

巻頭言

発がん物質の閾値：新しい概念の導入



大阪市立大学大学院 医学研究科
研究科長兼医学部長 福島昭治

今回、巻頭言を書いてみないかとの誘いを受けた。そこで、この機会を利用して、私がライフワークの1つとして取り組んでいる発がんの閾値論について述べてみたい。

まず、発がんリスク評価について述べよう。この場合のリスクは危険という意味ではなく、「ある因子によってがんが発生する可能性の確率」と理解すべきである。したがって、発がんリスク評価の前段階として、有害事象の確認がある。すなわち、環境中に存在する化学物質の場合、それによってがんができるかどうかを疫学的あるいは実験的に明らかにする必要がある。これは極めて重要な作業であるが、ある化学物質によってがんが発生するという事実のみを証明しているということを理解していただきたい。

発がんリスク評価は、それがどのくらいの確率でがんを発生させるかを検討する作業である。すなわち、発がんの可能性を曝露される化学物質の量と関係づけることにより、がんにかかることによって発生する健康上の損失をより科学的に理解することができる。発がん物質に曝露された場合、どれだけの量なら安全であるかを知る目安をつくる作業といえよう。一般に化学物質は特定の反応を起こさせるときに、その用量に依存して反応の程度、すなわち、強さが違う。したがって、反応しない用量域があり、この場合に閾値があると表現する。すなわち、閾値を求めることはリスク評価にとって重要な作業である。

ところで、発がん物質の場合はどうであろうか。発がん物質はその発がん機序の面から、大きく2種類に分類される。1つはDNAに損傷を起こし、遺伝子に傷をつけるタイプのもので、遺伝毒性発がん物質という。もう1つは遺

伝子に傷をつけないが、遺伝子のはたらきのバランスをくずし、異常な細胞増殖などをもたらす非遺伝毒性発がん物質といわれるものである。

現在までのところ、発がん物質に対するリスク評価、特に遺伝毒性発がん物質の閾値については実験的に非常に多くのネズミを使っても証明されておらず、閾値がないとして評価されてきた。すなわち、発がん物質はどんなにわずかでも、存在する限り安全ではないという考え方で、ゼロリスク論と呼ばれている。

しかし、最近になって、化学物質によるがん発生のしくみが一部、明らかになってきており、また、生体は種々の傷害に対して修復する機能を持っていることもわかってきた。実際に私たちは、発がん性ヘテロサイクリックアミンである MeIQx や N-ニトロソ化合物のひとつジエチルニトロサミンのラット肝臓がんは非常に低い用量では発生しないことを証明した。世界的にも同様なデータが最近、報告されている。このことは発がん物質には閾値があるという新しい考え方をもたらしたといえよう。

環境にはどうしても排除できない発がん物質が数知れず存在している。そこで「閾値あり論」を導入することにより、排除できない発がん物質からの曝露を防ぐための基準値を科学的につくることが可能となり、リスク評価の大きな進歩となるに違いない。化学物質を使用することによって十分な恩恵が得られるのか、その場合の発がんリスクをどのようにするのか、閾値あり論は今後のがん予防対策に新しい展開をもたらすことが期待される。

CERI 財団法人 化学物質評価研究機構

CONTENTS

巻頭言

「発がん物質の閾値：新しい概念の導入」

大阪市立大学大学院 医学研究科 福島昭治

本機構の活動から

・2005分析展

特集（化学物質安全部門 日田事業所）

・遺伝子発現解析

・光細胞毒性試験及び光遺伝毒性試験について

・吸入曝露による中期ラット肝発がん性試験法（伊東法）の開発

・小動物専用採血具の有効性について

特集（安全性評価技術研究所）

・EUの新化学品規制 REACH 案

・海外出張報告

アスベスト（石綿）の分析

編集後記

本機構の活動から

2005 分析展

毎年恒例の社団法人日本分析機器工業会主催の分析展が、8月31日から9月2日までの3日間幕張メッセで経済産業省などの後援により開催されました。

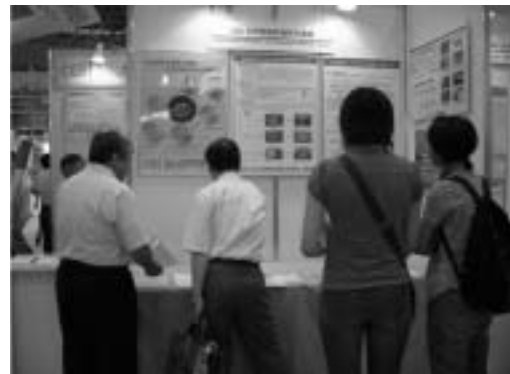
本機構では、過去に化学標準部が研究機関コーナーに、クロマト技術部が一般ブースに出展経験がありました。今回は、テーマ展示コーナー「ソリューションコーナー」に、次の表に示すような全体の業務紹介、各部門の業務の紹介をそれぞれパネルにして展示しました。

部門	内容
CERI 全体	業務紹介
高分子技術部	加硫ゴムの製造工程での製品事故発生原因の可能性
環境技術部	RoHS 指令における使用制限物質の分析
化学標準部	計量法トレーサビリティ制度と依頼試験
クロマト技術部	L-column 及び G-column
化学物質安全センター	遺伝子発現解析
評価部	タンパク質発現解析による毒性評価

また、分析展と同時に開催された新技術説明会において、クロマト技術部が「失敗例から学ぶHPLCのノウハウ・テクニック」という演題でセミナーを行いました。

多くの方に展示コーナー、新技術説明会に来ていただきまして、本機構を知っていただく良い機会となりました。

(企画・本橋)



特集 (化学物質安全部門 日田事業所)

遺伝子発現解析

1. はじめに

DNA マイクロアレイ (以下マイクロアレイと略す) を用いた遺伝子発現解析は、一度に多数の遺伝子発現量 (数千~数万遺伝子) を解析可能であり、一般化学物質のみならず医薬品や機能性食品などの毒性発現や作用メカニズムの解析、バイオマーカーの探索などに非常に有効なツールです。

本機構では化学物質の毒性評価の一環として独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 委託事業「高精度・簡易有害性 (ハザード) 評価システム開発」プロジェクトに参画し、ラットを用いたトキシコゲノミクス研究 (遺伝子情報に基づく化学物質の発がん性予測法開発) に取り組んできました。ここで得られた豊富なアレイ実験、データ解析の経験と知識を生かし、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の受託を開始しています。本稿では、マイクロアレイの測定原理と実際の遺伝子発現受託解析の流れについて紹介します。

2. マイクロアレイの測定原理

マイクロアレイの測定原理を図1に示します。

マイクロアレイは生体中の各遺伝子に特異的に結合する相補的な塩基配列の遺伝子断片を高密度にスライドガラス

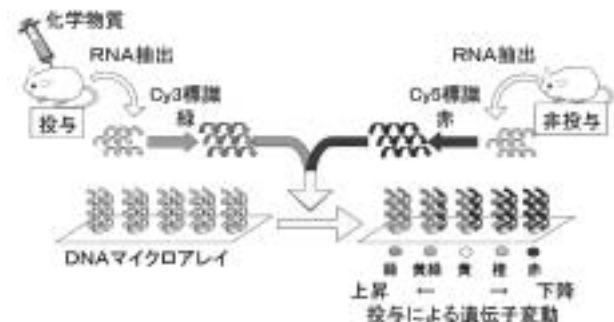


図1 DNA マイクロアレイ測定概念図

などの支持体に張り付けたもので組織などに発現する遺伝子を網羅的 (数千~数万遺伝子) に解析することができます。

遺伝子発現量を比較したい2つの異なるサンプル (例: 化学物質投与と非投与の動物組織) から精製したRNAを異なる2色の蛍光色素 (Cy3: 緑, Cy5: 赤) でそれぞれ標識し、それらの等量混合物をマイクロアレイ上に添加します。各サンプルの蛍光標識体は、存在比に応じてそれぞれマイクロアレイ上の相補的な配列を持った遺伝子断片に特異的に結合するので、各遺伝子スポット上の緑と赤の蛍光強度を読み取ることで、比較したいサンプル間の各遺伝子発現の変動倍率を測定することができます。蛍光は、画像データとして取得され、遺伝子発現量が等量であれば黄

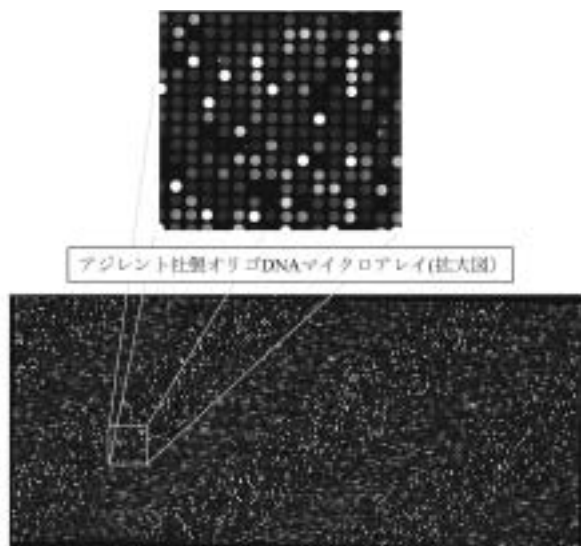


図2 アジレント社製オリゴDNAマイクロアレイ(全体像)

色、Cy3標識側の発現量が多ければより緑に、Cy5標識側の発現量が多ければより赤に近い色のスポットとして観察することができます(図2)。

3. 遺伝子発現受託解析の流れ

本機構では、動物や培養細胞実験を含む遺伝子発現量測定から得られたデータの詳細解析までの総合的な遺伝子発現解析を受託しています(図3)。ここではその中の基本パッケージとなるマイクロアレイ実験の流れについて説明します。



図3 遺伝子発現解析の総合的な受託試験項目の提供

使用するマイクロアレイ

主に高密度、高品質なアジレント社製マイクロアレイ(ラット、マウス、ヒトなど)を用います。

送付サンプル

2つのサンプルを1枚のアレイで比較する2色法を採用していますので、比較したい2つのRNAを凍結送付していただきます。組織、細胞からのRNA精製もオプション項目として実施しています。



図4 アジレント社製バイオアナライザー

RNA品質検定

RNAの品質は、最終結果に影響を与えますので、アジレント社製バイオアナライザー(図4)などを用いてRNAの濃度、純度、分解度を確認します。

標識cRNA合成

RNA鋳型として逆転写酵素によりcDNAを合成し、これを鋳型としてT7 RNAポリメラーゼによりcRNAを合成すると同時に2色の蛍光色素で標識されたシトシン(Cy3-CTP、Cy5-CTP)をそれぞれ取り込ませます。cRNAは直線的に増幅されますので、出発RNA量が少量でも、充分量の標識cRNAを得ることができます。

標識cRNAチェック

標識cRNAの品質も、最終結果に影響を与えますので、濃度、蛍光色素の取り込み効率を確認しています。

フラグメンテーション

標識cRNAをハイブリダイゼーションに適した分子サイズに断片化します。

ハイブリダイゼーション、洗浄

マイクロアレイに標識cRNAを添加し、ハイブリダイゼーションを一晩行い、翌日、洗浄して非特異的に吸着したcRNAを取り除きます。

スキャンニング

アジレント純正の高解像度スキャナ(図5)でマイクロアレイ上の各色素の蛍光強度を読み取り、画像ファイル



図5 アジレント社製マイクロアレイスキャナー

作成します。

数値化、色素バイアス補正

取得した画像ファイルから専用ソフトを用いて各色素の蛍光強度を数値データに変換します。また、数値化データの色素バイアス（色素の取り込み効率、1分子あたりの量子蛍光などに起因）をLOWESS ノーマライゼーション法で補正しています。

簡易解析（変動遺伝子リストの作成）

取得した補正データを用いて、比較サンプル間で変動した遺伝子の変動倍率順に並んだリストを作成し、全体を一

望できるスカッタープロットと合わせて納品しています（図6）。更に詳細解析を希望される場合は、オプション項目としてクラスタリングなどの各種解析を実施していません。

4. まとめ

マイクロアレイは多くの遺伝子の動きを網羅的に解析する強力な手段となりますので、ぜひ一度お試しください。日田事業所ではマイクロアレイ技術を始め、様々な先進技術を駆使した新しい毒性試験の開発に挑戦しています。

（日田・宮浦）

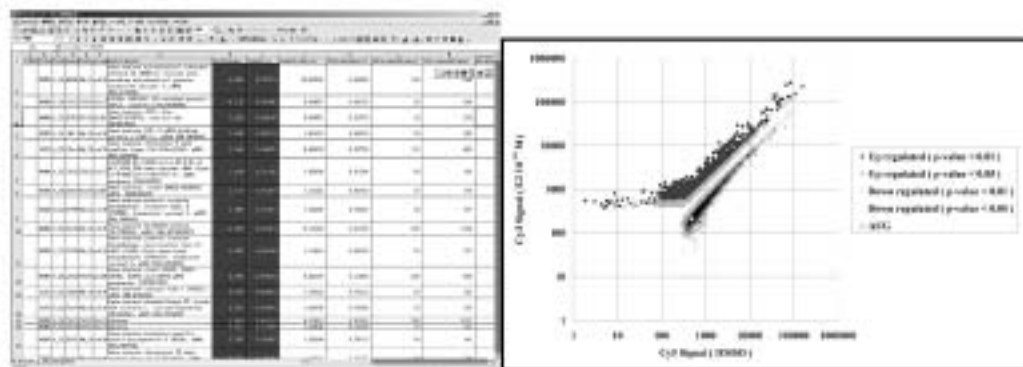


図6 変動遺伝子リストとスカッタープロット

光細胞毒性試験及び光遺伝毒性試験について

1. はじめに

化学物質の暴露を受けた後、日光に曝されることにより、ヒトに毒性を示す化学物質の存在が懸念されています。このような化学物質の毒性影響を評価するには、用いる試験系の中で光の影響を考慮する必要があります。

光照射による化学物質の毒性影響を評価する方法として従来 *in vivo* 系の光感受性試験などがありますが、より簡便に光毒性を評価する方法として、*in vitro* 系の光細胞毒性試験が代替試験法として検討されてきました。さらに、光照射による化学物質の遺伝毒性を評価する方法として、遺伝毒性試験の中で最も一般的かつ簡易に実施されている「細菌を用いる復帰突然変異試験」を利用した光遺伝毒性試験の開発が行われてきました。

光照射による毒性影響を考慮する可能性を持つ化学物質は、化粧品、医薬品から一般工業化学物質まで広範囲にわたるため、今後これらの安全性評価の必要性が増加すると考えられます。

2. ガイドライン等の現状

光細胞毒性試験は、OECDテストガイドライン「432, *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test」として2004年に標準化されています。

一方、光遺伝毒性試験は、米国ではFDAのCenter for Drug Evaluation and Research (CDER) から2000年に、光安全性のドラフトガイダンスとして公表されています。このガイダンスでは、ヒトで5年以上にわたり使用される可能性のある医薬品で、全身性暴露あるいは直射光に暴露される皮膚に塗布する場合には、当該医薬品が紫外線により発がん性を増大させるかどうかを評価する必要があるとしており、その評価項目の一つとして光遺伝毒性試験が挙げられています。また、EUではThe European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) のCommittee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) が、2000年に光安全性試験のガイダンスを公表しており、光安全性を光感受性（光刺激性及び光アレルギー）及び光遺伝毒性/光がん原性と解釈しています。2001年にCPMPが公表したNote for Guidance (NfG) のドラフトには、光安全性試験は、光毒性（光刺激性）、光アレルギー、光遺伝毒性、光がん原性の4指標を考慮すべきであることが示され、さらに、光安全性試験が考慮される医薬品の特性、光安全性試験の方法、試験戦略、当該医薬品の安全性評価に対する規制当局の考え方が示されています。

以上のように、海外ではいくつかのドラフトガイダンスが提出されており、具体的な試験手法については1999年、

ワシントンで開催された International Workshop on Genotoxicity Test Procedure (IWGTP) で試験法の標準化について国際的調和が図られています。

しかしながら、国内では試験法ガイドライン等の制定は未だなく、1980年頃よりキノリン系殺菌剤を主として光遺伝毒性のデータがとられてきましたが、規制目的ではなく海外動向への対応、研究レベルのデータ収集が主体でした。

3. 試験項目

光細胞毒性試験は、すでにOECDテストガイドラインに採用されている試験方法である「Balb/3T3細胞を用いる細胞毒性試験」を、光遺伝毒性試験は、「細菌を用いる光復帰突然変異試験」の基礎データの収集を行ってきており、本機構の遺伝毒性試験項目として追加しました。また、今後、*in vitro* 光小核試験についても基礎データ収集に向け検討していく方針です。

4. 試験に用いる光照射装置及び光スペクトル、照度測定装置

4.1 光照射装置

自然太陽光に近いスペクトルを照射できる SOL 500 (Dr. Honle) ランプを使用します。



左は照射装置、右はランプ

4.2 光スペクトル、照度測定装置



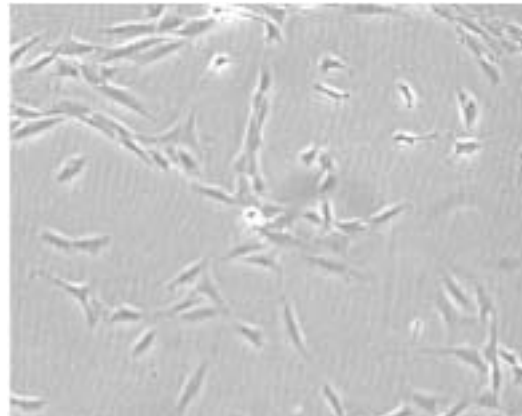
左はUVA照射量の測定装置、右はスペクトルラジオメータ

5. 試験方法の概略

5.1 Balb/3T3細胞を用いる細胞毒性試験

1) 使用細胞

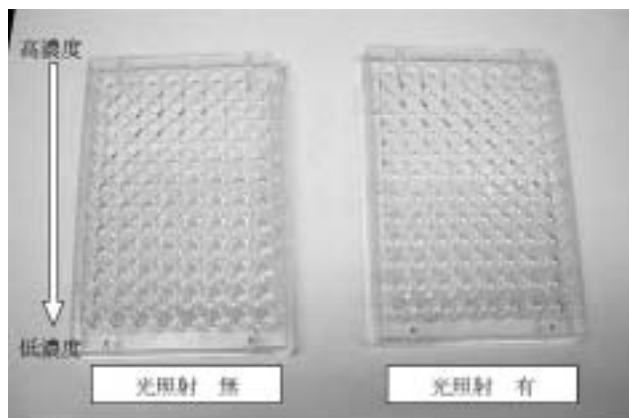
Balb/c 3T3細胞



試験に使用する Balb/3T3細胞

2) 試験方法

2枚の96ウェルプレートに細胞を播種し、被験物質液を加えます。1枚は5 J/cm²の光を照射し、もう1枚は暗所に保管します。



2枚の96ウェルプレート

原理的には、光照射によって細胞毒性を示す化学物質の場合、光を照射しない場合と比較して、照射することによって、より低濃度の被験物質で細胞が死亡するため、細胞内へのニュートラルレッドの取り込みが無くなることを指標にしています。

3) 結果及び評価

光細胞毒性の評価は、光照射しない場合では細胞毒性を示さない化学物質の用量群で、光照射した場合に細胞毒性を示すようになるかどうか光照射する場合としない場合のIC₅₀値の差によって評価を行います。光照射した被験物質のIC₅₀値が、光照射しない被験物質のIC₅₀値より低くなった場合、光照射により被験物質に細胞毒性が発現したと評価します。

5.2 細菌を用いる光復帰突然変異試験

1) 使用菌株:ネズミチフス菌 *S.tyhimurium* TA100, TA98, TA102

2) 陽性対照物質:Chlorpromazine Hydrochloride (CPZ), 8-Methoxypsoralen (8-MOP), Methylene blue (MB)

3) 試験方法

プレート法

試験物質液、試験菌液、リン酸緩衝液及び Top agar を加え、最少グルコース寒天平板培地に重層した後、光照射する方法。

菌懸濁法

試験物質液、試験菌液を加え光照射した後、リン酸緩衝液及び Top agar を加えて最少グルコース寒天平板に重層する方法。

4) 検討結果

照射強度は、光照射による生菌数及び復帰変異コロニー数への影響から、プレート法及び菌懸濁法とも、 $1.3\text{J}/\text{cm}^2$ 以下が適切でした。

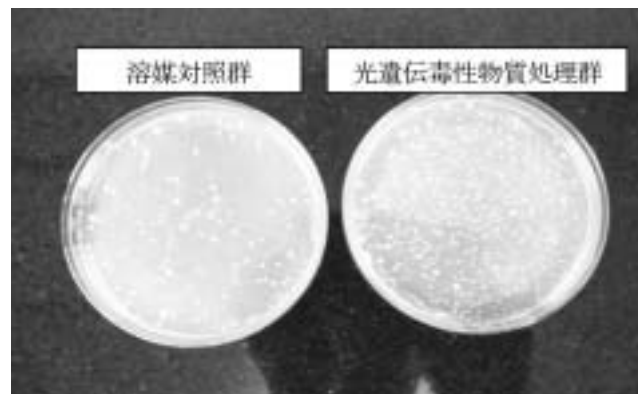
Chlorpromazine Hydrochloride は TA100 及び TA98 で、8-Methoxypsoralen は TA102 で、Methylene blue は TA100、TA102 及び TA98 での陽性対照物質として使用可能でした。

6. まとめ

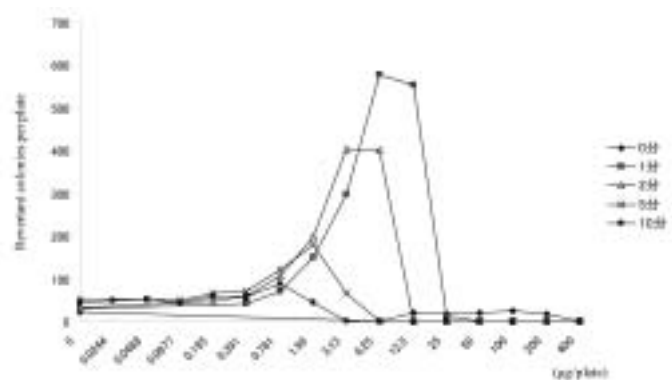
光細胞毒性試験及び光変異原性試験は、光照射による化学物質の毒性影響を評価する有効な試験法です。日田事業

所では、これらの試験も含め、今後も遺伝毒性に関する様々なご要望に迅速に応えていきたいと考えています。

(日田・小椋)



溶媒対照群及び光遺伝毒性物質による誘発した復帰変異コロニー



光照射時間と典型的な光遺伝毒性物質により誘発した復帰変異コロニー数

吸入暴露による中期ラット肝発がん性試験法（伊東法）の開発

1. はじめに

環境中での化学物質暴露の経路は、食物、飲料水による経口暴露に加え、発がんリスクアセスメントを行う上で大気による経気道的な経路は無視できません。

現在の発がん性試験は、多大なコスト、期間を要し、特に吸入試験では特別な設備、施設も必要となり、更にコストが増します。また、生産される化学物質数は、試験できる化学物質数を大きく上回り、十分な評価ができていないのが現状です。以上のことから吸入暴露における中期発がん性試験は重要な代替試験法の一つといえます。今回、吸入暴露による中期ラット肝発がん性試験法（伊東法）の開発についてご紹介します。

2. 中期ラット肝発がん性試験法（伊東法）の特徴

発がん二段階説に基づき、イニシエーターとして diethylnitrosamine を用い、2/3 肝部分切除を施行する 8 週間のモデルです。判定の指標として肝におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼ（GST-P）陽性細胞巢の数及び面積を画像定量解析します。

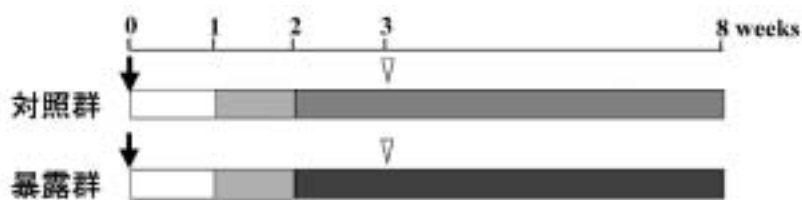
本法には以下の特徴があります。

- ・長期発がん実験の結果を短期間に予測できる。
- ・用量反応関係が明確であり、肝発がん性あるいは促進作用強度の推定が容易である。
- ・非遺伝毒性発がん物質の肝発がん性も検出できる。
- ・被験物質が少量で済む。
- ・開発経費（時間、動物等）を削減できる。
- ・マウスにのみ肝発がん性を示す物質も検出可能であるため、げっ歯類を代表できる肝発がん性検出法である。
- ・化学予防物質の検索にも応用できる。

つまり、本法は発がんリスクを検討する上で必要な多くの有用なデータを提供することができます。

3. 四塩化炭素吸入暴露による中期ラット肝発がん性試験（伊東法）

中期肝発がん性試験（伊東法）は現在までに、313 化合物で試験が行われています。その結果、肝発がん物質で



暴露: 6時間/日×6日間/週×6週間 (week 2~8)、鼻部暴露
 動物: F344/DuCrj (Fischer) 雄ラット、15匹/群
 ↓: ジエチルニトロソアミン(DEN)投与
 ∇: 2/3肝部分切除
 ■: 鼻部暴露用ホルダーへの馴化期間
 □: 空気対照群
 ■: 四塩化炭素暴露群 (1, 5, 25, 125 ppm)

図1 試験デザイン

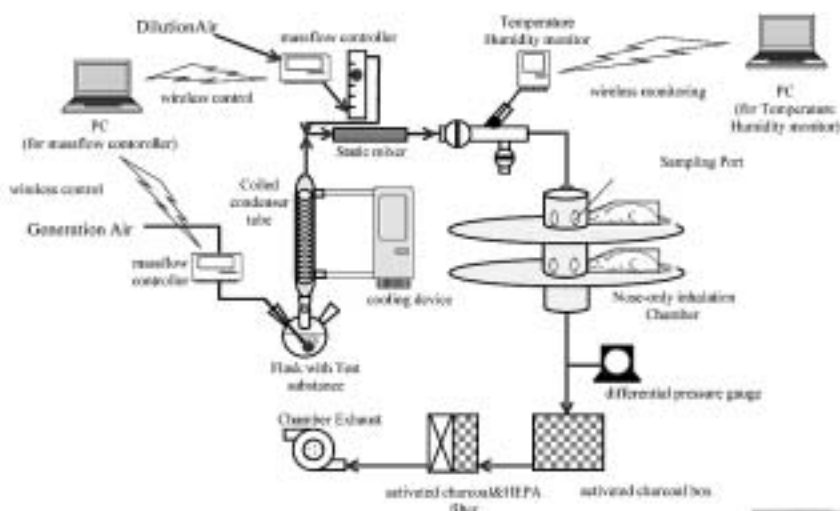


図2 鼻部暴露概略図

は60/65例(92%)が陽性で高い予測率を示しています。それら化合物の主な投与経路は、経口投与(混餌投与、飲水投与、強制経口投与)又は皮下投与です。ヒトの場合、化学物質の経口経路による摂取は、制限することが容易ですが、吸入経路での化学物質の摂取を意図的に制限することは困難です。それを考慮すると、吸入暴露による評価は非常に重要な情報を与えます。そこで、日田事業所では、発がんリスクによる揮発性発がん化学物質の四塩化炭素をモデルとし、吸入暴露長期発がん性試験代替法としての吸入暴露による中期肝発がん性試験法の有用性を検討しました。

試験方法として、動物種、週齢(6週齢F344雄ラット)処置(3週時における部分肝切除術)については中期肝発がん性試験法(伊東法)に準じて行いました。暴露方法として鼻部暴露を選択し、暴露用量は2年間の吸入暴露試験を参考に、空気対照群、1、5、25、125 ppm(各群15匹)としました。また、暴露時間及び頻度を6時間/日、6日/週暴露とした。試験デザイン及び鼻部暴露概略図を図1及び2に示します。主検索項目として肝臓の前癌病変の指標

であるGST-P陽性細胞巢の数及び面積を画像定量解析しました。

その結果、GST-P陽性細胞巢の定量的解析では、その数と面積とも25及び125 ppm群で有意な増加がみられました。また、2年間吸入試験による発がん性データでは125 ppm群で肝細胞癌が有意に増加している結果が得られています。GST-P陽性細胞巢が前癌病変であることを考慮すると、本結果が2年間吸入試験と相関があることが確認されました(図3)。

4.まとめ

今回、吸入暴露による中期肝発がん性試験が確立できたことで、8週間という短時間でヒトへの主な暴露経路を考慮した発がん性試験が可能になりました。化学物質の毒性のうち究極の毒性である発がん性に関するリスク評価の観点から、非常に重要な結果が得られたと考えます。

(日田・辻村)

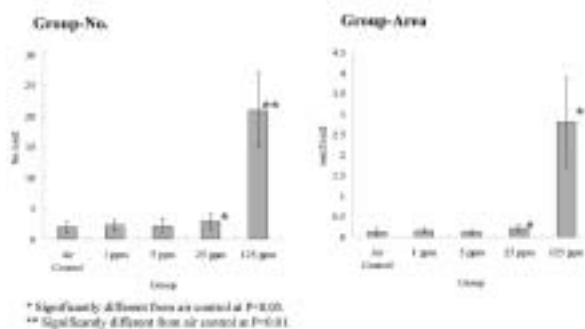
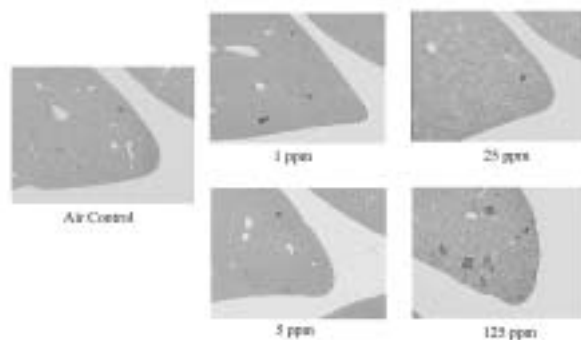


図3 GST-P陽性細胞巢計測結果
 (上: 免疫染色結果、下: 計測結果)

小動物専用採血具の有効性について

1. はじめに

現在、小動物（ラット、マウスなど）の採血には、後大静（動）脈採血法、心臓採血法、眼窩静脈叢採血法、尾静脈採血法など様々な手技が確立されています。しかし、そのほとんどはヒト用に開発された採血器材を使用するため、動物に過度の苦痛・ストレスを与える可能性があります。日田事業所では小動物専用の採血器材の開発・作製に取り組んできましたが、今回、「CERI NEWS 第35号」に掲載した採血具が特許として登録されました（特許第3683208号）。そこで、本稿では当事業所で開発した採血具を改めてご紹介するとともに、その有効性及び前臨床試験への応用例について説明します。

2. 採血具の概要

本採血具は、主に小動物の尾静脈より血液を採取する目的で開発したもので、25Gの針を装着した円錐型のプラスチック管（針部）と採血管部から構成されます（写真1）。プラスチック管内部には輪状の凸部が設けられており、毛細管やテフロンチューブなどを採血管として接続します。採血を行う場合には、プラスチック管を保持して針を静脈に刺入すると、毛細管現象により血液が自然に吸引されます。そのため、穿刺以外の操作は一切不用となり、片手で全ての操作が行えます。また、採血部の損傷も少なく、針と採血管の連結部も試料の損失を最小限に抑えられる設計になっています。

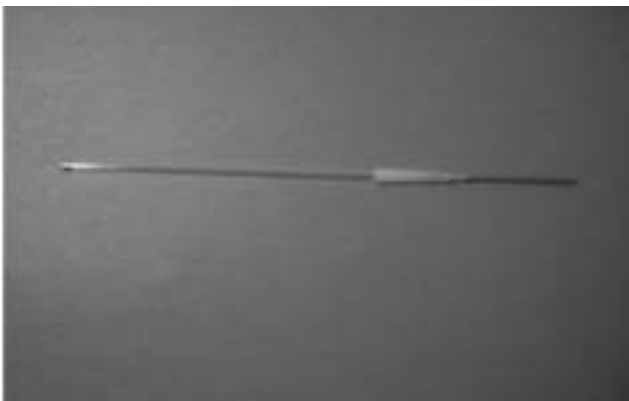


写真1 採血具

3. 採血具の有効性

当事業所で実施した検討結果及び前臨床試験への応用例を以下にご紹介します。

3.1 採血量及び組織液の混入防止

採血管として毛細管を使用した場合には、一度に約70 μ Lの血液採取が可能です。また、テフロンチューブを使用した場合には、チューブの内容積に合わせて更に多くの血液が採取可能となります。組織液の混入については、血

液生化学的検査値による評価を行っていますが、血液中への混入が非常に少ないことが確認されています。

3.2 ストレスの軽減効果

ストレス影響については、前号でKK-Ayマウスを用いた検討結果を掲載しました。しかし、本動物は糖尿病の研究に使用される特殊なモデル動物であり、前臨床試験で使用されるケースはほとんどありません。そのため、本稿では毒性試験などで一般に用いられるSDラットを用いた検討結果をご紹介します。本検討では、採血具及び従来法（剃刀による切開法）それぞれ2種類の方法を用いてSDラットの尾静脈から経時的に採血を行い、血漿中のコルチコステロン濃度を比較しました。その結果、従来法では採血2回目よりコルチコステロンの顕著な増加がみられましたが、採血具においては初回採血から最終採血時まで低い値で推移しました（図1）。コルチコステロンは副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンで、ストレス侵襲時に血漿中濃度が数十倍に増加することから、別名ストレスホルモンとも呼ばれています。このことから、採血具のストレス軽減効果が非常に高いことが確認されました。

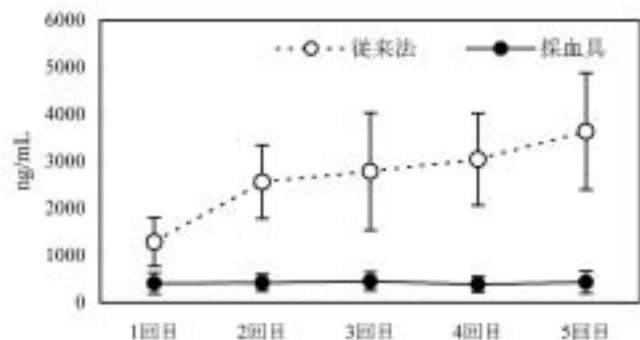


図1 頻回採血時におけるコルチコステロン濃度の比較

3.3 前臨床試験への応用

本採血具は、動物が小さいほどその効力を発揮します。そのため、主にマウスを用いた臨床検査に使用してきましたが、現在はトキシコキネティクス（TK）試験への応用について検討を進めています。TK試験の場合、同じ動物から経時的に採血する方法が望まれますが、従来の採血法では動物へ過度のストレスを負荷するため、採血ポイントごとに新しい動物を使用しているのが現状です。しかし、本採血具を使用した場合には、頻回採血による動物へのストレスを軽減できるため、同一動物を用いたTK試験が可能となり、動物数削減に寄与することができます。以下に、ラットに鼻部吸入暴露した際のTK試験結果を示します。本試験では被験物質を125 ppm暴露した後、同じ動物から経時的に血液を採取していますが、血中濃度はほぼ理想

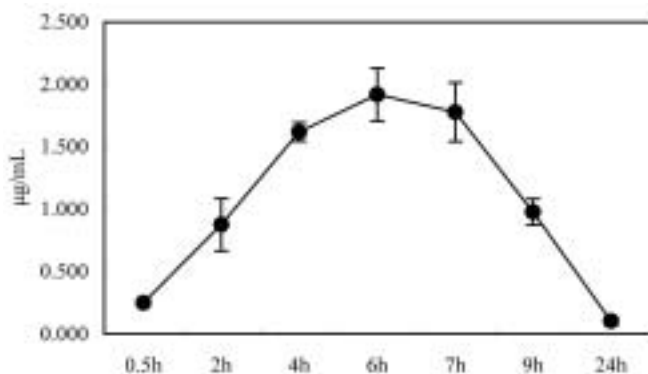


図2 鼻部吸入暴露時の血中濃度の推移

的な推移を示しており、採血後の動物にも異常は認められませんでした（図2）。また、特筆すべき点として、鼻部吸入暴露の場合、動物をホルダーに保定するために採血部位が尾部に限定されることから、本採血具以外ではTK試験の実施が困難であることを確認しています（写真2）。

4. まとめ

当事業所で開発した採血具は、小動物専用の採血具として汎用性が非常に高いことが確認されています。また、動物に対するストレス軽減効果も実証されており、動物愛護の観点からも推奨すべき実験器具と思われます。そのため、今後は学会・学術会を通じて本採血具の普及に努めるとともに、前臨床試験における更なる技術開発に貢献したいと考えています。

（日田・東原）



写真2 鼻部吸入暴露時の採血風景

特集 （安全性評価技術研究所）

EUの新化学品規制 REACH 案

REACHとは

REACH (Regulation on Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals) は、EUが導入を目指している化学物質の登録、制限、認可及び評価に関する新しい規制案です。2003年10月29日に欧州委員会案が公表され、現在も欧州議会で審議中です。そのため、内容変更の可能性はありますが、現時点でのREACH案について紹介します。



図1 REACH全体の流れ

ポイント : 既存物質・新規物質の区別はない

現時点では、「危険な物質の分類、包装及び表示に関する理事会指令（67/548/EEC）」に基づき、EINECS（欧州既存商業化学物質インベントリー）やNLP（ポリマーとみなされない物質）リストに記載されていない新規化学物

質は、上市（販売の意）の前に届出が必要ですが、REACHでは既存物質も対象となります。（EU域内での）製造量・（EUの）輸入量が年間1トン以上の化学物質は、原則としてEU域内での上市に際し有害性、用途等の情報の登録が必要となります。

ポイント : 登録は事業者ごとに実施

事業者ごとにその製造・輸入量に応じて要求される情報を登録することが基本であり、同じ物質を複数の事業者が登録することになります。ただし、コンソーシアムを組み、共同で提出することも可能です。なお、登録の義務があるのは、EU域内の製造業者と輸入業者です。日本から輸出する場合は、代理人を立てて、輸入業者の代行をするなどの対応が必要です。また、製造・輸入業者が登録していない用途での使用には、使用者（川下ユーザー）自らが登録します。

ポイント : 年10トン以上は有害性評価の実施が必要

製造・輸入量が年10トン以上になると、収集した情報を基に有害性評価（当該物質の有害性はどの程度か）が必要となります。その結果、一定以上の有害性があると分類されると、更に暴露評価（人や環境中の生物がどのくらいの量の当該物質に曝されるか）及びリスク評価（有害性と暴露評価から人の健康や生物に影響を与えるかどうか）を行い、許容できるリスクとするための適切な方法の提示が求められます。

ポイント：認可、制限の対象となる場合がある

登録された情報は、EU加盟各国当局などが評価を行います。大部分の物質はこの時点で製造・輸入が可能となると言われてはいますが、有害性に関して人や生物に非常に高い懸念がある物質と判断された場合、用途ごとに認可（条件付で使用可）あるいは制限の対象となります。発がん性物質などが候補に挙がっています。

ポイント：製品中の化学物質の一部も対象

1) 一定以上の有害性ありと分類された物質が、2) 製品中に合計1トン以上用いられている、3) 使用中に外部へ放出される、という条件を満たすと登録又は届出対象となります。ただし、具体的な対象製品は明確になっていません。

REACHの施行時期

表1 「段階的導入物質」の登録猶予期間（施行後）

製造・輸入量等	猶予期間	事前登録
1,000トン/年以上、またはCMRのカテゴリー1、2*に該当	3年	1年6ヶ月
100～1,000トン/年	6年	4年6ヶ月
1～100トン/年	11年	4年6ヶ月
製品中化学物質	11年3ヶ月	—

*CMRは、発がん性、変異原性、生殖・発生毒性を示す。例えば、発がん性のカテゴリー1は人に対して発がん性があることが知られている物質、カテゴリー2は人に対して発がん性があると見なすべき物質。

2007年頃の施行と予想されますが、現在も欧州議会で審議中であり、遅れる可能性もあります。施行された場合、既存化学物質であり、施行前15年間に製造・輸入された実績がある物質は、「段階的導入物質」とされ、一定期間登録が猶予されます。ただし、事前登録（登録予定の化学物質名称、事業者名など）をしないと猶予は適用されません。

REACH登録に必要な情報

下記の(1)(2)は必須、製造・輸入量が10トン/年以上の場合は(3)も必要です。

(1) Technical Dossier（技術一式文書）

一般登録情報、物質の製造と用途に関する情報、分類と表示、安全使用ガイドランス（MSDS相当）など

(2) 製造・輸入量に応じた物理化学的性状、有害性及び生態毒性情報（表2参照）

なお、製造・輸入量の区分は、1～

10トン、10～100トン、100～1,000トン及び1,000トン以上の4段階に分かれています。製造・輸入量の区分が上がると、要求される項目が増えます。なお、100トン以上で要求される情報については、情報があれば提出しますが、ない場合は適切な試験方法とタイムスケジュールを提案し、試験実施の必要性の判断を待つことになります。

(3) Chemical Safety Report（化学物質安全評価書）
有害性評価（必要に応じて暴露評価、リスク評価を追加）

REACHへの準備

事業者が当面準備すべきこととして、次の(1)～(3)があります。

(1) EUへ輸出している商品の確認

(2) 名称などの整理

化学物質名称の整理、既存物質かどうか、輸出量、用途の確認

(3) 情報の収集、評価

物理化学的情報、有害性情報の有無

EUの危険性分類基準による分類

このうち(3)については、収集した情報がREACHの要求する水準を満たしているかの評価を行い、もし情報が足りない場合は、追加試験を行うなどの対応が必要です。

本機構では、REACH登録の支援として、文献を検索・査読する情報収集・評価の業務と、登録に必要な文献データがない場合は、推奨される試験の提示・実施の業務を行う所存です。

（評価研・窪田）

表2 製造・輸入量に応じて要求される有害情報など

要求される情報	製造・輸入量（トン/年）			
	1～10	10～100	100～1,000	1,000以上
1.物理化学的性状				
物質の状態、融点・凝固点、沸点、比重、蒸気圧、表面張力、水溶解度、分配係数、引火点、可燃性、爆発性、自然発火温度、酸化性、粒度分布	○	○	○	○
溶剤中安定性、解離定数、粘度			○	○
2.ヒト健康への有害性				
皮膚刺激性、眼刺激性、皮膚感作性	○	○	○	○
変異原性	○	○	○	○
急性毒性		○	○	○
反復投与毒性		○	○	○
生殖発生毒性		○	○	○
トキシコキネティクス		○	○	○
発がん性				○
3.生態毒性				
水生生物毒性試験	○	○	○	○
生物的分解性		○	○	○
加水分解性		○	○	○
分解生成物の特定			○	○
環境中運命及び挙動		○	○	○
陸生生物毒性試験			○	○
鳥類毒性試験				○
4.入手可能なその他の物理化学的、有害性、生態毒性情報	○	○	○	○
5.検出及び分析法			○	○

注）同一試験項目でも製造・輸入量の区分が上がると、より長期、より多くの動物種など、要求される試験内容が変わる。

海外出張報告

2005年8月30日から4日間、ハワイ・カウアイ島の RADISSON KAUAI BEACH RESORT にて ICEM2005 satellite meeting: Toxicogenomics が行われ、様々なトキシコゲノミクス関連の研究について発表があり、活発な討論が行われました。筆者は、初日のポスターセッションにおいて、「PREDICTION OF HEPATOCARCINOGENICITY OF CHEMICALS USING THE GENE EXPRESSION IN THE 28-DAY REPEAT-DOSE TOXICITY STUDY」(28日間反復投与試験における遺伝子発現データを用いた発がん性予測)というタイトルで発表を行いました。その内容としては、発がん性が既知の化合物を用いて28日間の反復投与試験を行い、得られる肝臓のサンプルにおける遺伝子発現変動をマイクロアレイで測定したデータをもとに簡易で高精度な発がん性予測法を開発した、というものです。

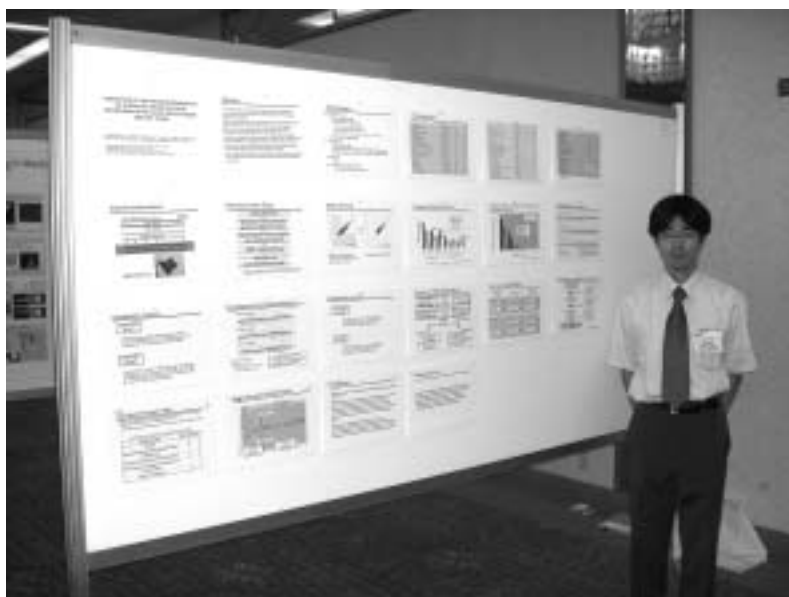
近年、生体中の遺伝子の発現量の網羅的な測定を可能にするマイクロアレイが実用的な手段となり、化学物質暴露を受けた生物に毒性が発現される最初の生体内現象である遺伝子の発現量変動から毒性を評価するトキシコゲノミクスの開発が進められています。この方法は、作用機序に基づく毒性評価が可能であり、ヒトへの外挿が容易となるなどが期待されています。NEDOでは、平成13年度から5年間でトキシコゲノミクス手法を用いて発がん性の高精度で簡易な予測法を開発することを目指した「高精度・簡易有害性(ハザード)評価システム開発」を実施しており、本機構もこのプロジェクトに参加しています。今回の発表ではこのプロジェクトで得られた成果の一部を発表しました。発表の内容は次のとおりです。

最初に、発がん物質を遺伝子発現変動のパターンが類似のグループに分け、各グループの発がん物質に対して発がん性予測式を作成しました。遺伝子発現変動パターン分類は、教師無し分類手法*の一つである階層的クラスタリングという統計的手法を用いて行い、その結果、3つのグループがあることがわかりました。次に、各グループの発がん性物質の投与で特徴的な発現変動を示す遺伝子を統計的手法により選定し、サポートベクターマシンという手法により各グループの発がん物質を高確率で予測できる予測式を作成しました。作成した複数の予測式を組み合わせ、未知の物質の発がん性予測が行えるようなシステムを構築しました。内部データを用いて発がん性予測を行ったところ、予測率は83.1%、毒性予測法を実用化するとき重要な偽陰性率(非発がん物質と予測した確率)は5.1%でした。

2時間ほどの発表の間に10数名討論を行ったところ、予測率が高く、かつ偽陰性率が非常に低いのが良いというコメントが多く、また、予測に使った遺伝子の中に、発がんとの関連が示唆される遺伝子も含まれているという結果についても非常に興味深いとのコメントをいただきました。現在、今回発表した方法を改良するとともに別の手法を用いた予測法を開発中です。

(評価研：松本)

*分類に関連があると考えられるデータ(教師データ)、例えば、発がん性に関連する情報など、を必要とせず、相関係数などを基準に類似する物同士をグループ化する分類手法。



アスベスト（石綿）の分析

アスベスト(石綿)による健康被害が大きな社会問題となり、国及び地方公共団体では、アスベストの使用、健康障害、大気中濃度等の実態調査を行っています。平成17年7月1日には、「石綿障害予防規則」が施行され、アスベストを含有する建築物等の解体等の作業を行うときには、あらかじめ石綿等の使用の有無を調査し、その結果、石綿等の使用の有無が明らかとならなかったときは、原則として分析による調査を行うこととなりました。

本機構では、平成元年にアスベストが特定粉じんと指定されて以来、建材及び作業環境・室内環境等のアスベストを中心に、アスベストの分析を実施しています。



X線回折装置(PANalytical X'Pert PRO)

受託項目

- ◆ サンプリング
- ◆ 位相差顕微鏡による定性(分散染色法)
- ◆ 位相差顕微鏡による定量(計数法)
- ◆ X線回折法(XRD)による定性
- ◆ X線回折法(XRD)による定量(基底標準吸収補正法)
- ◆ 電子顕微鏡(SEM)による定性(形態観察)
- ◆ 微分熱重量分析(DTG)によるクリソタイルの定量

お問合せ先

東京事業所 環境技術部・高分子技術部
〒345-0053 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番
TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521
大阪事業所 技術第二課
〒543-0033 大阪市天王寺区堂ヶ芝1丁目6番5号
TEL 06-6771-5157 FAX 06-6772-6049

編集後記

第51号秋季号をお届けいたします。
日一日ごとに秋の深まりが感じられる季節になりましたが、いかがお過ごしでしょうか。
巻頭言は、大阪市立大学大学院 医学研究科研究科長兼医学部長 福島昭治先生から「発がん物質の閾値：新しい概念の導入」という表題で頂戴いたしました。誠にありがとうございました。今回の特集は、化

学物質安全部門 として日田事業所及び安全性評価技術研究所について掲載させていただきました。

今回も内容についてのアンケートをさせていただきましたが、皆様のご意見を参考にしてよりよいCERI NEWSにしていきたいと考えております。今後とも一層のご指導とご支援を賜りますようお願い申し上げます。
(企画・本橋)

化学物質評価研究機構
ホームページ

<http://www.cerij.or.jp>

CERI NEWS 第51号 秋季号 発行日 平成17年10月
編集発行 財団法人 化学物質評価研究機構 企画部
〒112-0004 東京都文京区後楽 1-4-25 日教販ビル7F
Tel:03-5804-6132 Fax:03-5804-6139 mail to:cerinews@ceri.jp

古紙配合率100%再生紙を使用しています 