ヘンリー定数を用いる揮発性化学物質のための Ames 試験法選択基準の構築

発　表　者：坪倉　美文（日田事業所）
共同研究者：森岡　大貴（日田事業所）
藤島　沙織（日田事業所）

1.　背景及び目的

発がん性のスクリーニング試験である細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）は、日本国内においては新規化学物質の届出の際に化審法や安衛法等で要求される試験である。Ames 試験では試験菌株と化学物質を 37℃でインキュベートする必要があるため、この試験条件でも試験菌株へ確実にばく露可能となるよう、本機構では定法（プレート法及びプレインキュベーション法）、プレインキュベーション法を改良した密閉法及びガスばく露法の 4 種の Ames 試験法から、化学物質の物理化学的性状に応じて、いずれかの試験法を選択している。揮発性化学物質については、これまでに沸点及び対水溶解度を用いる Ames 試験法選択基準（図 1）が報告されているものの、定法及びガスばく露法のみの選択基準であり、密閉法については基準がない。また、新規化学物質においては、沸点及び対水溶解度の実測値が併せて得られていることは少ないため、図 1 を適用できない場合がある。以上のことから、試験条件下での存在状態が予測し難い揮発性化学物質に適用する Ames 試験法は経験的に選択する場合がほとんどである。本研究ではこれらの課題を解決するために、3 つの検討を行い、物理化学的パラメータの実測値が得られない揮発性化学物質に適用可能な、新たな試験法選択基準の構築を試みた。

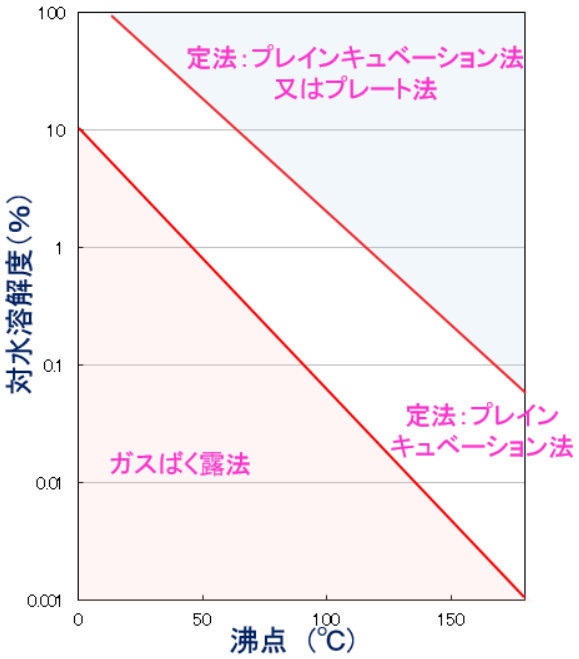


図 1　既報 [1] の Ames 試験法選択基準

2.　方法

2.1　EPI Suite™ で得られる物理化学的パラメータ予測値の適用性確認

ガスばく露法で変異原性が検出される 19 物質 [1] について、化学物質の物性等情報の

推算ツールである EPI Suite™(The Estimations Programs Interface for Windows、アメリカ環境保護庁)を用いて沸点及び対水溶解度の予測値を算出した。これらの予測値を図 1 にプロットし、実測値と比較した。

2.2　より優れた試験法選択基準となり得る物理化学的パラメータの検討

物質の存在状態に関する物理化学的パラメータのうち、これまで Ames 試験法選択基準には使用されていない蒸気圧及びヘンリー定数（HLC）に着目し、横軸を EPI Suite™ による予測値、縦軸を実測値として、揮発性化学物質：135 物質[1)2)]をプロットし、近似曲線を描き相関を検証した。さらに、各種 Ames 試験で変異原性を有することが報告されている揮発性化学物質 38 物質について、図 2 のように各種試験法における変異原性検出結果をカテゴリー化し、物理化学的パラメータ（予測値）との関係を解析した。

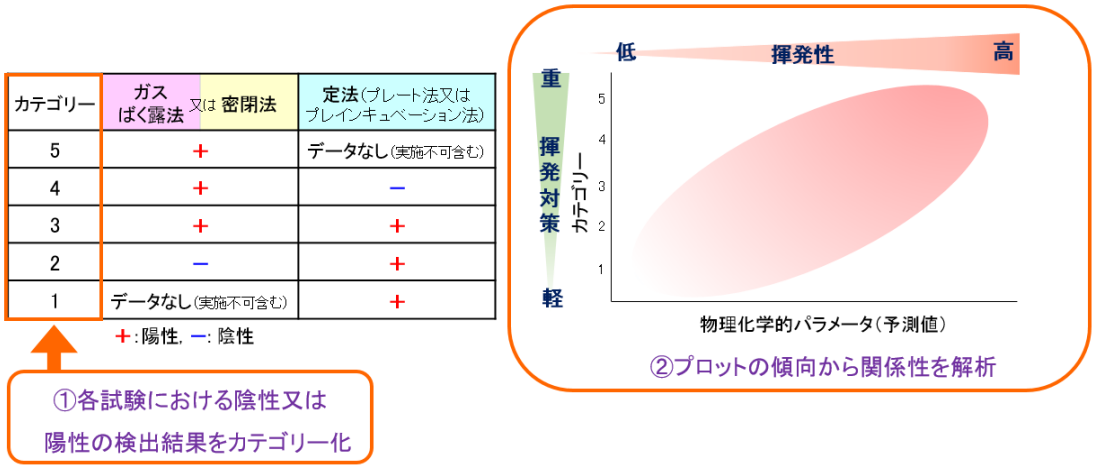


図 2　変異原性検出能と物理化学的パラメータ（予測値）の関係の解析方法

2.3　Ames 試験法選択基準の構築

これまでに試験法選択基準が報告されていない密閉法について、定法及びガスばく露法との境界となる Log[HLC]を決定するため、変異原性が既知で異なる Log[HLC]を持つ 6 つの揮発性化学物質の定法又は密閉法での Ames 試験を実施するとともに、密閉法で変異原性が検出される 8 物質を加えた計 14 物質の Ames 試験結果を元に基準となる Log[HLC]を解析した。

3.　結果

3.1　EPI Suite™ で得られる物理化学的パラメータ予測値の適用性確認

図 1 における予測値と実測値を比較した結果、19 物質中 17 物質は、EPI Suite™ の予測値においても実測値と同一の Ames 試験法選択基準内にプロットされた（図 3)。また、19 物質中 2 物質（Propylene oxide 及び 2-Nitropropane）は、予測値では異なる基準内にプロットされたものの、いずれも当該基準で選択されるプレインキュベーション法においても変異原性が検出されていることから、変異原性の判定結果の一致率

は 100%であった。以上の結果から、EPI Suite™による予測値は既報[1)]の Ames 試験法選択基準に使用可能であると判断した。

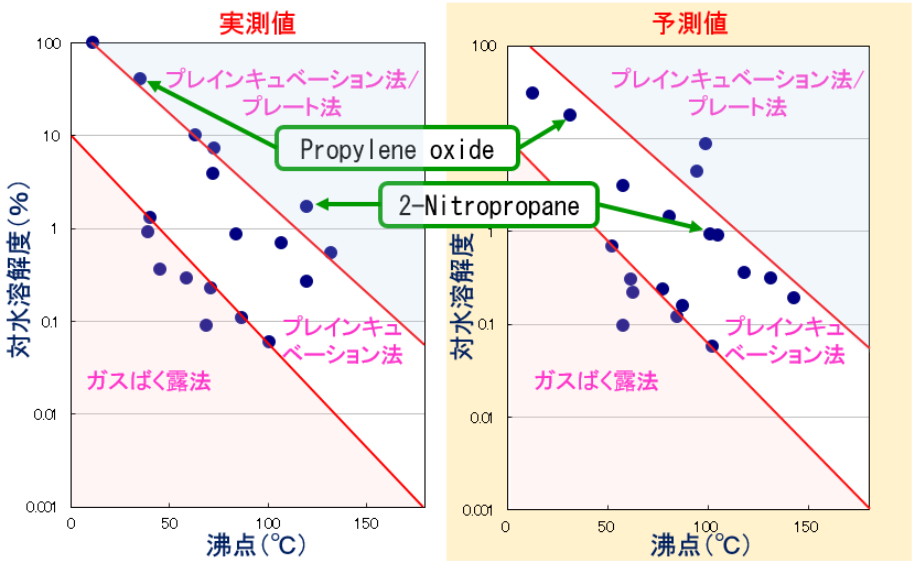


図 3　既報[1)]の Ames 試験法選択基準における実測値と EPI Suite™の予測値の比較

3.2　より優れた試験法選択基準となり得る物理化学的パラメータの検討

蒸気圧及びヘンリー定数（HLC）について、近似曲線の相関係数(r)はいずれも 0.95 以上であり、EPI Suite™による予測値の精度が十分高いことが確認された。しかしながら、変異原性検出能カテゴリーを用いた解析では、蒸気圧については、予測値では蒸気圧が大きい（揮発性が高い）ものの、揮発性対策を講じる試験で陰性が検出される等、信頼性の低い値がみられた。一方、Log[HLC]については、変異原性検出能カテゴリーと物理化学的パラメータの良好な関係が見いだされたことから、Log[HLC]を基準とすることで、より適切な試験法を選択できる可能性が示唆された。

3.3　Ames 試験法選択基準の構築

14 物質の Ames 試験結果の一覧を表 1 に示す。Log[HLC]が−2.4 未満となる 6 物質については、密閉法及び定法のいずれにおいても変異原性が検出されており、また、変異原性の強度は試験法により大きな差がないことがわかった。Log[HLC]が−2.4 を超える 8 物質については、定法で陰性となる傾向があり、密閉法ではより高感度で変異原性を検出可能であることがわかった。さらに、Log[HLC]が−2.4 から−1.5 までの物質のうち、4 物質（1-Bromobutane、Trichloroethylene、Bromoethane、Allylchloride）は図 1 ではガスばく露法が推奨とされる選択基準内に位置した物質であるものの、より簡便な密閉法でも変異原性が検出可能であることが示された。以上の結果を元に、Log[HLC]が−2.4 及び−1.5 を境界とした Ames 試験法選択基準を構築した（図 4）。

表 1　揮発性化学物質の Ames 試験結果

揮発性化学物質	Log[HLC]	ガス ばく露法	密閉法	プレインキュベーション法	プレート法
Iodoethane	−1.51	(+)	(+)	データなし	(−)
1-Bromobutane	−1.72	(+)	(+)	(−)	(−)
Trichloroethylene	−1.79	(+)	(+)	(−)	データなし
Bromoethane	−1.84	(+)	(+)	(−)	データなし
1-Bromopropane	−1.85	(+)	±	(−)	(−)
Allylchloride	−1.92	(+)	(+)	+	(−)
Chlorodibromomethane	−2.12	(+)	+	(−)	−
Dichloromethane	−2.36	(+)	+	(−)	(−)
1-Bromo-2-chloroethane	−2.55	(+)	(+)	(+)	(±)
1,2-Dichloroethane	−2.82	(+)	+	(+)	(−)
2-Nitropropane	−3.65	(+)	(+)	(+)	データなし
Benzylchloride	−3.79	(+)	(+)	(+)	(±)
Acrylonitrile	−3.82	(+)	+	(+)	+(±)
Epichlorohydrin	−4.37	(+)	(+)	(+)	(+)

(): 既報の Ames 試験結果[1)]、赤字：CERI 実施の試験結果
+: 陽性、−: 陰性、±：疑陽性

4.　結論

ヘンリー定数を用いる新たな Ames 試験法の選択基準を適用することで、化学物質の物理化学的性状に応じた適切な試験を実施できると考えられる。また、既報[1)]の選択基準ではガスばく露法が推奨されるような化学物質でも、新たな選択基準を用いることで、ガスばく露法より簡便な密閉法で変異原性を検出可能な場合があることが明らかとなった。

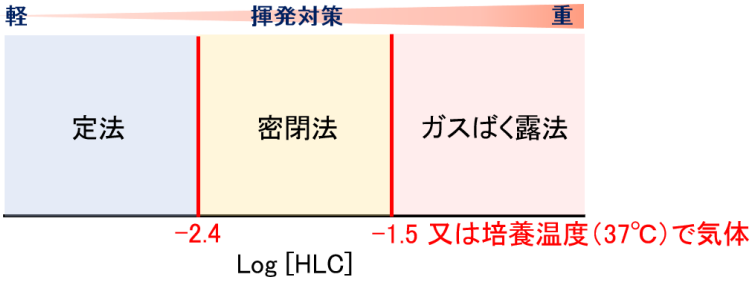


図 4　ヘンリー定数を用いる揮発性化学物質のための Ames 試験法選択基準

5.　参考文献

1) Araki et al., 1994, Mutation Research, 307, 335-344
2) 揮発性有機化合物(VOC)に該当する主な物質：環境省通知[環管大発第 050617001 号]