

【概要】In vitro データのみで GHS 変異原性分類は可能か？

◆ここがポイント◆

- ✓ 変異原性における in vitro 試験と in vivo 試験の特徴
- ✓ 複数の in vitro 試験で陽性だが in vivo 試験で陰性を示す物質
- ✓ In vitro 試験だけでは過剰分類となりやすく、変異原性分類には不十分
- ✓ 総合判断(WOE や MOA の考慮)が不可欠

NITE ケミマガ

【2026/03/11】

<GHS> <Mutagenicity>

• Can we conclude on mutagenicity classification based in in vitro data only?

→ <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC145137>

「in vitro データのみに基づいて変異原性分類を結論づけることができるのか」と題する JRC のレポートが掲載された。

【背景】

2026 年 3 月 19 日付け【NITE ケミマガ】NITE 化学物質管理関連情報第 767 号に、「in vitro データのみに基づいて変異原性分類を結論づけることができるのか」と題する JRC (European Commission, Joint Research Centre) のレポート¹⁾情報が掲載された。JRC のレポートは、標準的な in vitro 試験のみで、in vivo 試験による確認なしに、特定のケースにおいて化学物質を変異原性分類するのに十分かどうかを調査することを目的としている。変異原性は、in vitro 試験が規制に導入された最初の毒性分野であり、約 50 年のデータの蓄積がある。また、in vitro 試験には迅速、低コスト、高感度といった強みがある。NAMs (New Approach Methods) による非動物試験への期待が高まっているなか、JRC レポートは、in vitro 試験の「実力」を知り、その「適切な利用」を考える上で貴重な検証といえる。以下は、JRC レポートの要約である。なお、本概要では「変異原性」と「生殖細胞変異原性」は同義として扱っている。

【詳細】

1. In vitro 試験と in vivo 試験

化学物質の変異原性は通常、in vitro 試験および in vivo 試験の組み合わせで評価される。しかし実務上は in vitro データしかないケースが多い。そこで「in vitro の結果だけで分類してよいのか？」が問題となる。変異原性における in vitro 試験 (Ames 試験、染色体異常試験、小核試験、哺乳類細胞遺伝子突然変異試験[MCGM]など) の特徴は、長所として、迅速、低コスト、高感度、動物不使用、スクリーニング適性があり、短所として、偽陽性が多い、生体内での代謝・修復・吸収などを反映できない、高濃度曝露による非特異的影響の出現、試験条件による結果のばらつきなどが挙げられる。したがって、in vitro で陽性で

も実際の体内では解毒される、あるいは DNA 修復されることがあり、in vivo では陰性になるケースが多い。つまり in vitro 陽性だからといって、必ずしも実際の生体内での変異原性を意味しない。一方、in vivo 試験では、実際の曝露状況、代謝プロセス、DNA 修復機構が反映されるため、より現実的なハザード/リスク評価が可能となる。

2. GHS 変異原性分類と in vitro データのみでの分類可能性の検証方法

GHS における(生殖細胞)変異原性は、以下に分類される*(表1)。

- 区分 1A:ヒト生殖細胞に経世代突然変異を誘発する
- 区分 1B:ヒト生殖細胞に経世代突然変異を誘発すると見なされる
- 区分 2:ヒト生殖細胞に経世代突然変異を誘発する可能性がある

そこで、in vitro 陽性だけで区分 2 に入れるべきかどうかの検証を行った^{**}。公開データであり、かつ in vivo 遺伝毒性データが入手可能な 713 物質を分析対象とした。

*: 現在、これらの分類基準は GHS の非公式作業グループによって改訂中である。その理由は、区分 1B における生殖細胞変異原性に関する化学物質の分類が、基準の解釈における意見の相違と、それに伴う分類の困難を引き起こしたためである。この議論は、EU の REACH に関する情報要件の改訂を促し、in vivo 体細胞試験が陽性の場合、in vivo 生殖細胞試験が義務付けられることとなった²⁾。

** In vivo 体細胞変異原性物質は区分 2 に分類されることに留意する必要がある。体細胞変異原性物質は発がん性との強い相関関係から、重大なハザードとみなされる可能性がある。このことから、ヒトをより良く保護するために、変異原性(体細胞変異原物質を含む)に関する新たなハザードクラスを作成する必要があるかどうかについても、GHS の非公式作業グループレベルで議論が開始されている。

表 1:生殖細胞変異原性物質の有害性区分

区分 1:ヒト生殖細胞に経世代突然変異を誘発することが知られているかまたは経世代突然変異を誘発すると見なされている物質

区分 1A:ヒト生殖細胞に経世代突然変異を誘発することが知られている物質

ヒトの疫学的調査による陽性の証拠。

区分 1B:ヒト生殖細胞に経世代突然変異を誘発すると見なされるべき物質

(a) 哺乳類における in vivo 経世代生殖細胞変異原性試験による陽性結果、または

(b) 哺乳類における in vivo 体細胞変異原性試験による陽性結果に加えて、当該物質が生殖細胞に突然変異を誘発する可能性についての何らかの証拠。この裏付け証拠は、例えば生殖細胞を用いる in vivo 変異原性/遺伝毒性試験より、あるいは、当該物質またはその代謝物が生殖細胞の遺伝物質と相互作用する機能があることの実証により導かれる。または

(c) 次世代に受継がれる証拠はないがヒト生殖細胞に変異原性を示す陽性結果;例えば、ばく露されたヒトの精子中の異数性発生頻度の増加など。

区分 2:ヒト生殖細胞に経世代突然変異を誘発する可能性がある物質

哺乳類を用いる試験、または場合によっては下記に示す in vitro 試験による陽性結果

(a) 哺乳類を用いる *in vivo* 体細胞変異原性試験、または

(b) *in vitro* 変異原性試験の陽性結果により裏付けられたその他の *in vivo* 体細胞遺伝毒性試験

注記: 哺乳類を用いる *in vitro* 変異原性試験で陽性となり、さらに既知の生殖細胞変異原性物質と化学的構造活性相関を示す物質は、区分 2 変異原性物質として分類されるとみなすべきである。

出典：改訂第 10 版 GHS (UN, 2023; GHS 関係省庁連絡会議 仮訳)

3. 検証結果

3.1. *In vitro* 試験陽性の組み合わせと *in vivo* 試験結果(表2)

713 物質のうち 111 物質が Ames 試験と *in vitro* 哺乳類細胞小核試験(MNvit)の両方(1 番目の組み合わせ)で陽性であった。111 物質のうち、83 物質は少なくとも 1 つの *in vivo* 試験で陽性で、17 物質は *in vivo* 試験で判定不能であった。さらに、7 物質は *in vivo* 不定期 DNA 合成(UDS)試験で陰性であったがその陰性結果は信頼性に欠けると判断され、残りの 4 物質はすべての *in vivo* 試験で陰性であった。同様に、713 物質のうち 103 物質が *in vitro* 哺乳類細胞遺伝子変異試験(MCGM)と MNvit 試験の両方(2 番目の組み合わせ)で陽性であった。103 物質のうち、81 物質は少なくとも 1 つの *in vivo* 試験で陽性であり、17 物質は *in vivo* で判定不能であった。*In vivo* UDS 試験の陰性結果に信頼性が欠けると判断されたのは 2 物質のみで、残り 3 物質はすべての *in vivo* 試験で陰性であった。Ames 試験、MCGM、および *in vitro* 哺乳類染色体異常試験(CA_{vit})の全て(3 番目の組み合わせ)で陽性となった物質の数は、最初の 2 つの組み合わせよりもわずかに多かった(713 物質中 137 物質)。これらの 137 物質のうち、99 物質は少なくとも 1 つの *in vivo* 試験で陽性で、33 物質は *in vivo* 試験で判定不能であった。この組み合わせでは、信頼性の低い UDS 陰性結果を示したのは 2 物質のみで、残り 3 物質はすべての *in vivo* 試験で陰性であった。総合的に、今回の分析では、陽性となった *in vitro* 試験の組み合わせのほとんどが、少なくとも 1 つの *in vivo* 試験でも陽性であることが確認された。

表 2: In vitro 試験組み合わせで陽性の物質数とその in vivo 試験組み合わせの結果 (JRC レポート Table 5¹⁾)

In vitro battery	Substances positive across in vitro battery/total	In vivo studies	Inconclusive			
			Positive (at least in one in vivo test)	Inconclusive	Negative UDS unreliable	Negative across all endpoints
Ames ⁺ MNvit ⁺	111/713	TRG ⁺ OR DNA damage ⁺ AND DNA damage OR MNviv ⁺ OR CAviv ⁺	83	17	7	4 (4%)
MCGM ⁺ MNvit ⁺	103/713		81	17	2	3 (3%)
Ames ⁺ MCGM ⁺ CAvit ⁺	137/713		99	33	2	3 (2%)
Ames ⁺ MNvit ⁺ CAvit ⁺	86/713		66	13	5	2 (2%)
MCGMvit ⁺ MNvit ⁺ CAvit ⁺	84/713		68	13	1	2 (2%)
MCGM ⁺ AND (MNvit ⁺ AND/OR CAvit ⁺)	199/713		140	46	7	6 (3%)
Ames ⁺ AND (MNvit ⁺ AND/OR CAvit ⁺)	327/713		221	75	24	7 (2%)

Source: JRC analysis

「+」＝陽性、「Ames+」＝Ames 試験陽性、「MNvit+」＝in vitro 哺乳類細胞小核試験陽性、「MCGM+」＝in vitro 哺乳類細胞遺伝子変異試験陽性、「CAvit+」＝in vitro 哺乳類細胞染色体異常試験陽性、「TRG+」＝トランスジェニック齧歯類細胞遺伝子変異試験陽性、「DNA damage+」＝in vivo 哺乳類 UDS 試験陽性、「MNviv+」＝in vivo 哺乳類小核試験陽性、「CAviv+」＝in vivo 哺乳類染色体異常試験陽性。

3.2. In vitro 試験の全組み合わせで陽性ながら in vivo で陰性を示した物質

AMP397、HC ブルー12、コウジ酸、p-フェニレンジアミン、オイゲノール、HC レッド 3、2-ヒドロキシエチル ピクラミン酸、1,2-ジクロロベンゼンおよび 2,5-ジアミノトルエンの 9 物質は in vitro 試験の全組み合わせで陽性であったが、実施した全ての in vivo 試験で陰性を示した。In vitro 試験陽性の理由として、細菌特異的代謝(高ニトロ還元酵素活性)、酸化ストレスの影響、試験デザインの不備(古い試験のため現行の濃度/毒性制限からの逸脱)、あるいは高感受性細胞(機能的 p53 欠損)の使用などをあげている。なお、AMP397 および 1,2-ジクロロベンゼンを除く 7 物質は、EU の消費者安全科学委員会(SCCS)によって評価され、ハザード評価あるいはリスク評価において変異原性には懸念がないとされている。

3.3. In vitro 陽性物質ながら in vivo 試験で陰性を示した物質に関する NAMs を活用した評価の検討

上記 in vitro 陽性ながら in vivo 試験で陰性を示した 9 物質について、遺伝毒性 NAMs である ToxTracker***あるいは γ H2AX****の情報を収集したところ、コウジ酸、p-フェニレンジアミン、1,2-ジクロロベンゼンおよびオイゲノールで情報が得られた。ToxTracker では、p-フェニレンジアミンは DNA 損傷、酸化ストレス、p53 活性化で陽性を示し、タンパク質損傷のみで陰性を示した。1,2-ジクロロベンゼンはすべてのマーカーで陰性を示し、オイゲノールは DNA 損傷、酸化ストレス、p53 活性化で陽性を示した。また、 γ H2AX では、コウジ酸、p-フェニレンジアミン、およびオイゲノールでその発現が認められた。

特定の生物学的メカニズム(代謝など)に対応する新規の in vitro アッセイは、証拠の重み付け(WOE)により、in vitro の結果の信頼性を高めるのに役立つ。遺伝毒性作用機序(MOA)を明らかにするメカニズムアッセイは、直接的な DNA 反応性と酸化ストレスまたはタンパク質損傷に関連する間接的な遺伝毒性を区別することができる。NAMs による評価が、in vitro 試験に重みを与える可能性がある。

***: ToxTracker は、作用機序的遺伝毒性評価のための哺乳類細胞を用いた in vitro レポーターアッセイである。レポーター遺伝子の種類及び発現レベルにより、1) 変異原性(DNA 損傷)、2) 酸化ストレス(ROS 産生)、3) タンパク質損傷(小胞体ストレス応答)及び 4) p53 活性化(細胞ストレス、アポトーシス)を介した経路を区別できる。

****: リン酸化 H2AX(γ H2AX)は、DNA 損傷(DNA 二本鎖切断)の鋭敏なマーカーである。DNA 損傷により、ヒストンタンパク質 H2A の亜種である H2AX の Ser-139 残基が、速やかに、かつ広範囲にリン酸化される。

4. 結論

実データ解析の結果、多くのケースで in vitro 陽性でも in vivo では陽性とは限らず、in vitro 試験単独では過剰分類のリスクが高いことが判明した。結論として、in vitro データのみでは、変異原性の分類を最終決定するには不十分といえる。In vitro 試験だけからの分類判断は信頼性が低いため、in vivo データや他の証拠が必要となり、規制上の意思決定には、ケースバイケースでの総合判断(WOE や MOA の考慮)が不可欠である。In vitro 陽性は重要な指標で警告信号とはなるが、それだけで結論は出せない。

【編集者所感】

近年の NAMs への期待の高まりの中、in vitro 試験陽性をどのように評価するのが妥当かを検証したレポートである。In vitro 陽性は過剰評価となるケースがあることが示された一方で、その知見を上手に活用する手段の必要性を示している。一方、in vitro 陰性であればどのくらい安全なのか(in vivo でのハザ

ードはあるのか、ないのか)、という命題も残されている。有害性発現経路(AOP)に基づき様々な NAMs が開発されてきている中で、それらを規制にどのように活用していくか、その展開が期待される。

【参考文献】

- (1) Capeloa, T. and Corvi, R., Can we conclude on mutagenicity classification based in in vitro data only? Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2026, <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC145137>
- (2) EC, EUROPEAN COMMISSION, 2022. Commission Regulation (EU) 2022/477 of 23 March 2022 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). L 102. Available: <https://eurlex.europa.eu/eli/reg/2022/477/oj>
- (3) https://www.jniosh.johas.go.jp/groups/ghs/ghs_10j_archived.pdf

本記事では、NITE ケミマガ等で配信された情報の中から、国際的に注目されているトピックを取り上げ、概要を紹介しています。

本概要は、公開されている情報を基に編集者がまとめたものであり、最終的なご判断は読者の皆さまにお任せいたします。詳細については必ず情報源をご確認ください。