や公表された限度値

p-クロロアニリンやその塩酸塩については、規制上の限度値は公表されていない。

許容摂取量 (AI)

雄マウスの肝臓腫瘍の作用機序として変異原性の関与を否定できないため、AIは腺腫と癌腫を合わせた数に基づく TD₅₀である33.8 mg/kg/dayからの直線外挿により算出した。

AIの算出

p-クロロアニリン塩酸塩のマウス肝臓腫瘍に基づく。

$$\text{生涯 AI} = \text{TD}_{50} / 50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 33.8 \text{ mg/kg/day} / 50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 34 \text{ µg/day}$$

References

1. Beard RR, Noe JT. Aromatic nitro and amino compounds, Clayton GD, Clayton FE, editors. Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. New York. John Wiley 1981; 2A:2413-89.
2. BUA. *p*-Chloroaniline. Beratergremium für Umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Weinheim, VCH, 1995; 171. (BUA Report 153).
3. World Health Organization (WHO). International Programme on Chemical Safety (IPCS). 2003. Concise International Chemical Assessment Document 48 4-chloroaniline. [Online]. Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad48.htm>
4. Moore MM, Honma M, Clements J, Bolcsfoldi G, Burlinson B, Cifone M, et al. Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing Aberdeen, Scotland, 2003 Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation. Environ Mol Mutagen 2006; 47: 1-5.
5. IARC. Para-chloroaniline. In: Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1993; 57: 305-21.
6. NTP. Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of para-chloroaniline hydrochloride (CAS No. 20265-96-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 1989 NTP TR 351.
7. Goodman DG, Ward JM, Reichardt WD. Splenic fibrosis and sarcomas in F344 rats fed diets containing aniline hydrochloride, *p*-Chloroaniline, azobenzene, *o*-toluidine hydrochloride, 4,4'-sulfonyldianiline, or D & C Red No. 9; J Natl Cancer Inst 1984;3:265-73.
8. NCI. Bioassay of *p*-Chloroaniline for possible carcinogenicity, CAS No. 106-47-8. US National Cancer Institute, Bethesda, MD. 1979; NCI-CG-TR-189.
9. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
10. Bus JS, Popp JA. Perspectives on the mechanism of action of the splenic toxicity of aniline and structurally-related compounds, Food Chem Toxicol 1987; 25:619-26.
11. Ashby J, Vlachos DA, Tinwell H. Activity of aniline in the mouse bone marrow micronucleus assay. Mutat Res 1991 263:115-7.
12. Tweats D, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Nohmi TT, et al. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. Mutat Res 2007; 627:78-91.

1-クロロ-4-ニトロベンゼン (パラ-クロロニトロベンゼン、CAS# 100-00-5)

ヒトへの曝露の可能性

工業的利用において曝露する可能性がある。一般集団の曝露に関する入手可能なデータはない。

変異原性/遺伝毒性

1-クロロ-4-ニトロベンゼンは *in vitro* 及び *in vivo* で変異原性及び遺伝毒性がある。

1-クロロ-4-ニトロベンゼンは以下において変異原性を示す：

1-クロロ-4-ニトロベンゼンは、*Salmonella typhimurium* 株 TA100 及び TA1535 を用いた代謝活性化系存在下での細菌を用いる復帰変異試験 (Ames) では変異原性を示したが、TA1537、TA1538、TA98、及び *E.coli* WP2uvrA では陰性だった (1、2、3、4)。TA1535 では、代謝活性化系の非存在下でも 4 試験中 2 試験で弱い陽性を示した (4)。

In vivo では、クロロ-4-ニトロベンゼンを腹腔内投与した雄 Swiss マウスの肝臓、腎臓、脳において、DNA 鎖切断が誘発された (5、6)。

発がん性

IARC により、1-クロロ-4-ニトロベンゼンはグループ 2 の発がん物質、ヒトでの発がん性は分類できないとされており (7)、US EPA はグループ B2 の発がん物質、すなわちヒトへの発がん物質である可能性が高いとみなしている (8)。

1-クロロ-4-ニトロベンゼンの動物を用いたがん原性試験は、ラット及びマウスの摂餌投与 (9、10) 及び雄マウスの強制経口投与 (12) により実施されている。

2年間の給餌による試験 (9) では、雌雄ラットにおいて脾臓腫瘍 (線維腫、線維肉腫、骨肉腫及び肉腫) の有意な増加がみられ、雌雄において脾臓の血管肉腫の増加がみられ、それらは雄の中用量及び高用量 (7.7 及び 41.2 mg/kg/day) で統計学的に有意であった。線維化や被膜過形成のような脾臓の非腫瘍性変化もみられた。副腎髄質褐色細胞腫の増加が高用量 (53.8 mg/kg/day) でみられ、それは雌で統計学的に有意であった。マウスでは、唯一の有意な腫瘍の増加は、雌の高用量 (275.2 mg/kg/day) における肝臓の血管肉腫であった。赤血球数やヘマトクリットの減少のような血液学的障害、また髄外造血がラットとマウスの両方でみられた。

別の給餌による試験 (10) では、雄 CD-1 ラットに 18 カ月間摂餌投与した場合は腫瘍を誘発しなかった。18 カ月の間、摂餌中の濃度を毒性により以下のように調節した。低用量群には最初の 3 カ月間に 2000 ppm、次の 2 カ月間に 250 ppm、6 カ月目から 18 カ月目まで 500 ppm を、高用量群には最初の 3 カ月間に 4000 ppm、次の 2 カ月間に 500 ppm、6 カ月目から 18 カ月目まで 1000 ppm を投与した。平均 1 日曝露量は、低用量群が約 17 mg/kg、高用量群が約 33 mg/kg だった。最終投与から 6 カ月後にラットを屠殺し、腫瘍について評価した。評価した 11 組織 (肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、心臓、膀胱、胃、腸、精巣及び下垂体) では、投与に関連した腫瘍増加はみられなかった。

同研究室 (10) はまた、18 カ月間摂餌投与した雌雄 CD-1 マウスにおいて、1-クロロ-4-ニトロベンゼンによる発がんの可能性を調べた。最終曝露から 3 カ月後にマウスを屠殺し、12 組織 (肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、心臓、膀胱、胃、腸及び生殖器) の腫瘍を評価した。雌雄いずれのマウスにおいても、肝臓、肺及び脾臓の血管腫瘍 (血管腫又は血管肉腫) に用量依存性の増加を認めた。

経口投与の試験 (11) では、雌雄 Sprague-Dawley ラット (n = 60) に対し、1-クロロ-4-ニトロベンゼンを週 5 日 24 カ月間強制経口投与した。雌雄いずれにおいても毒性がみられ、中用量及び高用量群でメトヘモグロビン血症、高用量群でヘモジデリン及び貧血がみられた。

1-Chloro-4-nitrobenzene – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 9 ⁺	50/ group male F344 rats (SPF)	2 years (Diet)	50	3: 40; 200; 1000 ppm. (1.5; 7.7; 41.2 mg/kg/d)	Spleen hemangiosarcomas 7.7 mg/kg/d	173.5
	50/ group female F344 rats (SPF)	2 years (Diet)	50	3: 40; 200; 1000 ppm. (1.9; 9.8; 53.8 mg/kg/d)	Pheochromo- cytoma/Female 53.8 mg/kg/d	116.9 ^{**}
	50/ group male Crj:BDF1 (SPF)	2 years (Diet)	50	3: 125; 500; 2000 ppm. 15.3; 60.1; 240.1 mg/kg/d)	NA	
	50/ group female Crj:BDF1 (SPF)	2 years (Diet)	50	3: 125; 500; 2000 ppm. (17.6; 72.6; 275.2 mg/kg/d)	Hepatic hemangiosarcomas 275.2 mg/kg/d	1919.9
Ref. 10	14-15/ group male CD-1 rats	18 mo Diet; sacrificed 6 mo after last dose	16	2: Average 17 and 33 mg/kg; (see text) (22.6 and 45.2 mg/kg/d)	NA	Negative [^]
	14-20/sex group CD-1 mice	18 mo Diet; sacrificed 3 mo after last dose	15/sex	2: M: 341; 720. F: 351; 780 mg/kg/d	Vascular (hemangiomas/ Hhemangiosarcomas) /Male	430 [^]
Ref. 11 ⁺	60/sex/ group Sprague Dawley rat	24 mo 5 d/wk, Gavage2	Yes	3/ 0.1; 0.7; 5 mg/kg/d	NA	Negative

Studies listed are in CPDB (Ref. 12) unless otherwise noted.

^{*}Carcinogenicity study selected for AI/PDE calculation.

^{**}TD₅₀ calculated based on carcinogenicity data (see Note 1)

[^]Not in CPDB.

^ Histopathology limited to 11-12 tissues.

NA = Not applicable

発がん性の作用機序

ラット (13)、ウサギ (14) 及びヒト (15) では、1-クロロ-4-ニトロベンゼンは還元により 4-クロロアニリン (*p*-クロロアニリン) へ有意に代謝される。*p*-クロロアニリンは 1-クロロ-4-ニトロベンゼンと同じく、ラット及びマウスで血管肉腫及び脾臓腫瘍を誘発させることがわかっている (16)。アニリンのように、4-クロロアニリン (16) 及び 1-クロロ-4-ニトロベンゼン (17) のいずれについても、赤血球の酸化的損傷、脾臓の線維化及び過形成に続発した、肝臓及び脾臓の血管腫瘍形成の間接的機序が示唆されている。メトヘモグロビン血症及び関連毒性は 1-クロロ-4-ニトロベンゼンの顕著な作用の 1 つである。腫瘍誘発が非線形機序であることが、給餌による試験 (9、10) よりも低い用量で実施された強制経口投与の試験 (11) の試験における、メトヘモグロビン血症及びヘモジデリンがみられたが腫瘍増加はなかったという事実で裏付けられている。

最小 TD₅₀ となる腫瘍型は、雌ラットの副腎髄質褐色細胞腫であった (9)。この腫瘍型は F344 ラットの、特に雄ではバックグランド腫瘍として一般的であり、幾つかの化学物質を投与した後にみられ、それらの多くは非変異原性物質である (18)。それらの腫瘍は様々な生化学的な障害を伴っており、赤血球に毒性を示すアニリンや *p*-クロロアニリンのような化学物質による褐色細胞腫の誘発作用機序は、酸化的リン酸化の脱共役 (18) あるいは低酸素に対する二次的なものであると考えられてきた。

概して、以下のような非変異原性の作用機序の実質的証拠がある。

顕著な腫瘍型の多くはメトヘモグロビン血症に関連するもの (脾臓腫瘍及び血管腫瘍) であったこと

副腎髄質褐色細胞腫の誘発にも同様の点があること

明らかに非線形の用量反応があること (無作用量があること、および更に低用量を用いた試験 (11) が陰性であったことに基づく)

しかしながら、*Salmonella* の変異原性試験では、1-クロロ-4-ニトロベンゼンが *Salmonella* TA100 及び TA1535 で変異原性を示した (しかし TA98 やその他の菌株では変異原性を示さなかった)。この結果から、変異原性が 1-クロロ-4-ニトロベンゼンの腫瘍誘発作用機序の一つであったことが示唆されており、その変異原性パターンは、試験施設間で一貫した変異原性を示さず、またラット肝 S9 存在下の *Salmonella* TA98 でのみ再現性をもって変異原性を示す (19)、1-クロロ-4-ニトロベンゼンの代謝物である *p*-クロロアニリンとは異なっており、変異原性代謝物や機序に違いがあることが示唆される。*In vivo* 遺伝毒性データは、変異原性作用機序の可能性を評価するには不足している。

1-クロロ-4-ニトロベンゼンは変異原性を有し、変異原性作用機序を否定できないため、AI を算出した。

規制上の限度値や公表された限度値

例えば US EPA、WHO 又は Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR) により、規制上の限度値は公表されていない。

AI の算出

最も感受性の高い TD₅₀ は、雌ラットの副腎髄質褐色細胞腫に対するものである (9)。

生涯 AI = TD₅₀/50,000 × 50 kg

生涯 AI = 117 mg/kg/day /50,000 × 50 kg

生涯 AI = 117 µg/day

References

1. Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Zeiger E. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. Environ Mutagen 1983; 5 Suppl 1:1-142.
2. Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & information Center (JETOC). Japan: Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation system of the Industrial Safety and Health law. 2005 Addendum 3.
3. Kawai A, Goto S, Matsumoto Y, Matsushita H. Mutagenicity of aliphatic and aromatic nitro compounds. Sangyoigaku 1987; 29: 34-55.
4. NTP. Technical Report on Toxicity Studies on 2-Chloronitrobenzene and 4-Chloronitrobenzene (CAS Nos. 88-73-3 and 100-00-5) Administered by Inhalation to F344/N Rats and B6C4F1 Mice. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 1993; NTP TR33.
5. Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L. DNA damage induced *in vivo* in various tissues by nitrobenzene derivatives. Mutat Res 1983; 116:239-46.
6. Cesarone CF, Fugassa E, Gallo G, Voci A, Orunesu M. Influence of the culture time on DNA damage and repair in isolated rat hepatocytes exposed to nitrochlorobenzene derivatives. Mutat Res 1984; 131:215-22.
7. IARC. Printing processes and printing inks, carbon black and some nitro compounds. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. World Health Organization, Lyon. 1996. Vol. 65.
8. US Environmental Protection Agency (USEPA). Health Effects Assessment Summary Tables. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 1995; No. PB95-921199.
9. Matsumoto M., Aiso S, Senoh H, Yamazaki K, Arito H, Nagano K, et al. Carcinogenicity and chronic toxicity of *para*-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. J. Environ Pathol Toxicol Oncol 2006; 25:571-84.
10. Weisburger EK, Russfield AB, Homburger F, Weisburger JH, Boger E, Van Dongen, et al. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. J Environ Pathol Toxicol 1978; 2:325-56.
11. Schroeder RE, Daly JW. A chronic oral gavage study in rats with p-nitrochlorobenzene. Biodynamics Inc. 1984. Project No. 80-2487. NTIS/OTS 0536382.
12. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
13. Yoshida T, Andoh K, Tabuchi T. Identification of urinary metabolites in rats treated with *p*-chloronitrobenzene. Arch Toxicol 1991; 65: 52-8.
14. Bray HG, James SP, Thorpe WV. The metabolism of the monochloronitrobenzenes in the rabbit. Biochem J 1956; 64:38-44.
15. Yoshida T, Tabuchi T, Andoh K. Pharmacokinetic study of p-chloronitrobenzene in humans suffering

- from acute poisoning. Drug Metab Dispos 1993; 21: 1142-6.
16. IARC. Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1993; 57.
 17. Travlos GS, Mahler J, Ragan HA, Chou BJ, Bucher JR. Thirteen-week inhalation toxicity of 2- and 4-chloronitrobenzene in F344/N rats and B6C3F1 mice. Fundam Appl Toxicol 1996; 30:75-92.
 18. Greim H, Hartwig A, Reuter U, Richter-Reichel HB, Thielman HW. Chemically induced pheochromocytomas in rats: mechanisms and relevance for human risk assessment. Crit Rev Toxicol 2009; 39:695-718.
 19. WHO. CICAD 48: Concise International Chemical Assessment Document 48 *p*-Chloroaniline. Geneva. [Online]. 2003; Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad48.htm>

***p*-クレシジン (2-メトキシ-5-メチルアニリン、CAS# 120-71-8)**

ヒトへの曝露の可能性

曝露される可能性は工業的利用においてである。一般集団への曝露に関して入手可能なデータはない。

変異原性/遺伝毒性

p-クレシジンは *in vitro* で変異原性及び遺伝毒性を示し、*in vivo* でも不確実だが遺伝毒性を示す証拠がある。

p-クレシジンは以下において変異原性を示す：

代謝活性化系存在下における複数の *Salmonella* 株 (1、2、3)。

ラムダ cII 遺伝子を有する Big Blue トランスジェニックマウスモデル；がん原性試験の用量と同等である 0.25%及び 0.5%の *p*-クレシジン含有飼料による 180 日間の摂餌投与 (4)。

In vivo において、*p*-クレシジンはマウスの骨髄において小核を誘発せず (5、6、7)、また p53 ヘテロ接合マウス又はヌル欠損 (nullizygous) マウスの骨髄においても、小核の誘発はみられなかった (8)。p53 ヘテロ接合マウスを用いた別の試験で認められた小核の増加は、アニリンとその関連化合物によるメトヘモグロビン血症や再生性貧血の 2 次的変化である可能性がある (9)。

膀胱などの複数組織でアルカリ溶出試験による DNA 鎖切断はみられなかった (6、7) が、*p*-クレシジンのマウス経口投与コメットアッセイでは、その他の組織には無いが、膀胱粘膜で DNA 鎖切断が報告された (10)。

発がん性

IARC により、*p*-クレシジンはグループ 2B の発がん物質、おそらくヒトに対して発がん性を示すと分類されている (11)。

げっ歯類を用いた標準的なモデルでのがん原性試験は、1 組しかない。摂餌投与した Fischer 344 ラット及び B6C3F1 マウスの NTP 試験 (5) において、*p*-クレシジンは腫瘍を誘発した。他の曝露経路による発がん性データはない。

それぞれの動物種ごとに一群雌雄各 50 匹の動物が設定された群に、*p*-クレシジンを摂餌投与した。雌雄それぞれ 50 匹の対照群も設定した。*p*-クレシジンの濃度は餌中 0.5%又は 1.0%だったが、マウスでは 21 週間後に投与濃度が 0.15%及び 0.3%へ変更された。投与量を CPDB (12) で用いられる mg/kg/day に変換すると、雄ラットが 198 及び 368 mg/kg/day、雌ラットが 245 及び 491 mg/kg/day、雄マウスが 260 及び 552 mg/kg/day、雌マウスが 281 及び 563 mg/kg/day であった。

高用量の雄マウスを除き、投与された全動物は *p*-クレシジンが 104 週間摂餌投与され、さらに最大 2 週間追加観察された。高用量の雄マウスは全例、第 92 週終了時まで死亡した。いずれの動物種の雌雄においても、死亡率は用量と相関した。特定の腫瘍の発生率は高用量群より低用量群で高かったが、高用量群での死亡がより早期に発生していたことによるものだろう。

投与されたラットは両性ともに、膀胱癌 (乳頭癌、扁平上皮癌、移行上皮乳頭腫、移行上皮癌及び未分化癌を複合した発生率) 及び嗅神経芽細胞腫の統計学的に有意な発生率が認められた。低用量の雄ラットでは、肝臓の腫瘍性の結節、肝細胞癌、混合型肝癌・胆管癌を複合した発生率も有意であった。投与されたマウスでは雌雄いずれにおいても、膀胱癌の発生率 (癌、扁平上皮癌、移行上皮癌を複合した発生率) が有意であった。投与された雌マウスでは肝細胞癌の発生率が有意であった。

要約すると、*p*-クレシジンは Fischer 344 ラットに対して発がん性を示し、雌雄の膀胱癌及び乳頭腫、雌雄の嗅神経芽細胞腫、雄の肝腫瘍の発生率の上昇を引き起こした。*p*-クレシジンは B6C3F1 マウスでも発がん性を示し、雌雄の膀胱癌及び雌の肝細胞癌を誘発した。

*p*53 +/- ヘミ接合性マウスの短期発がんモデルでも、膀胱腫瘍の誘発がみられた。*p*-クレシジンはマウス発がん試験の施設間差を評価する大規模な試験で、陽性対照として使用された (13)。*p*-クレシジンが 400 mg/kg/day で 26 週間強制経口投与された 19 試験の内 18 試験及び摂餌投与された 1 試験で、膀胱腫瘍の増加が認められた。

p-Cresidine – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 5*	50/sex/ group B6C3F1 mice	2 year Feed	50	2: 0.5 and 1% Reduced after 21 wk to 0.15 and 0.3%. M: 260;552. F: 281; 563 mg/kg/d	Urinary bladder /Male	44.7
Ref. 5	50/sex/ group Fisher 344 rats	2 year Feed	50	0.5 and 1% M: 198;396. F: 245;491 mg/kg/d	Urinary bladder /Male	88.4

*Carcinogenicity study selected for AI calculation.
Studies listed are in CPDB (Ref. 12).

発がん性の機序

p-クレシジンは変異原性発がん物質であり、許容摂取量は TD₅₀ からの直線外挿により算出される。

規制上の限度値や公表された限度値

規制上の限度値は公表されていない。

許容摂取量 (AI)

AIを算出するための試験選択の根拠:

p-クレシジンのがん原性試験のうち唯一適切なものは、CPDB にて報告されている NCI/NTP (5) が実施した試験であった。最も感受性の高い TD₅₀ が雄マウスの膀胱腫瘍を指標としていたため、AIの算出にはマウスの試験を選択した。

AIの算出

NCI/NTP 試験において、雌雄のラット及びマウスの膀胱に対する TD₅₀ 値は最も感受性が高く、ラットの TD₅₀ は雌 110 mg/kg/day 及び雄 88.4 mg/kg/day、マウスの TD₅₀ は雌 69 mg/kg/day 及び雄 44.7 mg/kg/day だった。最も保守的な値は雄マウスで特定された値であった。

生涯 AI は次のように計算される。

$$\text{生涯 AI} = \text{TD}_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 44.7 \text{ mg/kg/day}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 45 \text{ }\mu\text{g/day}$$

References

1. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. *Salmonella* mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. Environ Mol Mutagen 1988; 11 Suppl 12:1-158.
2. Dunkel VC, Zeiger E, Brusick D, McCoy E, McGregor D, Mortelmans K, et al. Reproducibility of microbial mutagenicity assays: II. Testing of carcinogens and noncarcinogens in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Environ Mutagen 1985; 7 Suppl 5:1-248.
3. Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology and Information Center (JETOC); Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation of the Industrial Safety and Health law; 1997; Suppl.
4. Jakubczak JL, Merlino G, French JE, Muller WJ, Paul B, Adhya S et al. Analysis of genetic instability during mammary tumor progression using a novel selection-based assay for *in vivo* mutations in a bacteriophage λ transgene target. Proc Natl Acad Sci (USA) 1996; 93(17):9073-8.
5. NCI. Technical report on the Bioassay of *p*-cresidine for possible carcinogenicity. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 1979; TR 142.
6. Ashby J, Lefevre PA, Tinwell H, Brunborg G, Schmezer P, Pool-Zobel B, et al. The non-genotoxicity to rodents of the potent rodent bladder carcinogens *o*-anisidine and *p*-cresidine. Mutat Res 1991; 250:115-133.
7. Morita T, Norihide A, Awogi T, Sasaki Yu F, Sato-S-I, Shimada H, et al. Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Mutat Res 1997; 389:3-122.
8. Delker DA, Yano BL, Gollapudi BB. Evaluation of cytotoxicity, cell proliferation, and genotoxicity induced by *p*-cresidine in hetero- and nullizygous transgenic p53 mice. Toxicol Sci 2000; 55:361-9.
9. Stoll RE, Blanchard KT, Stoltz JH, Majeski JB, Furst S, Lilly PD et al. Phenolphthalein and nisacodyl: Assessment of genotoxic and carcinogenic responses in heterozygous p53^(+/-) mice and Syrian Hamster Embryo (SHE) assay. Toxicol Sci 2006; 90:440-50.
10. Sasaki YF, Nishidate E, Su YQ, Matsusaka N, Tsuda S, Susa N, et al. Organ-specific genotoxicity of the potent rodent bladder carcinogens *o*-anisidine and *p*-cresidine. Mutat Res 1998; 412:155-60.
11. IARC. *para*-Cresidine. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. World Health Organization, Lyon. 1982; 27: 92. reviewed in Suppl 7 1987.
12. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
13. Storer RD, French JE, Haseman J, Hajian G, LeGran EK, Long GD, et al. p53^{+/-} hemizygous knockout mouse: Overview of available data. Toxicologic Pathol. 2001; 29 Suppl:30-50.

ジメチルカルバミルクロリド (CAS# 79-44-7)

ヒトへの曝露の可能性

工業的利用において曝露する可能性がある。一般集団の曝露に関する入手可能なデータはない。

変異原性/遺伝毒性

ジメチルカルバミルクロリド (DMCC) は *in vitro* 及び *in vivo* で変異原性及び遺伝毒性があると考えられる。

DMCC は以下において変異原性を示す。：

代謝活性化の有無を問わず、*Salmonella typhimurium* TA100、TA1535、TA1537、TA98 及び TA1538 で陽性 (1、2)。

In vivo において、小核試験で陽性結果が得られた (3)。

発がん性

IARC により、DMCC はグループ 2A の化合物、ヒトに対して発がん性がある可能性が高いと分類されている (4)。

6か月から12年までの範囲で曝露された労働者の小規模試験ではがんによる死亡は報告されず、DMCC のヒトでの発がん性を示す証拠は不十分である。げっ歯類では DMCC が腫瘍を誘発する証拠がある。

経口投与による試験が実施されていないため、AI を求めるための試験として吸入及び腹腔内投与試験を用いた。

シリアンゴールデンハムスターに 1 ppm の DMCC を 1 日 6 時間、週 5 日、寿命を迎えるか瀕死のため屠殺されるまで、吸入により曝露した (5)。55% の動物に鼻腔の扁平上皮癌がみられたのに対し、背景値としてのハムスターでは自然発生の鼻腫瘍はみられなかった。早期死亡を考慮した場合、腫瘍を有する動物の割合は 75% と計算された (5)。

雌 ICR/Ha Swiss マウスを用い、皮膚塗布、皮下投与及び腹腔内 (i.p.) 投与により、DMCC の発がん作用を試験した (6；この試験を AI 算出に選択した)。皮膚塗布では、DMCC 2 mg を週 3 回 492 日間投与したところ、マウス 50 匹中 40 匹に乳頭腫、50 匹中 30 匹に癌腫を誘発することがわかった。5 mg/週の用量で週 1 回の皮下投与を 427 日間継続した。皮下投与後、マウス 50 匹中 36 匹で肉腫、50 匹中 3 匹で扁平上皮癌を認めた。i.p. 投与試験では、マウスに DMCC 1 mg を週 1 回、450 日間投与した場合、30 匹中 14 匹で肺の乳頭腫瘍、30 匹中 9 匹で局所悪性腫瘍 (30 匹中 8 匹は肉腫) が誘発された。対照群では、皮膚塗布では腫瘍がみられず、皮下投与では 50 匹中 1 匹に肉腫がみられ、i.p. 投与では 30 匹中 1 匹に肉腫及び 30 匹中 10 匹に肺の乳頭腫瘍がみられた。全体として、対照と比較して局所 (注射部位の) 腫瘍のみが有意に増加し、遠隔部位の腫瘍は有意に増加していなかった。

Dimethylcarbonyl chloride – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Tumors observation	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 6*	30 female ICR/Ha Swiss mice	64 weeks Once/wk Intra- peritoneal	30	1: 1 mg 5.71 mg/kg/d	Injection site: malignant tumors/Female	4.59 ^{AAA}
Ref. 5**	99 male Syrian golden hamsters	Lifetime 6 h/d, 5 d/wk Inhalation	50 sham treated 200 untreated	1: 1 ppm 0.553 mg/kg/d	Squamous cell carcinoma of nasal cavity	0.625
Ref. 6	50 female ICR/Ha Swiss mice	70 weeks 3 times/wk Skin	50	1: 2 mg	Skin: Papillomas and carcinomas/ Female	NA [^]
Ref. 6	50 female ICR/Ha Swiss mice	61 weeks Once/wk Subcutaneous	50	1: 5 mg	Injection site: Fibrosarcomas; Squamous cell carcinomas/ Female	NA [^]
Ref. 7	Male Sprague- Dawley rats	6 weeks 6 h/d, 5 d/wk Inhalation; examined at end of life	Yes	1: 1 ppm	Nasal tumors/Male	NA ^{AAAA}
Ref. 8	30 - 50 female ICR/Ha Swiss mice	18-22 mo 3 times/wk Skin	Yes	2: 2 and 4.3 mg	Skin. Mainly skin squamous carcinoma/Fema le	NA [^]
Ref. 8	Female ICR/Ha Swiss mice	18-22 mo Once/wk Subcutaneous	Yes	1: 4.3 mg	Site of administration. Mainly sarcoma. Hemangioma, squamous carcinoma and papilloma also seen/Female	NA ^{AA}
Ref. 8	Female ICR/Ha Swiss mice	12 mo; Once/wk Subcutaneous examined at end of life	Yes	2: 0.43 and 4.3 mg		NA ^{AA}

Studies listed are in CPDB (Ref. 9) unless otherwise noted.

*Carcinogenicity study selected for non-inhalation AI.

**Carcinogenicity study selected for inhalation AI.

NA= Not applicable

[^]Did not examine all tissues histologically. Subcutaneous and skin painting studies are not included in CPDB as route with greater likelihood of whole body exposure is considered more valuable.

^{^^}Subcutaneous and skin painting studies are not included in CPDB as route with greater likelihood of whole body exposure is considered more valuable.

^^^Histopathology only on tissues that appeared abnormal at autopsy.

^^^^Examined only for nasal cancer. Does not meet criteria for inclusion in CPDB of exposure for at least one fourth of the standard lifetime.

規制上の限度値や公表された限度値

規制上の限度値は公表されていない。

許容摂取量 (AI)

上記のデータに基づき、DMCCは変異原性発がん物質と考えられる。その結果、許容リスク用量を算出するには、がん原性試験で最も感受性の高いTD₅₀からの直線外挿が適切な方法である。DMCCは接触部位での発がん物質と考えられるため、吸入曝露については他の曝露経路とは別のAIを算出するのが適切であった。

経口投与による情報は入手できないため、吸入以外の曝露経路については、腹腔内投与した Van Duurenら (6) の試験を用いた。混合腫瘍の発生率を根拠とした場合、TD₅₀は4.59 mg/kg/day (CPDB) であった。

生涯 AI は、以下のとおり算出される。

$$\text{生涯 AI} = \text{TD}_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 4.59 \text{ mg/kg/day}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 5 \text{ } \mu\text{g/day}$$

吸入 AI

吸入 AI は、以下のとおり算出される。

DMCCの吸入後はハムスターの鼻癌が最も感受性の高い評価項目であり、TD₅₀は0.625 mg/kg/dayであった。

$$\text{生涯 AI} = \text{TD}_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 0.625 \text{ mg/kg/day}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯吸入 AI} = 0.6 \text{ } \mu\text{g/day}$$

References

1. Dunkel V, Zeiger E, Brusick D, McCoy E, McGregor D, Mortelmans K, *et al.* Reproducibility of microbial mutagenicity assays. I. Tests with *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* using a standardized protocol. *Environ Mutagen* 1984; 6 Suppl 2: 1-251.
2. Kier LD, Brusick DJ, Auletta AE, Von Halle ES, Brown MM, Simmon VF, *et al.* The *Salmonella typhimurium*/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1986; 168: 69-240.
3. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavourmin K, MacGregor JT, Newell GW, *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1983; 123:61-118.
4. IARC. Monographs on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva:

- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. [Online] 1972-PRESENT. (Multivolume work). 1999; 71:539. Available from: URL: <http://monographs.iarc.fr/index.php>
5. Sellakumar AR, Laskin S, Kuschner M, Rush G, Katz GV, Snyder CA, et al. Inhalation carcinogenesis by dimethylcarbamoyl chloride in Syrian golden hamsters. *J Environ Pathol Toxicol* 1980; 4:107-15.
 6. Van Duuren BL, Goldschmidt BM, Katz C, Seidman 1770 I, Paul JS. Carcinogenic activity of alkylating agents. *J Natl Cancer Inst* 1974; 53:695-700.
 7. Snyder CA, Garte SJ, Sellakumar AR, Albert RE. Relationships between the levels of binding to DNA and the carcinogenic potencies in rat nasal mucosa for three alkylating agents, *Cancer Lett* 1986 33, 175-81.
 8. Van Duuren BL, Melchionne S, Seidman I. Carcinogenicity of acylating agents: chronic bioassays in mice and Structure-Activity Relationships (SARC). *J Am Col Toxicol* 1987; 6: 479-487.
 9. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>

硫酸ジメチル (CAS# 77-78-1)

ヒトへの曝露の可能性

US EPA により集計された、ある単一箇所における 1983 年の大気データに基づく、硫酸ジメチル (DMS) の平均大気濃度は 1 立方メートルにつき 7.4 µg 又は 1.4 ppb である (1)。

変異原性/遺伝毒性

DMS は *in vitro* 及び *in vivo* で変異原性及び遺伝毒性を示す (2)。

DMS は以下で変異原性を示した。

細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames) において、代謝活性化の有無にかかわらず、*Salmonella typhimurium* 株の TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び TA1538 で変異原性を示した (3)。

In vivo において、DMS はアルキル化された DNA 塩基を形成し、複数の遺伝毒性試験で一貫して陽性である (4)。DMS に曝露された作業者の体内を循環するリンパ球において、染色体異常の増加が認められている (4)。

発がん性

IARC により、DMS はグループ 2A の発がん物質、ヒトに対しておそらく発がん性があると分類されている (4)。

DMS に関する疫学的研究報告は入手できなかったが、ヒトへの曝露と気管支癌の関連を示す症例が少数報告されている。DMS は、動物において慢性及び亜慢性の吸入投与、あるいは単回又は複数回の皮下投与により発がん性を示すが、経口で曝露させた試験は行われていない。DMS はラット、マウス及びハムスターで発がん性を示す (4)。さまざまな理由により、DMS のがん原性試験は限られており、DMS が発がん性データベース (CPDB) に記載されていないのはおそらくこのためである。DMS の発がん性を評価している試験について、以下に述べる (US EPA、5から引用)。

DMS- Details of carcinogenicity studies

Study	Animals	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Tumor observations	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 6	Golden hamsters, Wistar rats, and NMRI mice male and female (number not clearly specified)	15 mo 6 h/d, 2 d/wk followed by 15 mo observation period Inhalation	Yes	2: 0.5; 2.0 ppm	Tumors in lungs, thorax and nasal passages at both doses	NA [^]
Ref. 7	20-27 BD rats Sex not specified	130 days 1 h/d, 5 d/wk followed by 643 day observation period Inhalation	No	2: 3; 10 ppm	Squamous cell carcinoma in nasal epithelium at 3 ppm. Squamous cell carcinomas in nasal epithelium and lympho-sarcoma in the thorax with metastases to the lung at 10 ppm.	NA ^{^^}
Ref. 8	8-17 BD Rats Sex not specified	394 days The duration of the study was not reported but mean tumor induction time was 500 days Subcutaneous	No	2: 8; 16 mg/kg/wk	Injection-site sarcomas in 7/11 at low dose and 4/6 at high dose; occasional metastases to the lung. One hepatic carcinoma.	NA ^{^^^}
Ref. 7	15 BD Rats Sex not specified	Up to 740 day evaluation Following single injection Subcutaneous	No	1: 50 mg/kg	Local sarcomas of connective tissue in 7/15 rats; multiple metastases to the lungs in three cases	NA ^{^^^}
Ref. 7	12 BD rats Sex not specified	800 days Once/wk Intravenous	No	2: 2; 4 mg/kg	No tumors reported	NA ^{^^^}
Ref. 7	8 BD rats (pregnant females)	1 year offspring observation following single dose, gestation day 15 Intravenous	No	1: 20 mg/kg	4/59 offspring had malignant tumors of the nervous system while 2/59 had malignant hepatic tumors.	NA ^{^^^}
Ref. 9	90 female CBAX57 Bl/6 mice	Duration not reported 4 h/d, 5 d/wk Inhalation	Not indicated	3: 0.4; 1; 20 mg/m ³	Increase in lung adenomas at high dose	NA [*]
Ref. 10	20 ICR/Ha	475 days	Not	1:	No findings	NA ^{**}

Study	Animals	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Tumor observations	TD ₅₀ (mg/kg/d)
	Swiss mice [‡]	3 times/wk Dermal	indicated	0.1 mg		

Studies listed are in not in CPDB.

NA = Not applicable

[^] Control data not reported. Tumor incidences not tabulated by species or dose.

^{^^} Small group size. No concurrent control group. One rat at high dose had a cerebellar tumor and two at low dose had nervous system tumors which are very rare and distant from exposure.

^{^^^} Small group size, no concurrent control group.

^{^^^^} No concurrent control group.

* Duration not reported

** Limited number of animals. Only one dose tested. Even when DMS was combined with tumor promoters no tumors were noted.

[‡] Sex not specified

発がん性の作用機序

硫酸ジメチルは変異原性発がん物質であり、許容摂取量は TD₅₀ からの直線外挿により算出される。

規制上の限度値や公表された限度値

欧州連合 (EU) の健康・消費者保護研究所 (ECHA、11) は、DMS の吸入投与による発がん性データに基づき、発がん性スロープ曲線を作成した。ECHA は、ラットの吸入試験 (7) から、T₂₅ (腫瘍が 25% 増加する用量) を推定した。この限られたがん原性試験では、全身作用 (神経系) 及び局所の鼻腫瘍が認められた。しかしながら、表に記載した他の試験と同様に、死亡率が高く、対照動物がなく、投与群が 2 群しかなく、病理学的評価が最小限であるといった極めて限られたものであったため、直線外挿には不適切であった。

許容摂取量 (AI)

DMS は経口発がん物質である可能性があり、おそらくヒトの発がん物質であると考えられるが、TD₅₀ 値を算出する根拠とすべき経口投与によるがん原性試験が存在しない。さらに、さまざまな理由により入手可能な吸入投与試験は少なく、TD₅₀ の外挿に適していない。これらのことから、DMS の限度を一生の毒性的懸念の閾値 (TTC) である 1.5 µg/day とするのが妥当である。

生涯 AI = 1.5 µg/day

References

1. US EPA. Health and Environmental effects profile for dimethyl sulfate. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH for the Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC. 1985.
2. Hoffmann GR. Genetic effects of dimethyl sulfate, diethyl sulfate, and related compounds. *Mutat Res* 1980; 75:63-129.
3. Skopek TR, Liber HL, Kaden DA, Thilly WG. Relative sensitivities of forward and reverse mutation assays in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:4465-9.
4. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenicity Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1999; 71: 575.
5. US Environmental Protection Agency. Dimethyl sulfate (CASRN 77-78-1). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1988. Available from: URL:

https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0365_summary.pdf#nameddest=woe

6. Schlogel FA, Bannasch P. Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Inhaled Dimethyl Sulfate. (In German) (Inaugural Dissertation) Julius-Maximilians University, Würzburg 1972. (data in Ref. 11).
7. Druckrey H. Carcinogenic alkylating compounds: III. Alkyl halogenids, sulfates, sulfonates, and heterocyclics. (Article in German) Z. Krebsforsch 1970; 74:241-273.
8. Druckrey H. Carcinogenic alkylating compounds: I. Dimethyl sulfate, carcinogenic effect in rats and probable cause of occupational cancer. (Article in German) Z. Krebsforsch 1966; 68:103-111.
9. Fomenko VN, Katasova LD, Domshlak MG (1983); USSR Minist Health All-Union Sci Soc Med Genet 1:348-49 as cited in WHO; Environ Health Criteria 1985; Dimethyl Sulfate p.36
10. Van Duuren BL, Goldschmidt BM, Katz C, Seidman I, Paul JS. Carcinogenic activity of alkylating agents. J Natl Cancer Inst 1974; 53:695-700.
11. ECHA (European Chemical Agency). European Union Risk Assessment Report: Institute for Health and Consumer Protection. Dimethyl Sulphate. [Online]. 2002 Vol. 12. Available from: URL: <http://echa.europa.eu/documents/10162/3d2e4243-8264-4d09-a4ab-92dde5abfadd>

塩化エチル (クロロエタン、CAS# 75-00-3)

ヒトへの曝露の可能性

汚染された大気や飲料水から低レベル (1兆分の1程度) の曝露。局所麻酔剤としての皮膚接触。

変異原性/遺伝毒性

塩化エチルは *in vitro* で変異原性及び遺伝毒性を示すが、*in vivo* ではこれらを示さない。IARC (1) が塩化エチルの変異原性データを概説しており、ここに主要な点を纏める。

塩化エチルは以下において変異原性を示す：

ガス状態での曝露が可能な条件下で試験した場合に、代謝活性化系存在下及び非存在下における *Salmonella typhimurium* TA100及びTA1535、*E. coli* WP2 *uvrA*での細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames試験) (2、3、4)。

代謝活性化系存在下及び非存在下におけるCHO細胞を用いた *hprt*試験。

*In vivo*において、約25,000 ppm、3日間吸入したマウスの骨髄小核試験、及び雌マウスを用いた肝不定期DNA合成 (UDS) 試験で、塩化エチルは陰性であった (5)。

発がん性

IARCにより、塩化エチルはクラス3化合物、発がん性は分類不能と指定された (1)。

塩化エチルについては、雌雄のラット及びマウスを用い、吸入により1日6時間、週5日100週間投与したNTPの試験 (6) が唯一のがん原性試験である。安全性上の懸念 (爆発の危険性)、および19,000 ppmまで投与した3カ月間の用量設定試験において明らかな変化は認められなかったことから、1回の曝露濃度 (15,000 ppm) は制限された。これらのデータはその後、US EPA (7) により発表され、塩化エチルを臭化エチルと比較した。塩化エチルの注目すべき点は、臭化エチルと構造的に類似していることに加え、稀な腫瘍である子宮腫瘍 (子宮内膜癌) をマウスにおいて多数誘発し、ラットにおいては誘発しないことだった。塩化エチルは、雌マウスにおいて発がん性 (子宮) の明らかな証拠を示したが、雌雄ラットにおいて発がん性の証拠は曖昧であった。雄マウスの試験は、肺腫瘍の発生率上昇が認められたものの、生存率が低かったため不適切と考えられた。

Ethyl Chloride – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 6, 7*	50/sex/ group B6C3F1 mice	100 weeks 6 h/d, 5 d/wk Inhalation	50	1: M: 10.4 F: 12.4 g/kg/d	Uterus/Female	1810
Ref. 6, 7	50/sex/ group Fischer 344 rats	100 weeks 6 h/d, 5 d/wk Inhalation	50	1: M: 2.01 F: 2.88 g/kg/d	Negative	NA

*Carcinogenicity study selected for AI calculation. Studies listed are in CPDB (Ref. 8).

NA = Not applicable

発がん性の作用機序

Holder (7) は、反応性代謝物が発がん性に寄与している可能性を提案しているが、雌マウスはがん原性試験に用いられた高濃度の塩化エチルの曝露に対して著しいストレス反応を有している

ことに言及しており、そのようなストレスは副腎を刺激することが示唆されている。高レベルのコルチコステロイド産生がマウスにおいて子宮内膜癌を促進しうることが提案された。

規制上の限度値や公表された限度値

US EPA は非発がん性作用の吸入標準濃度 (RfC) を 10 mg/m^3 とし、呼吸量が $28,800 \text{ L/day}$ と仮定した場合には 288 mg/day と定めた (9)。

許容摂取量 (AI)

AI を計算するための試験選択の根拠

試験のデザイン (投与群が 1 群) は頑健ではないが、マウスにおいて、稀な種類の腫瘍である子宮内膜に由来する子宮癌が高発 (対照群では 49 匹中 0 匹だったのに対し 50 匹中 43 匹に発症) していることは、塩化エチルの強い発がん反応を示唆している。この観察結果は、同じタイプの腫瘍 (マウス子宮腫瘍) がより頑健ながん原性試験 (3 用量及び対照群) で評価された比較分子である臭化エチルで見られた事実により支持されている (10)。

塩化エチルは変異原性発がん物質と考えられている。NTP の吸入試験に基づくと、最も感受性の高い動物種及び部位は雌マウスの子宮である。腫瘍の発生数が多いことから、1 用量のみの試験であるものの TD_{50} を計算することは可能である。CPDB (8) の著者は 0 及び $15,000 \text{ ppm}$ という表示を、0 及び 12.4 g/kg という用量に変換し、マウスの子宮腫瘍について TD_{50} が 1810 mg/kg/day と計算した。

$$\text{生涯 AI} = \text{TD}_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 1810 \text{ mg/kg/day}/50,000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{生涯 AI} = 1,810 \text{ } \mu\text{g/day}$$

References

1. IARC. Chloroethane. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1999; 71: 1345.
2. Goto S, Shiraishi F, Tanabe K, Endo O, Machii K, Tezuka Y, et al. Mutagenicity Detection Method for Vinyl Chloride and Vinylidene Chloride Gases. *Kankyo Kagaku* 1995; 5(2):235-40.
3. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. *Salmonella* mutagenicity tests. V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1992; 19 Suppl 21:2-141.
4. Araki A, Noguchi T, Kato F, Matsushima T. Improved method for mutagenicity testing of gaseous compounds by using a gas sampling bag. *Mutat Res* 1994; 307(1):335-44.
5. Ebert R, Fedtke N, Certa H, Wiegand HJ, Regnier JF, Marshall R, et al. SW. Genotoxicity Studies With Chloroethane. *Mutat Res* 1994; 322(1):33-43.
6. NCI/NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of chloroethane. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. NTP TR-346 1989. [Online]. 1989; Available from: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr346.pdf
7. Holder JW. Analysis of Chloroethane Toxicity and Carcinogenicity Including a Comparison With Bromoethane. *Toxicology and Industrial Health* 2008; 24(10):655-675.

8. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
9. US Environmental Protection Agency. Ethyl Chloride (CAS# 75-00-3). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online] 1991. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=523
10. NTP. Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of Ethyl Bromide. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. NTP TR 363. [Online]. 1989; Available from: URL: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr363.pdf

グリシドール (CAS# 556-52-5)

ヒトへの曝露の可能性

グリセロールや砂糖の加熱はグリシドール形成を引き起こす。グリシドールは3-モノクロロプロパン-1, 2-ジオールの代謝産物であり、これは醤油や植物タンパク質加水分解物などの多くの食品や食品添加物に含まれているクロロプロパノールである。食品中のグリシドールの仮定上の1日曝露量は20~80 µg/dayと概算されている (1)。

変異原性/遺伝毒性

グリシドールは *in vitro* 及び *in vivo* で変異原性及び遺伝毒性がある。

グリシドールの変異原性/遺伝毒性データを IARC (2) 及び CCRIS (3) が概説しており、ここに主要な結論を纏める。

グリシドールは以下において変異原性を示す：

ラット肝 S9 代謝活性化系の有無を問わず、標準的なプレート法及びプレインキュベーション法における、*Salmonella* 株 TA100、TA1535、TA98、TA97 及び TA1537 での細菌を用いた復帰突然変異試験試験 (Ames)。

ラット肝S9の有無を問わず、プレインキュベーション試験での*Escherichia coli*株 WP2uvrA/pKM101。

*In vivo*では、雌雄P16Ink4a/p19Arfハプロ不全マウスでの強制経口投与によるマウス小核試験で、グリシドールは陽性であった。

発がん性

IARCにより、グリシドールはグループ 2A、ヒトに対して発がん性がある可能性が高いと分類されている (2)。

NTP の試験 (4、5) では、グリシドールを水に溶解して、雌雄 F344/N ラット及び雌雄 B6C3F1 マウスの群へ強制経口投与した。ラットには1日 0、37.5、75 mg/kg、マウスには1日 0、25、50 mg/kg を、週 5 日で 2 年間投与した。平均 1 日投与量は、週 5 日の投与スケジュールであったことを考慮して投与量に 5/7 を掛け、生涯より短い投与期間であったことを考慮して 103/104 を掛けて計算した。その結果得られた平均 1 日投与量は、雌雄ラットでは 0、26.5、53.1 mg/kg/day、雌雄マウスでは 0、17.7、35.4 mg/kg/day だった。

グリシドールへの曝露は、ラット及びマウスのさまざまな組織 (ラットでは雌の乳腺腫瘍、マウスではハーダー腺) において、用量に関連した腫瘍の発生率上昇と関連していた。腫瘍性疾患が早期に誘発されたため、投与群のラット及びマウスの生存率は対照群と比較して著しく低下した。

ハムスターでの強制経口投与試験は、小さいグループサイズ、単回投与での曝露量、短い投与期間のために頑健性が低かった。NTPがさらにグリシドールを用いた強制経口投与慢性試験を、2つの癌抑制遺伝子が欠損した遺伝子組換えマウス (すなわち、ハプロ不全のp16Ink4a/p19Arfマウス) を用いて実施した (6)。雄では発がん作用を示す明らかな証拠 (組織球形肉腫及び肺胞・細気管支腺腫の発生に基づく) が、雌マウスでは発がん作用を示すある程度の証拠 (肺胞・細気管支腺腫の発生に基づく) が存在するが、試験期間が短いこと、投与群あたりの使用動物数が少ないこと、遺伝子組換え動物で観察された用量反応関係が標準的な長期発がん性バイオアッセイで観察された用量反応関係とどの程度一致するかに関する理解が限られていることから、これらの試験は2年間のバイオアッセイ (5) よりも用量反応の評価に適していないと考えられる (7)。

Glycidol – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 5*	50/sex/ group F344/N rats	2 years 5 days/wk Oral gavage	50	2 : 26.5; 53.8 mg/kg/d	Mammary gland /Female	4.15
Ref. 5	50/sex/ group B6C3F1 mice	2 years 5 days/wk Oral gavage	50	2: 17.7; 35.4 mg/kg/d	Harderian gland /Female	32.9
Ref. 8	12-20/sex/ group Syrian Golden Hamsters	60 weeks Twice/wk Gavage	Yes	1: M: 15.8 F: 17.9 mg/kg/d	Spleen/Female	56.1 [^]
Ref. 9 (*Cited in Ref. 2)	20 ICR/Ha Swiss mice	520 days 3 times/wk Skin Painting	Yes	1: 5%	No Tumors	NA [^]

Studies listed are in CPDB (Ref. 10) unless otherwise noted.

*Carcinogenicity study selected for AI calculation.

**Not in CPDB.

NA= Not applicable.

[^]Not a standard carcinogenicity design. Only one dose, intermittent dosing, and small sample size (Ref. 7).

発がん性の作用機序

グリシドールは変異原性発がん物質であり、許容摂取量は TD50 からの直線外挿により算出される。

規制上の限度値や公表された限度値

例えば US EPA、WHO 又は ATSDR により、規制上の限度値は公表されていない。

許容摂取量 (AI)

AI算出のための試験選択の根拠:

ヒトの発がんの可能性に関する評価に最適な発がん性データは、NTPがF344/Nラット及びB6C3F1マウスで実施した2年間の経口投与試験に由来する (5)。最も感受性の高い臓器部位は雌の乳腺であり、TD₅₀は4.15 mg/kg/dayだった。

AIの算出

生涯 AI = TD₅₀/50,000 × 50 kg

生涯 AI = 4.15 (mg/kg/day)/50,000 × 50 kg

生涯 AI = 4 µg/day

References

1. Bakhiya N, Abraham K, Gürtler R, Appel KE, Lampen A. Toxicological assessment of 3-

- chloropropane-1,2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55:509-21.
2. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. [Online]. 1972-PRESENT. (Multivolume work). 2000; 77:469; Available from: URL: <http://monographs.iarc.fr/index.php>.
 3. CCRIS. Chemical Carcinogenesis Research Information System. National Library of Medicine. [Online]. 2013. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> and search on CAS number.
 4. Irwin RD, Eustis SL, Stefanski S, Haseman JK. Carcinogenicity of Glycidol in F344 rats and B6C3F1 mice. *J Appl Toxicol* 1996; 16 (3):201-9.
 5. NTP. Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of glycidol (CAS No. 556-52-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 1990. NTP TR 374.
 6. NTP. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Glycidol (CAS No. 556-52-5) in genetically modified haploinsufficient p16 (Ink4a)/p19 (Arf) mice (gavage study). *Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep* 2007; 13:1-81.
 7. California Environmental Protection Agency (CalEPA). No Significant Risk Level (NSRL) for the Proposition 65 carcinogen Glycidol. [Online]. 2010. Available from: URL: http://www.oehha.ca.gov/prop65/CRNR_notices/pdf_zip/GlycidolNSRL073010.pdf
 8. Lijinsky W, Kovatch RM. A study of the carcinogenicity of glycidol in Syrian hamsters. *Toxicol Ind Health* 1992; 8(5):267-71.
 9. Van Duuren BL, Langseth L, Goldschmidt BM, Orris L. Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds. VI. Structure and carcinogenic activity. *J Natl Cancer Inst* 1967; 39:1217-28.
 10. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>

ヒドラジン (CAS# 302-01-2)

ヒトへの曝露の可能性

ヒドラジンは、医薬品、農薬及び発泡プラスチックの合成に使用されている (1)。硫酸ヒドラジンは、結核、鎌状赤血球貧血、その他の慢性疾患の治療に使用されている (2)。ヒドラジンやその誘導体の自然発生に関する情報は限られている (3)。ヒトは水や空気、土壌の環境汚染によりヒドラジンに曝露されるおそれがあるが (1)、主なヒトへの曝露源は労働現場である (4)。タバコ製品やタバコの煙においても少量のヒドラジンの発生が報告されている (1、5)。

変異原性/遺伝毒性

ヒドラジンは*in vitro*及び*in vivo*で変異原性及び遺伝毒性がある。ヒドラジンの変異原性はIARCにおいて概説されている (6)。主要な結果を次に示す。

ヒドラジンは下記の条件で変異原性を示す：

代謝活性化系の存在下及び非存在下の*Salmonella typhimurium*株のTA1535、TA102、TA98及びTA100、並びに*Escherichia coli*株のWP2uvrAを用いた細菌を用いる復帰突然変異試験 (Ames) *tk*及び*hprt*遺伝子を対象とした*in vitro*マウスリンフォーマL5178Y細胞

*In vivo*では、マウス骨髄において染色体異常を誘発しなかったが、小核を誘発した (6)。*In vivo*の幾つかの組織においてDNA付加体が報告されている。

発がん性

ヒドラジンは、IARCによりグループ 2B、すなわちヒトに対しておそらく発がん性があると分類されており (6)、US EPAによりグループ B2、すなわちヒトへの発がん物質である可能性が高いと分類されている (7)。

CPDB (8) ではヒドラジンを用いたがん原性試験が7試験引用されており、投与期間が1年の試験を含めて3試験が吸入、3試験が飲水、1試験が強制経口投与によるものである。原文の著者によれば、これら7試験のうち5試験でヒドラジンは発がん性が陽性と判断された。

げっ歯類において、ヒドラジンの経口投与による発がん性の主な標的臓器は肝臓及び肺である。群数及び投与量に基づくと最も頑健な経口投与試験は、文献 9 及び 10 において報告された。最も頑健な吸入投与試験の中で、TD₅₀の最小値を示す試験は、文献 11 において報告された。げっ歯類において、ヒドラジンの吸入投与による発がん性に対し最も感受性の高い標的は、鼻腔や肺のような最初の接触部位である。

CPDB 内の実施された硫酸ヒドラジンの試験 (8) は、1群当たり動物数が50匹未満 (かつ、ある事例では投与量が1用量だけ) であり、またそれらの試験で算出されたTD₅₀は、飲水投与試験 (9) の値より高かった (発がん性が弱かった) ため、ここには示していない。2つの飲水投与試験 (9、10) の結果の間に類似性があることを考慮し、より高用量でより最近に実施された試験 (10) を、AI計算のための非吸入試験として選択した。

Hydrazine – Details of carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/type/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 9	50/sex/ group Wistar rats	Lifetime Drinking water	50	3: M: 0.1; 1.5, 2.5. F: 0.11, 0.57, 2.86 mg/kg/d	Liver/Female	41.6
Ref. 11*	100/sex/ group F344 rats	1 year with 18 mo observation Inhalation	150	4: M: 1.37, 6.87, 27.5, 137 F: 1.96, 9.81, 39.3, 196 µg/ /kg/d	Nasal adenomatous polyps/Male	0.194
Ref. 12	50/sex/ group Bor:NMRI, SPF-bred NMRI mice	2 year Drinking water	50	3: M: 0.33, 1.67, 8.33. F: 0.4, 2.0, 10.0 mg/kg/d	Negative	NA, negative study
Ref. 11	200 male Golden Syrian hamsters	1 year with 12 mo observation Inhalation	Yes	3: 0.02, 0.08, 0.41 mg/kg/d	Nasal adenomatous polyps/Male	4.16
Ref. 11	400 female C57BL/6 Mice	1 year with 15 mo observation Inhalation	Yes	1: 0.18 mg/kg/d	Negative	NA
Ref. 13	50/sex/ group Swiss mice	Lifetime Drinking water	Not concurrent	1: ~1.7-2 mg/kg/d	Lung/Male	2.20 [‡]
Ref. 14	25 female Swiss mice	40 weeks 5 d/wk Gavage	85 Untreated	1: ~5 mg/kg/d	Lung/Female	5.67 ^{‡‡}
Ref. 10 ^{***}	50/sex/ F344/DuCr j rats	Lifetime Drinking water	Yes	3: M: 0.97, 1.84, 3.86 F: 1.28, 2.50, 5.35 mg/kg/d	Liver/Female	38.7
Ref. 10 [^]	50/sex Crj:BDF1 mice	Lifetime Drinking water		3: M: 1.44, 2.65, 4.93 F: 3.54, 6.80, 11.45 mg/kg/d	Liver/Female	52.4

Studies listed are in CPDB (Ref. 8).

*Carcinogenicity study selected for inhalation AI calculation.

**Carcinogenicity study selected for non-inhalation TD₅₀ (see Note 2) and AI calculations.

NA= Not applicable.

[‡] Excluded by US EPA (Ref. 7); no concurrent controls. Liver negative.

^{‡‡} Animal survival affected. Liver negative.

^Not in CPDB

発がん性の作用機序

不明。In vivo で DNA 付加体が検出されたが (15、16、17、18、19、20)、腫瘍形成には至らない組織において報告されており、DNA 付加体が発がん性に貢献するかは明らかになっていない。

規制上の限度値や公表された限度値

US EPA (7) は、mg/kg/day あたりの経口スロープファクターを 3.0、 $\mu\text{g/L}$ 当たりの飲水ユニットリスクを 8.5×10^{-5} と公表している。10 万分の 1 のリスクレベルの場合、これは水中での $0.1 \mu\text{g/L}$ の濃度のヒドラジン、あるいは体重 50 kg のヒトに対する $0.2 \mu\text{g/day}$ 程度に等しい。この限度値は、硫酸ヒドラジンを複数用量の強制経口投与試験 (21) における肝細胞癌の所見から多段階で直線外挿した結果に基づいている。この試験ではマウスに 25 週間ヒドラジン硫酸を投与した後、生涯観察された (7)。追加で試験が特定され、経口スロープファクターが計算された後に公表された (9、10、17、22)。これら試験により経口スロープファクターに変更が生じる可能性があるが、US EPA による再評価は行なわれていない。

US EPA (7) はまた、mg/kg/day あたりの吸入スロープファクターを 17、 $\mu\text{g/m}^3$ 当たりの吸入ユニットリスクを 4.9×10^{-3} と公表している。10 万分の 1 のリスクレベルでは、これは $2 \times 10^{-3} \mu\text{g/m}^3$ という大気中ヒドラジン濃度、あるいはヒトの呼吸量を $20 \text{ m}^3/\text{day}$ と仮定した場合の $0.04 \mu\text{g/day}$ に等しい。この限度値は、複数用量の吸入試験における雄ラットの鼻腔腺腫又は鼻腔腺癌の所見から多段階で直線外挿した結果に基づいている。この試験ではヒドラジンを 1 日 6 時間で週 5 日、1 年間投与した後に 18 カ月間の観察期間が設けられた (7 で引用)。この試験のデータについては、US EPA の評価概要にしかアクセスできないが、Vernot ら (11) の結果と、同一とはいえないまでも、極めて類似していると思われる。

許容摂取量 (AI)

AI を計算するための試験選択の根拠

ヒドラジンの経口投与及び吸入投与によるがん原性試験が評価され、吸入曝露に個別の限度値が必要か否かを判断した。吸入試験では最初の接触部位により強度の発がん性がみられることを考慮し、吸入曝露については個別の AI が適切と判断した。

ヒドラジンの経口投与については、マウスの 4 試験及びラットの 2 試験で発がん性が報告されている。最も感受性が高かった経口試験は雌ラットにおける肝細胞の腺腫と肝臓がんであった (10)。

吸入医薬品の AI を算出するために最も信頼性が高いがん原性試験を選択する際は、US EPA がヒドラジンの吸入曝露による限度値の算出に用いたすべての吸入がん原性試験を考慮した。US EPA が用いた MacEwen らによる重要な試験 (7) を閲覧できなかったが、Vernot ら (11) とおそらく同一のデータと予想される。TTC は、数百の発がん物質の TD_{50} 値からの直線外挿で算出されていることから、ヒドラジンの AI の算出にも同一のアプローチを用いた。US EPA が用いた方法論及びここで用いた方法はいずれも本質的に極めて保守的な方法である。ただし、方法論の違いがあることを考慮すると、わずかな違いがあると予想するのが妥当である。雌雄ラットにヒドラジンを 1 年間吸入投与し、18 カ月間の観察期間を設けた試験 (11) から算出した TD_{50} に基づいて AI が計算された。1 年間試験はがん原性試験としては標準的なデザインではなかったが、発がん性陽性結果が認められたことから、発がん性の機会を見逃さなかったと考えられる。最も感受性が高かった標的組織は雄の鼻腔であり、 TD_{50} 値は、2 年間の曝露に対して 1 年間の曝露であることを考慮する通常の方法で調整し、 0.194 mg/kg/day とした。

AI の算出

生涯 AI = $TD_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$

生涯 AI = $38.7 \text{ (mg/kg/day)} / 50,000 \times 50 \text{ kg}$

生涯 AI = 39 $\mu\text{g/day}$

吸入 AI の算出

生涯 AI = $TD_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$

生涯吸入 AI = $0.194 \text{ (mg/kg/day)}/50,000 \times 50 \text{ kg}$

生涯吸入 AI = 0.2 $\mu\text{g/day}$

References

1. Choudary G, Hansen H. Human health perspective on environmental exposure to hydrazines: A review. *Chemosphere* 1998; 37(5):801-43.
2. Von Burg R, Stout T. Hydrazine. *J Appl Toxicol* 1991; 11: 447-450.
3. Toth B. A review of the natural occurrence, synthetic production and use of carcinogenic hydrazines and related chemicals. *In vivo*. 2000; 14(2):299-319.
4. Hazardous Substance Database (HSDB): Hydrazine (302-01-2); [Online]. 2005 June 24 [cited 2013 February 27]; Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
5. Liu YY, Schmeltz I, Hoffman D. Chemical studies on tobacco smoke. Quantitative analysis of hydrazine in tobacco and cigarette smoke. *Anal Chem* 1974; 46: 885-9.
6. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, [Online] 1972-PRESENT. (Multivolume work). 1999; Available from: URL: <http://monographs.iarc.fr/index.php> p. V71 1006.
7. U.S. Environmental Protection Agency. Hydrazine/Hydrazine sulfate (302-01-2). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1991. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0352_summary.pdf
8. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
9. Steinhoff D, Mohr U. The question of carcinogenic effects of hydrazine. *Exp Pathol* 1988; 33: 133-40.
10. Matsumoto M, Kano H, Suzuki M, Katagiri T, Umeda Y, Fukushima S. Carcinogenicity and chronic toxicity of hydrazine monohydrate in rats and mice by two-year drinking water treatment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2016;76:63-73.
11. Vernot EH, MacEwen JD, Bruner RH, Haun CC, Kinkead ER, Prentice DE, et al. Long-term inhalation toxicity of hydrazine. *Fundam Appl Toxicol* 1985; 5:1050-64.
12. Steinhoff D, Mohr U, Schmidt WM. On the question of the carcinogenic action of hydrazine - evaluation on the basis of new experimental results. *Exp Pathol* 1990; 39: 1-9.
13. Toth B. Hydrazine, methylhydrazine and methylhydrazine sulfate carcinogenesis in Swiss mice.

- Failure of ammonium hydroxide to interfere in the development of tumors. *Int J Cancer* 1972; 9: 109-18.
14. Roe FJC, Grant GA, Millican DM. Carcinogenicity of hydrazine and 1,1-dimethylhydrazine for mouse lung. *Nature* 1967; 216:375-376.
 15. Becker RA, Barrows LR, Shank RC. Methylation of liver DNA guanine in hydrazine hepatotoxicity: dose-response and kinetic characteristics of 7-methylguanine and O⁶-methylguanine formation and persistence in rats. *Carcinogenesis* 1981; 2(11):1181-8.
 16. Bosan WS, Shank RC. Methylation of liver DNA guanine in hamsters given hydrazine. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 70:324-34.
 17. Bosan WS, Shank RC, MacEwen JD, Gaworski CL, Newberne PM. Methylation of DNA guanine during the course of induction of liver cancer in hamsters by hydrazine or dimethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1987; 8(3):439-44.
 18. Saffhill R, Fida S, Bromley M, O'Connor PJ. Promutagenic alkyl lesions are induced in the tissue DNA of animals treated with isoniazid. *Human Toxicol* 1988; 7:311-7.
 19. Leakakos K, Shank RC. Hydrazine genotoxicity in the neonatal rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 126: 295-300.
 20. Mathison B, Murphy SE, Shank RC. Hydralazine and other hydrazine derivatives and the formation of DNA adducts. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 127 (1): 91-8.
 21. Biancifiori, C. Hepatomas in CBA/Cb/Se mice and liver lesions in golden hamsters induced by hydrazine sulfate. *J Natl Cancer Inst* 1970; 44: 943.
 22. FitzGerald BE, Shank RC. Methylation status of DNA cytosine during the course of induction of liver cancer in hamsters by hydrazine sulphate. *Carcinogenesis* 1996; 17(12):2703-9.

過酸化水素 (CAS# 7722-84-1)

ヒトへの曝露の可能性

過酸化水素は緑茶やインスタントコーヒー、新鮮な果実や野菜に存在し、体内でも自然に産生される (1)。1日につき6.8 gが内在的に産生されると推定されている (2)。その他の一般的な曝露源は、消毒薬、一部の局所ご瘡用クリーム製剤、口腔ケア製品 (過酸化水素を4%まで含有してよい) がある (2)。

変異原性/遺伝毒性

過酸化水素は*in vitro*では変異原性及び遺伝毒性を示すが、*in vivo*ではこれらを示さない。

IARC (3) 及びEuropean Commission Joint Research Centre (4) が過酸化水素の変異原性データを評価しており、ここに主要な所見を纏める。

過酸化水素は以下において変異原性を示す：

外因性代謝活性化系の非存在下での *Salmonella typhimurium* 株 TA96、TA97、SB1106p、SB1106
及び SB1111、並びに *Escherichia coli* WP2

L5178Y マウスリンフォーマ細胞の亜株の *hprt* 遺伝子座

チャイニーズハムスターV79 細胞の *hprt* 遺伝子座 (6 試験中 1 試験のみ)

*In vivo*で過酸化水素をマウスに1000 mg/kgまで腹腔内投与した試験、又はカタラーゼ欠損 C57BL/6NCr1BRマウスに200、1000、3000、6000 ppmで2週間飲水投与した試験では、小核は誘発されなかった。

発がん性

IARC により、過酸化水素はグループ 3、すなわち、ヒトに対する発がん性について分類することができないとされている (3)。

過酸化水素を 0.1 又は 0.4%の濃度でマウスに約 2 年間飲水投与した 1 つのがん原性試験 (5) のみが CPDB で引用されている (6)。この試験には 1 群につき約 50 匹の 2 つの投与群が含まれていた。このマウスがん原性試験では十二指腸の腫瘍の統計学的有意な増加 ($p < 0.005$) を両投与群で認めたが (5)、CPDB では雌の高用量群における十二指腸腫瘍のみ有意であると記述している (6)。したがって、飲水投与した 0.1%の過酸化水素を最小毒性量 (LOAEL) と定め、これは体重 1 kg 当たりの平均 1 日量 167 mg/kg/day に相当する。

投与期間が 6 カ月以上の試験を下表に要約している (2 から改変)。これらの試験では動物数が限定され、単一の用量が用いられた。ほとんどの試験は CPDB の TD_{50} の算出に用いるための基準を満たしていない。DeSesso ら (2) は、14 のがん原性試験 (マウス皮下投与、2 試験；マウス経皮投与、2 試験；飲水投与、6 試験 (ラット 2 試験及びマウス 4 試験)；ハムスター経口投与、1 試験；頬袋投与、3 試験) のうち、マウス飲水投与の 3 試験 (5、8、9) でのみ過酸化水素で (近位十二指腸の) 腫瘍発生の増加を示したことを述べている。これらのマウスがん原性試験の結果は、米国食品医薬品局 (FDA) のがん評価委員会 (Cancer Assessment Committee : CAC) によって詳細に評価された。結論は、これらの試験は過酸化水素が発がん物質であるという十分な証拠を示さなかった、というものであった (10)。

欧州では、消費者製品に関する科学専門委員会 (Scientific Committee on Consumer Products) が入手可能な過酸化水素のデータを評価した結果、過酸化水素は変異原性物質の定義には合致しないと結論された (11)。また、委員会は、弱い局所発がん性の作用機序は不明であるが、遺伝毒性機序は排除できないと述べている (11)。一方、DeSesso ら (2) は、希釈された過酸化水素は標

的部位 (十二指腸) に到達する前に分解し、認められた過形成病変は、過酸化水素の飲水曝露でよく認められる、飲水量減少に伴うフードペレットからの刺激が原因だったと示唆した。直接的な作用が認められないことは、過酸化水素が直接曝露される組織 (口腔、食道及び胃) に腫瘍が認められないことや、過酸化水素を胃挿管 (飲水量に影響しない) により投与したハムスターの 6 カ月までの試験で、胃及び十二指腸上皮が正常にみえたとの結果から裏付けられ、このことは、米国 FDA が上記のとおり結論付けた根拠であった (10)。

Hydrogen Peroxide – Details of oral carcinogenicity studies

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Notes
Ref. 5*	48-51/sex/ group C57BL/6J mice	100 weeks Drinking water	Yes	2; 0.1; 0.4% M: 167; 667 F: 200; 800 mg/kg/d	TD ₅₀ of 7.54 g/kg/d for female duodenal carcinoma
Ref. 7	29 mice C57BL/6J total male & female (additional groups sampled at intervals from 7 to 630 days of treatment; or 10 – 30 days after cessation of treatment at 140 days)	700 days Drinking water	No	1: 0.4%	No tumors reported. Time- dependent induction of erosions and nodules in stomach and nodules and plaques in duodenum. After a recovery period following 140 days of H ₂ O ₂ treatment, by 10 to 30 days without treatment there were fewer mice with lesions.
Ref. 8	18 C3H/HeN mice total male & female	6 mo Drinking water	No	1: 0.4%	2 mice with duodenal tumors (11.1%)
Ref. 8	22 B6C3F1 mice total male & female	6 mo Drinking water	No	1: 0.4%	7 mice with duodenal tumors (31.8%)
Ref. 8	21 C57BL/6N [♂] mice total male & female	7 mo Drinking water	No	1: 0.4%	21 mice with duodenal tumors (100%)
Ref. 8	24 C3H/Cb/s [♂] mice total male & female	6 mo Drinking water	No	0.4% only	22 mice with duodenal tumors (91.7%)
Ref. 9	21 female C3H/HeN mice	6 mo Drinking water	11	1: 0.4%	2 mice with duodenal tumors (9.5%). None in controls
Ref. 9	22 female B6C3F1 Mice	6 mo Drinking water	12	1: 0.4%	7 mice with duodenal tumors (31.8%) None in controls
Ref. 9	24 female C3H/Cb/s [♂] mice	6 mo Drinking water	28	1: 0.4%	22 mice with duodenal tumors (91.7%). None in controls

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Notes
Ref. 12	3 male rats	21 weeks Drinking water	3	1: 1.5%	No tumorigenic effect observed
Ref. 13	Males and female rats (50/sex/group)	2 years Drinking water	Yes	2: 0.3% 0.6%	No tumorigenic effect observed
Ref. 14	Hamsters, sex not reported (20/group)	15 weeks and 6 mo Oral gavage (5 d/wk)	Yes	1: 70 mg/kg/d	No tumorigenic effect observed

* Carcinogenicity study selected for PDE calculation; in CPDB (Ref. 6).

All other studies are not in the CPDB but are summarized in Ref. 2

‡ Catalase deficient

発がん性の作用機序

過酸化水素は通常の細胞代謝の一環として生成される活性酸素種 (ROS) の一つである (4)。過酸化水素の毒性は、ROSの産生及びそれに続く酸化的損傷により、細胞毒性、DNA鎖切断及び遺伝毒性が発生することによる (15)。ROSの体内産生は回避不能であるため、体はカタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ及びグルタチオンペルオキシダーゼを含む防御機構を進化させ、ROSの量を制限している。

酸化ストレスは体の自然な抗酸化防御機構の限度を超えた場合に発生し、DNA、タンパク質、脂質などの高分子へ損傷を引き起こす。また、ROSは抗酸化酵素を不活化し、さらに損傷作用が増強される (16)。ミトコンドリア呼吸では、酸素は一電子移動を受け、スーパーオキシドアニオンラジカルとなる。この分子の反応性は限られているが、スーパーオキシドジスムターゼという酵素により過酸化水素に変換される。次に過酸化水素はカタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼにより、水と酸素に還元される (17)。ただし、鉄や銅のような遷移金属の存在下では、過酸化水素は極めて反応性が高いヒドロキシラジカルまでさらに還元される。これらは細胞成分と反応するまで分子直径の1~2倍を超えて拡散しないほど反応性が高い (16)。したがって、DNAを酸化するにはDNAに隣接して生成される必要がある。抗酸化物質はヒドロキシラジカルを水へ還元する電子を供給することで、ヒドロキシラジカルの反応性を抑制する。*in vitro*試験系では、酸化的損傷から保護する抗酸化物質及びその他の細胞防御が明らかに制限されている。その結果、細菌株や哺乳類細胞株では、過酸化水素による処置がこれらの防御機構を容易に上回り、細胞毒性や遺伝毒性を誘発する。例えばカタラーゼのような過酸化水素分解酵素の導入や遷移金属レベルの調整など、体内で機能している防御機構の構成因子の導入により、*in vitro*試験の反応が減少することが立証されている (11)。当然ながら、細胞の防御機構が損なわれていない*in vivo*の場合、過酸化水素は短期曝露後に遺伝毒性を示さない。このことは、閾値が存在し、その値未満であれば細胞の防御機構がROSを制御し、恒常性を維持できるということを示唆している。

欧州委員会 (EC、4) の包括的リスク評価に基づき、証拠の重みから、過酸化水素は防御機構を大きく上回る場合に *in vitro* で変異原性であると示唆される。しかし、*in vivo* の標準的試験では遺伝毒性がない。作用機序は非線形で閾値を有する。

規制上の限度値や公表された限度値

欧州化粧品規則 (European Cosmetic Regulation) の Annex III (18) が、口腔衛生及び歯のホワイトニング製品に関する過酸化水素の許容レベルを定めた。口腔洗浄剤、練り歯みがき、歯のホワイトニング製品や漂白製品を含む、店頭販売される口腔製品について、(既存製品又は発売製品

で) 許可されている過酸化水素の濃度は最大 0.1%である。歯科医が 18 歳以上の者に処方する製品であれば、より濃度の高い 6%まで許可される。EC SCCP (11) は、1回の適用につき 3 g の口腔洗浄薬又は 0.48 g の練り歯みがきが摂取されると見積もった。製品に 0.1%の過酸化水素が含まれると仮定すると、摂取しうる過酸化水素の量は、口腔洗浄薬からは 3 mg、練り歯みがきからは 0.48 mg となる。おそらく大半の過酸化水素は口腔ケア製品の使用中に分解され摂取されないため、これらの値は摂取量を過大に見積もっていると考えられる (4)。

US FDA – 抗菌周病剤や抗菌垢剤として長期間店頭販売剤として使用される場合、過酸化水素は 3%まで、一般に安全と認められる (GRAS) (19)。

許容1日曝露量 (PDE)

過酸化水素は閾値がある作用機序 (すなわち、酸化ストレス) を介する遺伝毒性があり、口腔ケア及び他のパーソナルケア製品による摂取量を上回る高い水準で体内で生産されている。したがって、がん原性試験データに基づいて PDE を計算することは適切でないと考えられた。1日につき内在的に生産される過酸化水素 6.8 g の 1%、すなわち、68 mg/day (68,000 µg/day) を摂取しても、内在的に生産された過酸化水素による曝露量を大幅に増やすことはないが、医薬品の品質に基づく限度値を通常上回る。ICH M7 ガイドラインは、化合物特異的なリスク評価から許容摂取量を算出する場合、上限値は 0.5%、例えば、一日当たりの最大用量が 100 mg の薬剤では 500 µg と定めている。

References

1. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000; 486:10-13.
2. DeSesso JM, Lavin AL, Hsia SM, Mavis RD. Assessment of the carcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide. *Food and Chem Toxicol* 2000; 38:1021-41.
3. IARC. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1999 Vol. 71.
4. European Commission Joint Research Center. EU Risk Assessment report. Hydrogen Peroxide. CASRN 7722-84-1). 38. [Online]2003. Available from: URL: <https://echa.europa.eu/documents/10162/a6f76a0e-fe32-4121-9d9d-b06d9d5f6852>
5. Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y. Induction of duodenal tumours in mice by oral administration of hydrogen peroxide. *Gann the Japanese journal of cancer research* 1981; 72: 174-5.
6. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
7. Ito A, Naito M, Naito Y, Watanabe H. Induction and characterization of gastro-duodenal lesions in mice given continuous oral administration of hydrogen peroxide. *Gann the Japanese Journal of Cancer Research* 1982;73: 315-322.
8. Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y, Kawashima K. Correlation between induction of duodenal tumor by hydrogen peroxide and catalase activity in mice. *Gann the Japanese Journal of Cancer Research* 1984;75: 17-21.
9. Ito A, Watanabe H, Aoyama H, Nakagawa Y, Mori M. Effect of 1,2-dimethylhydrazine and hydrogen peroxide for the duodenal tumorigenesis in relation to blood catalase activity in mice. *Hiroshima Journal of Medical Science* 1986;35:197-200.

10. US FDA. Irradiation in the production, processing, and handling of food. Food and Drug Administration. Federal Register 1988; Vol. 53, No. 251:53198-9.
11. SCCP. European Commission. Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on Hydrogen peroxide, in its free form or when released, in oral hygiene products and tooth whitening products. SCCP/1129/07 [Online] 2007. Available from: URL: https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_122.pdf
12. Hiroto N. and Yokoyama T. Enhancing effect of hydrogen peroxide upon duodenal and upper jejunal carcinogenesis in rats. Gann 1981; 72: 811-812. Cited in Ref. 2.
13. Ishikawa T. and Takayama S. (1984) Hydrogen peroxide. In Information Bulletin on the Survey of Chemicals being Tested for Carcinogenicity. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1984; 11:86. (Cited in Ref. 2).
14. Li Y, Noblitt T, Zhang A, Origel A, Kafrawy A, Stookey G. Effect of long-term exposure to a tooth whitener [Abstract]. Journal of Dental Research 1993;72:1162. (Cited in Ref. 2).
15. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. British Dental Journal 2006; 200:371-6.
16. De Bont R, Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. Mutagenesis 2004; 19:169-85.
17. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 2000; 408:239-47.
18. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products.
19. US FDA. Oral health care drug products for over-the-counter human use; antigingivitis/antiplaque drug products; establishment of a monograph. Federal Register 2003; 68:32232-32286.

塩化メチル (Chloromethane, CAS# 74-87-3)

ヒトへの曝露の可能性

低レベルの塩化メチルは自然環境に存在する。それは、例えば海洋植物プランクトン、微生物発酵、バイオマス燃焼 (野焼きや森林火災) や火山から、毎日数千トンの塩化メチルが自然に産生されているためである。

WHO (1) は、郊外の大気中の塩化メチル濃度は一般に $2.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (1.0 ppb) 未満であるが、市街地では $0.27\sim 35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.13~17 ppb) であり、約 $20\sim 700 \mu\text{g}$ の 1 日摂取量に相当する (ヒトの 1 日呼吸量 20 m^3) と報告している。河川、海水、地下水及び飲用水中の濃度については様々な報告があり、井戸の飲用水中でみられた最大濃度は $44 \mu\text{g}/\text{L}$ であると報告されている。

変異原性/遺伝毒性

塩化メチルは *in vitro* で変異原性及び遺伝毒性があるが、これらは *in vivo* では不確かである。WHO (1) 及び US EPA (2) で塩化メチルの変異原性データを概説しており、ここに主要な所見を纏める:

塩化メチルは以下において変異原性を示す:

細菌を用いる復帰突然変異 (Ames) 試験、代謝活性化系の有無に関わらず *Salmonella typhimurium* TA100、TA1535 及び *Escherichia coli* WP2uvrA TK6 ヒトリンパ芽球

In vivo に関して、WHO (1) は「標準的な *in vivo* 遺伝毒性試験データは入手できないが、高用量で DNA - タンパク質クロスリンクが起こることを示唆するいくつかの証拠に基づき、塩化メチルは *in vivo* で極めて弱い変異原性物質であると考えられる」と結論した。

発がん性

塩化メチルは、IARC によりグループ 3 (塩化メチルのヒトへの発がん性に関する証拠は不十分) (3) に分類されており、また、US EPA によりカテゴリ D 化合物 (ヒトへの発がん性が分類不能である) (2) に分類されている。

動物では、発がん性を示す唯一の証拠は、投与経路として吸入を用いたラット及びマウスの 2 年間のバイオアッセイ 1 試験 (4) から得られている。腎臓の良性及び悪性の腫瘍発生率の統計的に有意な上昇は、雄の B6C3F1 マウスにおいて高濃度 ($1,000 \text{ ppm}$) でのみ観察された。統計的に有意ではなかったが、 $464 \text{ mg}/\text{m}^3$ (225 ppm) では皮質腺腫もみられ、マウスでは腎皮質小嚢胞の発症が $103 \text{ mg}/\text{m}^3$ (50 ppm) 用量群でみられ、 $464 \text{ mg}/\text{m}^3$ (225 ppm) 群である程度みられた (4)。しかし、用量相関性は認められなかった。腎皮質尿管上皮の過形成及び巨大核も雄マウスの 1000 ppm 用量群に限定された。雄マウスの低用量群や他の部位では腫瘍が認められず、雌マウスや雌雄 F-344 ラットではいずれの部位や用量においても腫瘍はみられなかった。腎腺癌は、人が遭遇しそうなレベルの曝露時に雄マウスでしか発生しないことが示されている。

これらの雄マウスの腎腫瘍がヒトと関連している可能性は低い。塩化メチルはグルタチオン抱合により代謝され、またわずかに p450 による酸化を受ける (1, 2)。雄マウスの腎腫瘍は塩化メチル代謝中のホルムアルデヒド産生に関連していると考えられている。これを担うと考えられているチトクローム P-450 (CYP) アイソザイムである CYP2E1 は、雄マウスの腎臓に存在しアンドロゲンに依存するが、雌マウスの CYP2E1 レベルは雄の 20%~25%に過ぎない。雄 CD-1 マウスの腎ミクロソームでホルムアルデヒドが生成され、その量は未処置 (アンドロゲン未投与) 雌マウスでの生成量を上回ることが実証されているが、ラットの腎ミクロソームはホルムアルデヒドを生成しなかった。また、ヒトの腎臓には塩化メチルを発がん性の可能性のある有毒な中間体

に変換することが知られている重要な酵素 (CYP2E1) がないことを考慮すると、塩化メチルが腎臓で処理される方法に種特異的な代謝の差があることから、P-450 酸化を介したマウス腎腫瘍は生物学的にヒトと関連していないことが強く示唆される。ラットでは、腎臓の CYP2E1 活性は極めて低かった。CYP2E1 活性はヒト腎臓ミクロソーム検体でも (2)、ヒト腎臓から新鮮分離された近位尿細管細胞でも検出されなかった。CYP4A11 はヒトの腎臓で検出されたが、塩化メチルの代謝能力は不明である。CYP4A11 に加え、有意なレベルでヒト腎臓ミクロソームに認められるその他の P-450 酵素は、CYP4F2 及び CYP3A のみである。さらに、一般に知られている環境化学物質のうち、CYP4A ファミリーにより代謝されるとみられるものは存在しない。ヒト腎臓には (高レベルを有するマウスとは対照的に) 検出可能な CYP2E1 タンパク質がないことから、雄マウスの腎臓腫瘍の誘発を担うと考えられる P450 による塩化メチルの代謝 (おそらくホルムアルデヒド濃度上昇を引き起こす) が、ヒトと関連している可能性は低いことが示唆される。

ただし、US EPA (2) 及び WHO (1) が強調しているように、優勢なグルタチオン (GSH) 依存経路を介する (肝臓における塩化メチルのギ酸への代謝は GSH 依存性であり、ホルムアルデヒドをギ酸に酸化する GSH 要求性ホルムアルデヒド脱水素酵素を介する) か、CYP2E1 以外の P450 アイソザイムにより、肝臓 (や腎臓) の代謝が果たす役割 (遺伝毒性の可能性のある代謝物が生じる) という点について、無視することはできない。それでもなお、ホルムアルデヒドの基礎的な体内での形成 (すなわち、878~1310 mg/kg/day; 5) と比べ、低用量の塩化メチルを介したホルムアルデヒド産生は無視できる。また、ヒトとの関連性が限られていることに基づき、US EPA は塩化メチルをグループ D の化合物、すなわち「ヒトの発がん性については分類不能」と分類した。

Methyl Chloride – Details of carcinogenicity studies (only inhalation studies available)

Study	Animals/ dose group	Duration/ Exposure	Controls	Doses	Most sensitive tumor site/sex	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 4 (summarized in Ref. 1 and Ref. 2)*	120/sex/ group B6C3F1 mice	24 mo 6h/d, 5d/wk Inhalation	Yes	3: 103; 464; 2064 mg/m ³ (50; 225; 1000 ppm)	Kidney tumors in males only. No finding in females.	1,360.7**
Ref. 4 (summarized in Ref. 1 and Ref. 2)	120/sex/ group Fisher 344 rats	24 mo 6h/d, 5d/wk Inhalation	Yes	3: 103; 464; 2064 mg/m ³ (50; 225; 1000 ppm)	No findings in males and females	NA

Note: Studies not listed in CPDB.

*Carcinogenicity study selected for AI calculation.

**TD₅₀ calculated based on carcinogenicity data (see Note 3).

NA = Not applicable

規制上の限度値や公表された限度値

WHO (1) は一般集団に対するガイドライン値を 0.018 mg/m³ と定め、US EPA (2) は基準濃度を 0.09 mg/m³ と定めた。いずれも塩化メチル吸入後の CNS に対する有害作用の可能性に基づいた。

許容摂取量 (AI)

雄マウスで観察された腫瘍はおそらくヒトと関連していないことがデータから示唆されているが、データに不確定要素があるため AI を定めた。

生涯 AI = $TD_{50}/50,000 \times 50 \text{ kg}$

生涯 AI = $1,360.7 \text{ mg/kg/day}/50,000 \times 50 \text{ kg}$

生涯 AI = $1,361 \text{ } \mu\text{g/day}$

References

1. World Health Organization (WHO). Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) 28. Methyl chloride. [Online]. 2000; Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad28.htm>
2. US EPA. Methyl chloride. (CAS No. 74-87-3). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 2001; Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/1003tr.pdf
3. IARC. Methyl Chloride. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1999 Vol. 71.
4. CIIT. Final report on a chronic inhalation toxicology study in rats and mice exposed to methyl chloride. Report prepared by Battelle Columbus Laboratories for the CIIT. 1981 EPA/OTS Doc #878212061, NTIS/OTS0205952.
5. EFSA. European Food Safety Authority. Endogenous formaldehyde turnover in humans compared with exogenous contribution from food sources. EFSA Journal 2014; 12 Suppl 2:3550.

注 1

1-クロロ-4-ニトロベンゼンの計算された TD₅₀ は、CPDB に記載されていないため、以下に示す。
1-クロロ-4-ニトロベンゼンの計算は、最も感受性の高い腫瘍型である雌ラット副腎髄質褐色細胞腫（1）に基づいた。投与量と発生率は以下の通りである。

ppm	Dose (mg/kg/day)	Number of Positive Animals	Total Number of Animals
0	0	3	50
50	1.9	6	50
225	9.8	4	50
1000	53.8	16	50

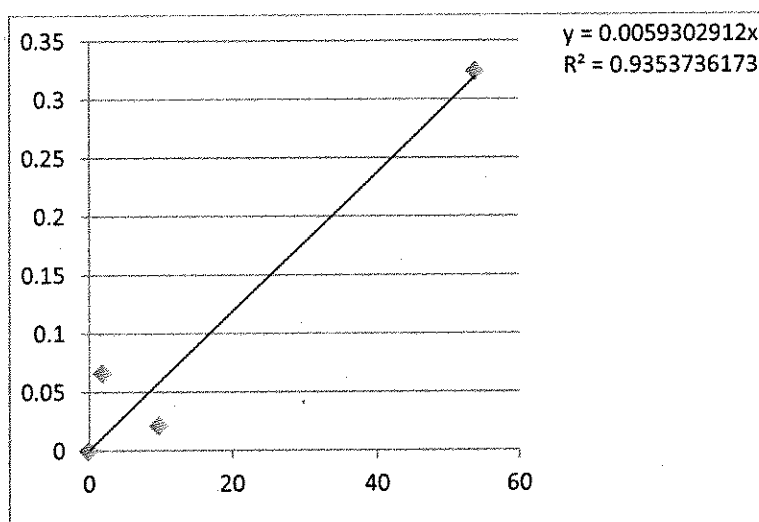
TD₅₀ は、バックグラウンドに対する腫瘍発生率の要約データから、以下の式で計算される（2、3）：

$$\frac{P - P_0}{1 - P_0} = 1 - \exp(-\beta \cdot D)$$

ここで、P は特定の用量（式中の D）で観察された特定の腫瘍型を伴った動物の割合であり、P₀ は対照群に対する特定の腫瘍型を伴った動物の割合である。β と D を単純な線形方程式に変換すると、次のようになる：

$$\ln\left(-\left[\frac{P - P_0}{1 - P_0} - 1\right]\right) = \beta \cdot D$$

結果をプロットし、勾配を使用して β を表すと、用量反応つまり β = 0.0059302912 についての以下のグラフが得られる。



TD₅₀ は、次のように計算される。

$$0.5 = 1 - \exp(-\beta \cdot TD_{50})$$

TD₅₀ を求めると、次の式が得られる。

$$TD_{50} = \frac{0.693}{\beta}$$

したがって、 TD_{50} は $0.693 / 0.0059302912$ すなわち 116.9 mg/kg/day である。

References

1. Matsumoto M., Aiso S, Senoh H, Yamazaki K, Arito H, Nagano K, et al. Carcinogenicity and chronic toxicity of *para*-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. J. Environ Pathol Toxicol Oncol 2006; 25:571-84.
2. Gaylor DW, Gold LS. Quick estimate of the regulatory virtually safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays. Regul Toxicol Pharmacol.1995; 22:57-63
3. Sawyer C, Peto R, Bernstein L, Pike MC. Calculation of carcinogenic potency from long-term animal carcinogenesis experiments. Biometrics 1984; 40: 27-40.

注 2

ヒドラジンの計算された TD₅₀は、CPDBに記載されていないため、以下に示す。ヒドラジンの計算は、最も感受性の高い腫瘍型である雌ラットの肝細胞腺腫及び/又は癌腫 (1) に基づいた。投与量と発生率は以下の通りである。

ppm	Dose (mg/kg/day)	Number of Positive Animals	Total Number of Animals
0	0	1	50
20	1.28	0	50
40	2.50	3	50
80	5.35	6	50

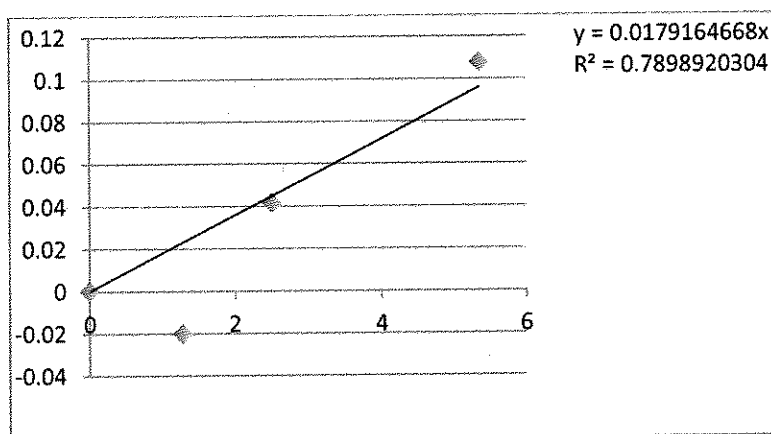
TD₅₀は、バックグラウンドに対する腫瘍発生率の要約データから、以下の式で計算される (2, 3) :

$$\frac{P - P_0}{1 - P_0} = 1 - \exp(-\beta \cdot D)$$

ここで、P は特定の用量 (式中の D) で観察された特定の腫瘍型を伴った動物の割合であり、P₀ は対照群に対する特定の腫瘍型を伴った動物の割合である。β と D を単純な線形方程式に変換すると、次のようになる:

$$\ln\left(-\left[\frac{P - P_0}{1 - P_0} - 1\right]\right) = \beta \cdot D$$

結果をプロットし、勾配を使用して β を表すと、用量反応つまり β = 0.0179164668 についての以下のグラフが得られる。



TD₅₀は、次のように計算される。

$$0.5 = 1 - \exp(-\beta \cdot TD_{50})$$

TD₅₀を求めると、次の式が得られる。

$$TD_{50} = \frac{0.693}{\beta}$$

したがって、TD₅₀は 0.693 / 0.0179164668 すなわち 38.7 mg/kg/day である。

References

1. Matsumoto M, Kano H, Suzuki M, Katagiri T, Umeda Y, Fukushima S. Carcinogenicity and chronic toxicity of hydrazine monohydrate in rats and mice by two-year drinking water treatment. Regul Toxicol Pharmacol 2016; 76:63-73.
2. Gaylor DW, Gold LS. Quick estimate of the regulatory virtually safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays. Regul Toxicol Pharmacol.1995; 22:57-63.
3. Sawyer C, Peto R, Bernstein L, Pike MC. Calculation of carcinogenic potency from long-term animal carcinogenesis experiments. Biometrics 1984; 40: 27-40.

注 3

塩化メチルの計算された TD₅₀は、CPDBに記載されていないため、以下に示す。塩化メチルの試験 (1、2) は吸入に基づいているため、吸入させた ppm 濃度は用量に換算する必要がある。

ppm	Dose (mg/kg/day) ¹	Number of Positive Animals	Total Number of Animals
0	0	0	67
50	28	0	61
225	127	2	57
1000	566	22	86

1. ppm to mg/kg/day conversion – X ppm x 50.5 g/mol (mol weight)/24.45 x 0.043 (breathing volume) x 6/24 hours x 5/7 days / 0.028 kg (mouse weight) = dose mg/kg/day

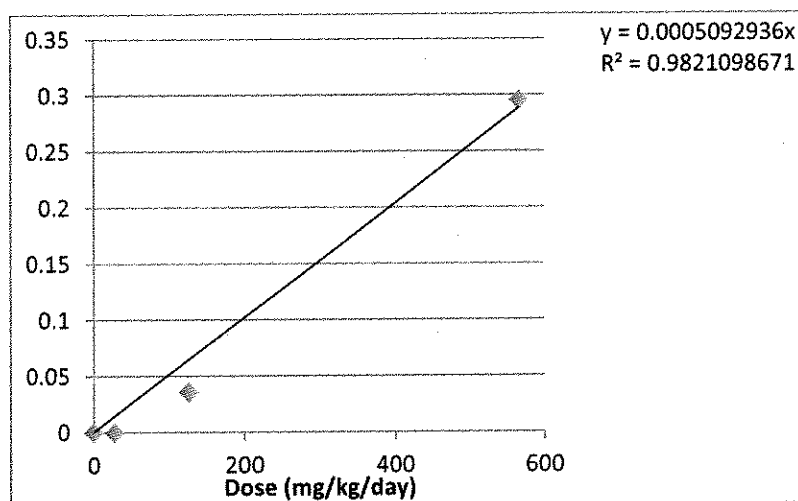
TD₅₀ は、バックグラウンドに対する腫瘍発生率の要約データから、以下の式で計算される (3、4) :

$$\frac{P - P_0}{1 - P_0} = 1 - \exp(-\beta \cdot D)$$

ここで、P は特定の用量 (式中の D) で観察された特定の腫瘍型を伴った動物の割合であり、P₀ は対照群に対する特定の腫瘍型を伴った動物の割合である。β と D を単純な線形方程式に変換すると、次のようになる:

$$\ln\left(-\left[\frac{P - P_0}{1 - P_0} - 1\right]\right) = \beta \cdot D$$

結果をプロットし、勾配を使用して β を表すと、用量反応つまり β = 0.0005092936 についての以下のグラフが得られる。



TD₅₀は、次のように計算される。

$$0.5 = 1 - \exp(-\beta \cdot TD_{50})$$

TD₅₀を求めると、次の式が得られる。

$$TD_{50} = \frac{0.693}{\beta}$$

したがって、 TD_{50} は $0.693 / 0.0005092936$ すなわち 1360.7 mg/kg/day である。

References

1. CIIT. Final report on a chronic inhalation toxicology study in rats and mice exposed to methyl chloride. Report prepared by Battelle Columbus Laboratories for the CIIT. 1981 EPA/OTS Doc #878212061, NTIS/OTS0205952.
2. US EPA. Toxicological review of methyl chloride. (CAS No. 74-87-3). In Support of Summary Information on the IRIS. EPA/635/R01/003. 2001.
3. Gaylor DW, Gold LS. Quick estimate of the regulatory virtually safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays. Regul Toxicol Pharmacol.1995; 22:57-63.
4. Sawyer C, Peto R, Bernstein L, Pike, MC. Calculation of carcinogenic potency from long-term animal carcinogenesis experiments. Biometrics 1984; 40: 27-40.

